

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ANÁLISE DA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA E DE MARCADORES DE
REMODELAÇÃO ÓSSEA DE PACIENTES BRASILEIROS COM GLICOGENOSES
HEPÁTICAS**

JÉSICA TAMARA JACOBY

Porto Alegre

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ANÁLISE DA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA E DE MARCADORES DE
REMODELAÇÃO ÓSSEA DE PACIENTES BRASILEIROS COM GLICOGENOSES
HEPÁTICAS**

JÉSICA TAMARA JACOBY

Orientador: Prof. Dra. Ida Vanessa Doederlein Schwartz
Coorientadora: Dra. Roberta Hack Mendes

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção no Programa de Mestre Medicina: Ciências
Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências
Médicas.

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na Publicação

Jacoby, Jéssica Tamara

Análise da densidade mineral óssea e de marcadores de remodelação óssea de pacientes brasileiros com glicogenoses hepáticas / Jéssica Tamara Jacoby. -- 2021.

95 f.

Orientadora: Ida Vanessa Doederlein Schwartz.

Coorientadora: Roberta Hack Mendes.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Glicogenoses hepáticas. 2. Densidade mineral óssea. 3. Marcadores ósseos. 4. Densidade mineral óssea e glicogenoses. 5. Erro inato do metabolismo. I. Schwartz, Ida Vanessa Doederlein, orient. II. Mendes, Roberta Hack, coorient. III. Título.

Agradecimentos

À minha orientadora Profa. Dra. Ida Vanessa Doederlein Schwartz por me proporcionar tantas oportunidades de aprendizado, pela compreensão, por todos os ensinamentos compartilhados e pelo direcionamento em todas as etapas desta pesquisa.

À Dra. Roberta Hack Mendes pela confiança, por todo incentivo e força, pelos ensinamentos, paciência e compreensão, mesmo longe sempre estive por perto.

À Dra. Soraia Poloni agradeço por ter me guiado e direcionado sempre que precisei e por todo conhecimento repassado.

Ao Serviço de Genética Médica do Hospital das Clínicas de Porto Alegre pelo apoio na realização deste estudo, em especial às colegas Bruna Bento, Karina Colonetti, Lília Farret e Vaneisse Monteiro por todo apoio e conhecimento compartilhado.

À minha família, meus pais Roberto e Cenira, minha irmã Mayara, pela torcida, incentivo e força diários, por vibrarem com cada pequena conquista minha. A vocês minha eterna gratidão.

Ao Rodrigo pelo amor e companheirismo, por aceitar minhas inquietudes e entender as minhas ausências, respeitar e estar ao meu lado em todas as minhas escolhas.

Às minhas amigas Simone, Jaqueline, Dieinicler, Jéssica e Leidiane, pelo incentivo, acolhimento e por vibrarem com cada pequena conquista.

Aos pacientes que fizeram parte do estudo ou que cruzaram meu caminho, proporcionando aprendizado e possibilitando a realização deste estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, pela qualidade de ensino e oportunidades proporcionadas.

À UFRGS pelo conhecimento proporcionado.

À Deus, pela proteção.

Enfim, a todos que colaboraram direta ou indiretamente para minha formação.

RESUMO

Base teórica: As Glicogenoses hepáticas (GSD) são erros inatos do metabolismo do glicogênio e estão associadas à hipoglicemia de jejum. O seu tratamento tem como objetivo a manutenção das concentrações glicêmicas por meio de adequações dietéticas, como, por exemplo, a oferta de doses frequentes de amido de milho cru. Recentes estudos demonstraram baixa densidade mineral óssea (DMO) em pacientes com GSD, sendo citada como uma das complicações da doença. Entretanto, os mecanismos subjacentes à essa associação não são bem compreendidos.

Objetivo: Caracterizar a DMO e as concentrações dos marcadores de remodelação óssea de uma amostra de pacientes brasileiros com GSD hepáticas, por meio de absorciometria de raios-X de dupla energia (DXA) e dosagem séricas de osteocalcina (OC), propeptídeo N-terminal do procolágeno de tipo 1 (P1NP) e telopeptídeo C-terminal do colágeno 1 (CTX).

Métodos: Estudo transversal, com amostragem por conveniência. Foram incluídos vinte e três pacientes com diagnóstico genético de GSD hepática (Ia n = 13, Ib n = 5, IIIa n = 2, IXα n = 3, mediana da idade = 11,9 anos, 0 a 11 anos n = 12 pacientes, 12 a 19 n = 5 e ≥20 n = 6 pacientes) em tratamento (mediana = 9,4 anos) com amido de milho cru (mediana = 6,3g/kg/dia). Na mesma consulta, foram realizadas análise por DXA (n = 23); coleta de sangue para dosagem de OC (n = 18), P1NP (n = 19), CTX (n = 18), 25-OH vitamina D (n = 23) e medidas antropométricas. Registros alimentares de três dias foram preenchidos por 20 pacientes na semana anterior à realização do DXA. Informações sobre marcadores bioquímicos complementares foram extraídas dos prontuários médicos, sendo considerada a data mais próxima à realização do DXA. Boa adesão ao tratamento foi definida por adequadas concentrações séricas de glicose, lactato e triglicerídeos. Para lactato e glicose, foram utilizados os valores medianos dos 24 meses que precederam o DXA, triglicerídeos corresponde ao valor do exame mais próximo da realização do DXA.

Resultados: Redução da DMO foi encontrada em n = 3/23 pacientes (GSD Ia n = 1, IIIa n = 2). De acordo com os marcadores de remodelação óssea, n = 6/19 pacientes apresentaram concentrações aumentadas de pelo menos um marcador (OC n = 1, CTX n = 2, P1NP n = 6), todos com DMO normal. Baixa concentração sérica de 25-OH vitamina D foi encontrada em n = 7/23 pacientes (um fazia uso de suplemento de vitamina D e três, de polivitamínico). Sete pacientes apresentaram hiperlactatemia (mediana = 1,5 mmol/L; IQ25-75 = 1,3-2,3); n = 10/22, hipertrigliceridemia (mediana = 2,2mmol/L, IQ25-75 = 1,2-3,2); n = 10/22, hipercolesterolemia (mediana = 4,5mmol/L, IQ25-75 = 3,6-5,2); n = 2/22, hipoglicemia (mediana = 4,6mmol/L (4,3-4,9); n = 1/14, hiperfosfatemia (mediana = 1,4mmol/L, 1,2-1,6); e n = 3/14, baixos níveis de vitamina B12 (mediana = 379,7pmol/L, IQ25-75 = 289,1-561,7). Não foi observado hipo/hipercalcemia. O consumo de calorias, vitaminas B6 e B12 foi superior à ingestão diária recomendada para n = 11/20, n = 10/20 e n = 14/20 pacientes, respectivamente. Consumo inferior ao recomendado foi observado para vitamina D (n = 19/20), cálcio (n = 20/20), fósforo (n = 11/20) e potássio (n = 20/20). Excesso de peso foi observado em n = 17/23 pacientes. Boa adesão ao tratamento foi observada em n = 11/23 pacientes. Foi encontrada correlação negativa entre consumo calórico e OC e P1NP (r: -0,761, p: 0,001; r: -0,776, p: 0,001, respectivamente), e de peso corporal com CTX, P1NP e OC (r: -0,652, p:0,003; r: -0,690, p:0,001; r: -0,668, p:0,002, respectivamente).

Conclusões: Nossos achados sugerem que apenas uma pequena proporção da amostra apresentou DMO reduzida. Isso pode estar relacionado à composição corporal, IMC, hábitos alimentares ou uma combinação de fatores. A ingestão insuficiente de vários micronutrientes pode influenciar a renovação óssea. Portanto, destacamos a importância da suplementação individualizada e direcionada de cálcio e vitamina D em todos os pacientes com GSDs hepáticas.

Palavras chave: Glicogenose; Densidade Mineral Óssea; GSD; Osso; Osteocalcina; Absorciometria de raios-X de dupla energia.

ABSTRACT

Background: Hepatic glycogen storage diseases (GSD) are inborn errors of glycogen metabolism associated with fasting hypoglycemia. Treatment of hepatic GSDs aims to maintain glycemic concentrations through dietary adjustments, such as frequent raw cornstarch consumption. Recent studies have demonstrated low bone mineral density (BMD) in patients with GSD as a complication of the disease. However, the mechanisms underlying this association are not well understood.

Objective: characterize BMD and bone biomarkers in a sample of Brazilian patients with hepatic GSD, using dual X-ray absorptiometry (DXA), serum osteocalcin (OC), Procollagen type I N-terminal propeptide (P1NP) and collagen 1 C-terminal telopeptide (CTX).

Methods: cross-sectional study, with convenience sample. Twenty-three patients with a genetic diagnosis of GSD were included (Ia n = 13, Ib n = 5, IIIa n = 2, IX α n = 3, median age = 11.9 years, 0 to 11 years n = 12 patients, 12 to 19 n = 5 and \geq 20 n = 6 patients) being treated (median = 9.4 years) with raw cornstarch (median = 6.3g / kg / day). Following tests were performed in the same day: anthropometric measurements, DXA (n = 23), blood sample for OC (n = 18), P1NP (n = 19), CTX (n = 18) and 25-OH vitamin D dosage (n = 23). In addition to that, a 3-day food diary was completed in the week prior to the DXA (n = 20) and reviewed by a dietician. Information on additional biomarkers was extracted from medical records at a date close to the DXA. Good treatment adherence was defined by adequate serum concentrations of glucose, lactate and triglycerides. For lactate and glucose, the median values of the 24 months preceding DXA were used, triglycerides corresponding to the value of the exam closest to the performance of DXA.

Results: Reduced BMD was found in n = 3/23 patients (GSD Ia n = 1, IIIa n = 2). Regarding biomarkers of bone turnover, we observed that n = 6/19 patients had at least one of them raised (OC n = 1, CTX n = 2, P1NP n = 6), all patients with normal BMD. Reduced 25-OH vitamin D concentration was found in n = 7/23 patients (from which, one was on vitamin D and n = 3 on multivitamin supplementation). Seven patients presented hyperlactatemia (median = 1.5 mmol / L; IQ25-75 = 1.3-2.3); n=10/22 hypertriglyceridemia (median = 2.2 mmol / L; IQ25-75 = 1.2-3.2), n = 10/22 hypercholesterolemia (median = 4.5 mmol / L; IQ25-75 = 3.6-5.2), n = 2/22 hypoglycemia (median = 4.6 mmol / L, IQ25-75 = (4.3-4.9), n = 1/14 hyperphosphatemia (median = 1.4 mmol / L; IQ25-75 = 1.2-1.6); and n = 3/14 low vitamin B12 levels (median = 379.7pmol / L; IQ25-75 = 289.1-561.7). Hypo or hypercalcemia was not observed. In relation to dietary pattern, calorie intake was higher than Dietary Recommendation Intake (DRI) for n = 11/20 patients, as well as vitamins B6 (n = 10/20) and B12 intake (n = 14/20). Likewise, vitamin D intake (n = 19/20), calcium (n = 20/20), phosphorus (n = 11/20) and potassium (n = 20/20) was lower than DRI. Seventeen (out of 23) patients were overweight. Good adherence to treatment was observed in n = 11/23 patients. We observed negative relationship between caloric intake, OC and P1NP (r: -0.761, p: 0.001; r: -0.776, p: 0.001, respectively) and in the same way for body weight, CTX, P1NP and OC (r: -0.652, p: 0.003; r: -0.690, p: 0.001; r: -0.668, p: 0.002, respectively).

Conclusion: Our findings suggest that only a small proportion of the sample presented reduced BMD. This may be related to body composition, BMI, dietary habits, or a combination of factors. Insufficient intake of several micronutrients can influence bone turnover. Therefore, we highlight the importance of individualized, targeted calcium and vitamin D supplementation in all patients with hepatic GSDs.

Key Words: Glycogen Storage Disease; Bone mineral density; Bone; Osteocalcin; Dual energy X-ray absorptiometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Condutas dietéticas nas glicogenoses hepáticas	14
Figura 2 - Fluxograma de seleção dos artigos sobre glicogenoses hepáticas e densidade mineral óssea.	15
Figura 3 - Metabolismo do glicogênio e enzimas envolvidas nas glicogenoses hepáticas I, III e IX.	17
Figura 4 - Etapas da remodelação óssea	26
Figura 5 - Exame absorciometria de raios-X de dupla energia	28
Figura 6 - Marco conceitual das glicogenoses hepáticas e densidade mineral óssea	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critério diagnóstico absorciometria de raios-X de dupla energia	28
Tabela 2 - Marcadores de formação e reabsorção óssea	30
Tabela 3 - Valores de referência para marcadores ósseos	31

LISTA DE ABREVIATURAS

AACE	American Association of Clinical Endocrinologists
ACE	American College of Endocrinology
ADP	Difosfato de adenosina
ALP	Fosfatase alcalina
ATP	Trifosfato de adenosina
CK	Creatina kinase
Cm ²	Centímetro quadrado
CMO	Concentração mineral óssea
CTX	Telopectídeo C-terminal do colágeno 1
DXA	Absorciometria de raios-X de dupla energia
DMO	Densidade Mineral Óssea
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
DPD	Desoxipiridinolina
EIM	Erros inatos do metabolismo
G	Gramas
G6Pase	Glicose-6-fosfatase
G6PT	Transportador glicose-6-fosfatase
GDE	Enzima de desramificação de glicogênio
GLA	γ -carboxiglutamil
GLUT	Transportadores de glicose
GSD	Glicogenose
IGF-1	Fator de crescimento insulina símile-1
IOF	Fundação Internacional de Osteoporose
ISCD	International Society for Densitometry
JOS	Japan Osteoporosis Society
Kg	Quilograma
NAD	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NOF	National Osteoporosis Foundation
NTX	Telopectídeos de colágeno tipo I N-terminal
OC	Osteocalcina

P	Percentil
P1CP	Propeptídeo carboxiterminal do pró-colágeno tipo 1
P1NP	Propeptídeo N-terminal do procolágeno de tipo 1
PDC	Pediatric Developmental Conference
Phk	Enzima fosforilase b quinase
Pqct	Tomografia computadorizada quantitativa periférica
PTH	Paratormônio
PYD	Piridinolina
QCT	Tomografia computadorizada quantitativa
RM	Ressonância magnética
SGM-HCPA	Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato

Sumário

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	Estratégias para localizar e selecionar as informações	15
2.2	Glicogenoses	16
2.2.1	Glicogenose tipo I.....	18
2.2.2	Glicogenose tipo III.....	20
2.2.3	Glicogenose tipo IX.....	22
2.2.4	Glicogenoses hepáticas e densidade mineral óssea.....	23
2.3	Densidade mineral óssea	25
2.3.1	Absorciometria de raios-X de dupla energia.....	27
2.3.2	Marcadores de remodelação óssea.....	29
2.3.2.1	Osteocalcina.....	31
2.3.2.2	Propeptídeo N-terminal do procolágeno de tipo 1.....	32
2.3.2.3	Telopectídeo C-terminal do colágeno 1.....	32
2.3.3	Nutrição e densidade mineral óssea.....	33
3.	MARCO CONCEITUAL	35
4.	JUSTIFICATIVA	37
5.	OBJETIVOS	37
5.1	Objetivo primário	37
5.2	Objetivo secundário	37
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
7.	ARTIGO	49
8.	CONCLUSÕES	74
9.	PERSPECTIVAS FUTURAS	75
10.	APÊNDICES	76
10.1	Apêndice 1 – Carta de aprovação do projeto 14-0120	76
10.2	Apêndice 2 – Carta de aprovação do projeto 15-0218	77
10.3	Apêndice 3 – Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes – projeto 14-0120	79
10.4	Apêndice 4 – Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes adultos – projeto 15-0218	82
10.5	Apêndice 5 – Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes com menos de 18 anos – projeto 15-0218	86

10.6 Apêndice 6 – Resumo publicado nos anais do <i>Journal of Inborn Errors of Metabolism and Screening</i> - 2019.....	90
10.7 Apêndice 7 - STROBE Statement – <i>Checklist</i> para estudos observacionais.....	92
10.8 Apêndice 8 – Finalista melhor pôster da 40ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre	96

1 INTRODUÇÃO

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são um grupo de doenças hereditárias, resultantes da atividade deficiente de enzimas que possibilitam a conversão de substratos em metabólitos (1). Os sinais e sintomas ocorrem pelo acúmulo do substrato tóxico, deficiência do produto ou por ambos. O início do quadro clínico pode ser a partir do período neonatal até a idade adulta, dependendo da atividade residual da enzima deficiente (2). Os EIM são individualmente raros, mas coletivamente comuns, com uma incidência geral de mais de 1:1.000 nascidos vivos (3). Atualmente, mais de 700 EIM já foram descritos (4).

As glicogenoses (GSDs) são EIM resultantes de alterações no metabolismo do glicogênio, causadas por anormalidades nas enzimas responsáveis pela síntese ou degradação de glicogênio (5–7). A incidência global é de aproximadamente 1 caso a cada 20.000 – 43.000 nascidos vivos (8).

Já foram descritos pelo menos 16 tipos de GSDs, cada uma causada por um defeito enzimático específico (9,10). A classificação das GSDs baseia-se na enzima deficiente e no tecido afetado (11,12). Dividem-se em subtipos com envolvimento hepático (tipos 0, Ia, Ib, IIIa, IIIb, IV, VI, IXa, IXb, IXc, XI), que apresentam hipoglicemia, e as com envolvimento cerebral e muscular (II, Iib, III, IV, V, VII, IXd), que estão associadas à doença neuromuscular e fraqueza (5–7). As GSD abordadas neste estudo correspondem aos subtipos I, III e IX, as quais representam 80% das GSDs hepáticas (8).

Pacientes com diagnóstico de GSDs hepáticas apresentam, normalmente, além da hipoglicemia, obesidade androide, que consiste em maior concentração de gordura na região do tronco, baixa estatura e músculos hipotróficos. Possuem complicações que incluem adenomas hepáticos, glomeruloesclerose segmentar e focal e neuropatia (5). A gravidade dos sintomas depende da atividade da gliconeogênese e glicogenólise (9), além do tipo de envolvimento, se muscular, hepático ou ambos tecidos (8). A doença pode apresentar-se como um transtorno leve e com expectativa de vida normal, no entanto, se não tratada, pode ser fatal na infância (5).

O manejo dietético é o tratamento mais eficaz e indicado até o momento (10). A conduta dietética para GSDs hepáticas tem como objetivo a normoglicemia e as principais recomendações são refeições frequentes e restrição de carboidratos simples, além de alimentação contínua noturna por gotejamento gástrico e/ou consumo de amido de milho cru (13). Na GSD do tipo I, a restrição de frutose, sacarose e lactose é indispensável, enquanto no tipo III e IX é apenas restrito, adicionalmente, deve-se ofertar um bom aporte protéico (11) (figura 1). O tratamento dietético adequado pode ser capaz de evitar distúrbios metabólicos secundários e desenvolvimento de

complicações a longo prazo, como adenomas/carcinomas hepatocelulares, (cardio) miopatia, insuficiência renal e osteoporose (13).

Recentemente, a baixa densidade mineral óssea (DMO) tem sido associada às GSDs, no entanto, apenas informações limitadas sobre os fatores envolvidos nesta relação estão disponíveis. Estudos sugerem que pacientes com GSD I e III podem ter um risco aumentado de osteopenia e osteoporose ou, pelo menos, DMO inferior aos controles saudáveis (14–19). Porém, sua fisiopatologia ainda não está bem descrita, podendo ser atribuída a deficiências de cálcio e vitamina D, anormalidades do ambiente endócrino e metabólico, sendo, portanto, multifatorial (16,18,20).

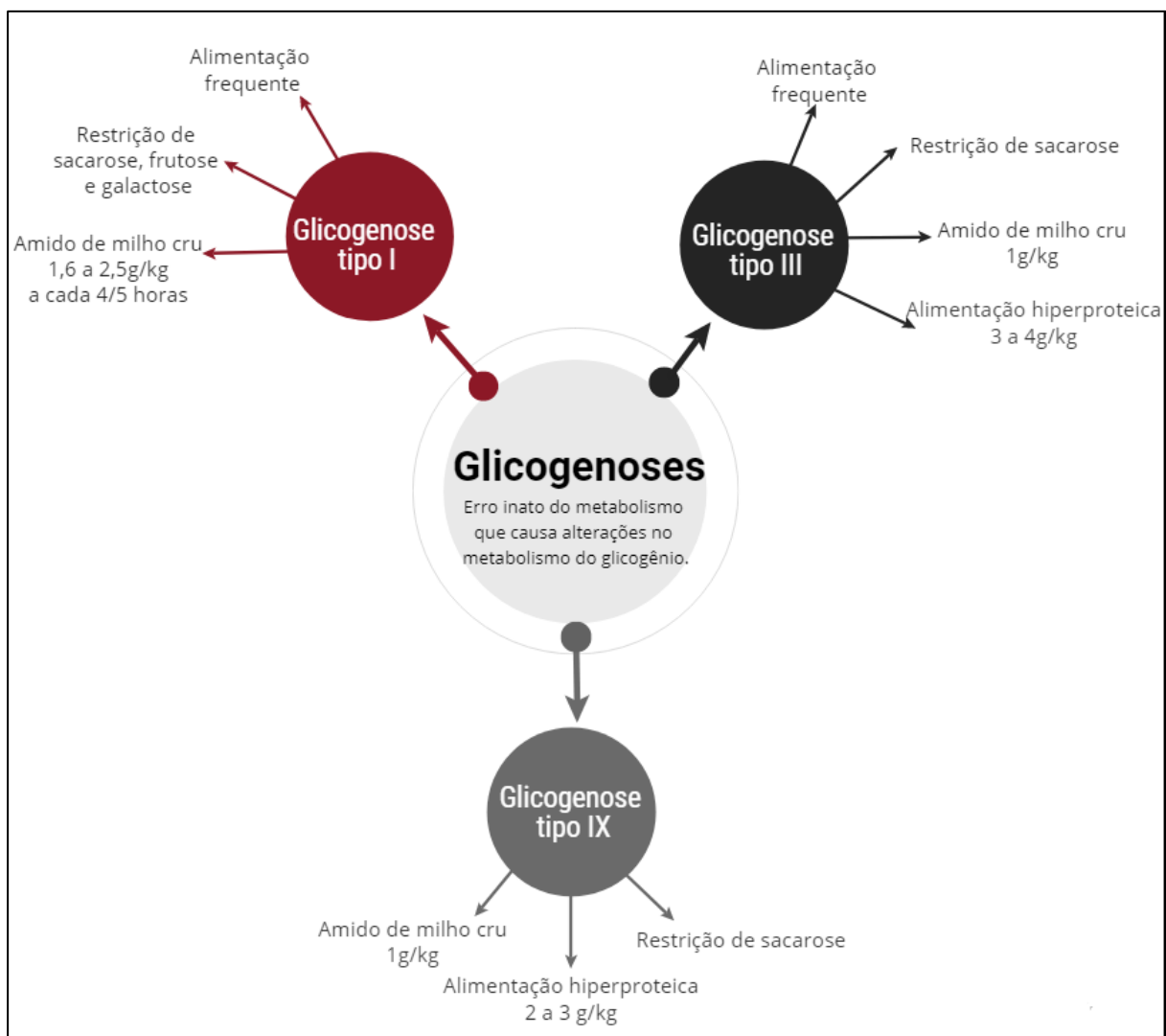


Figura 1: Condutas dietéticas nas glicogenoses hepáticas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

Está revisão focou nos aspectos envolvidos na DMO de pacientes com GSDs hepáticas. Para a elaboração da revisão de literatura, foi realizada busca de artigos no banco de dados de referências de artigos médicos: Pubmed, Scielo e Cochrane. Os descritores utilizados foram “glycogen storage diseases”, “bone mineral density”, “Dual energy ray absorptiometry” e “bone turnover marker”, por meio de buscas com a associação dos termos “glycogen storage diseases” AND “bone mineral density” e “glycogen storage diseases” AND “Dual energy ray absorptiometry”, “glycogen storage diseases” AND “bone turnover marker”.

Foram considerados artigos completos publicados nos últimos 10 anos (2010 a 2020), com humanos, sem restrição de idioma. Artigos clássicos foram adicionados à lista de referências. Foram excluídos estudos realizados com pacientes com outros tipos de GSDs (sem envolvimento hepático), outras doenças, estudos com modelos animais e resumos publicados. Conforme figura 2.

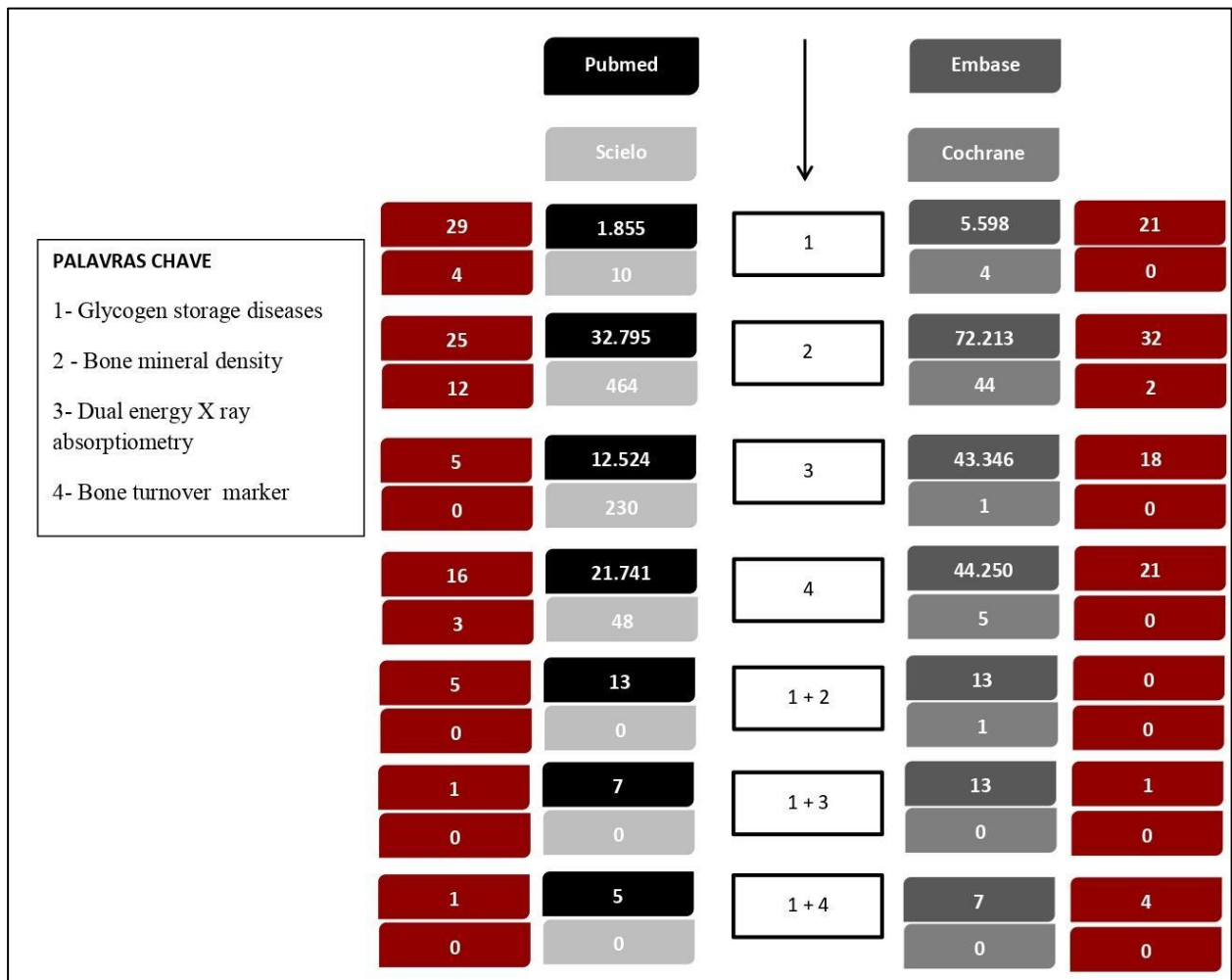


Figura 2 - Fluxograma de seleção dos estudos sobre glicogenoses hepáticas e densidade mineral

óssea. Caixas em vermelho indicam os artigos aptos para inclusão no trabalho, de acordo com os critérios de inclusão.

2.2 Glicogenoses

O glicogênio é um polímero de glicose ramificado, que tem como função a reserva energética. É formado por subunidades de glicose, as quais se ramificam entre 8 a 12 monômeros, aproximadamente. Durante períodos de abundância, o glicogênio é armazenado no tecido muscular e no fígado, para ser utilizado pelo organismo em momentos de necessidade (12). O fígado contém o maior percentual de glicogênio em peso, cerca de 10%, enquanto o músculo pode armazenar cerca de 2%. No entanto, como a massa muscular total é maior que a massa do fígado, a massa total de glicogênio no músculo é cerca de duas vezes maior que a do fígado (21).

Em períodos de abundância, o excesso de glicose pós-prandial desencadeia a liberação da insulina e a síntese e armazenamento de glicogênio nos músculos e fígado. Em privação, como jejum, por exemplo, ou alta demanda de energia, o glucagon sinaliza o fígado para iniciar o processo de glicogenólise, a quebra das moléculas de glicogênio em glicose. A glicose então é liberada na corrente sanguínea, mantendo a homeostase das concentrações de glicose (12,21). O glicogênio muscular é utilizado de forma semelhante e tem como função fornecer energia para a contração muscular (21).

Mutações nos genes que codificam enzimas responsáveis pela síntese ou degradação do glicogênio causam GSDs, que resultam em alterações na estrutura ou concentração de glicogênio em tecidos do organismo (21).

De acordo com o defeito enzimático e sua expressão, no fígado ou músculo, as GSDs são classificadas com envolvimento hepático, resultando em hipoglicemia (22), ou muscular, ocasionando doença neuromuscular e fraqueza (5). As GSD possuem 16 subtipos diferentes, os quais são descritos, de acordo com suas características clínicas, bioquímicas e genéticas (10).

Nas GSDs hepáticas, a produção endógena de glicose por meio das rotas glicogenólise e da gliconeogênese é prejudicada pela ausência ou deficiência de enzimas, causando, desta forma, hipoglicemia pós-prandial e de jejum, bem como o aumento da produção de ácido lático, ácido úrico e triglicerídeos. Pacientes não tratados ou tratados de forma inadequada sofrem de hipoglicemia recorrente, acidose metabólica crônica, atraso no desenvolvimento motor, falha de crescimento na infância e atraso na puberdade (23), além de diversas complicações tardias, como adenomas hepáticos, neuropatia, osteoporose e cálculo renal (7).

O diagnóstico pode ser realizado por métodos não invasivos, como pesquisa da mutação genética, análise das alterações clínicas e bioquímicas. O diagnóstico definitivo é através da biópsia hepática, um método invasivo (8,11).

O tratamento das GSDs hepáticas consiste no manejo dietético, com alimentação frequente, consumo de amido de milho cru e, em alguns casos, alimentação gástrica noturna. A dietoterapia tem como objetivo manter a normoglicemia, prevenindo o descontrole metabólico secundário e o desenvolvimento de complicações a longo prazo (13,24).

Os tipos mais comuns de GSDs hepáticas são I, III e IX, os quais correspondem a 80% das GSDs hepáticas. Na figura 3 é possível observar a rota metabólica das GSD I, III e IX.

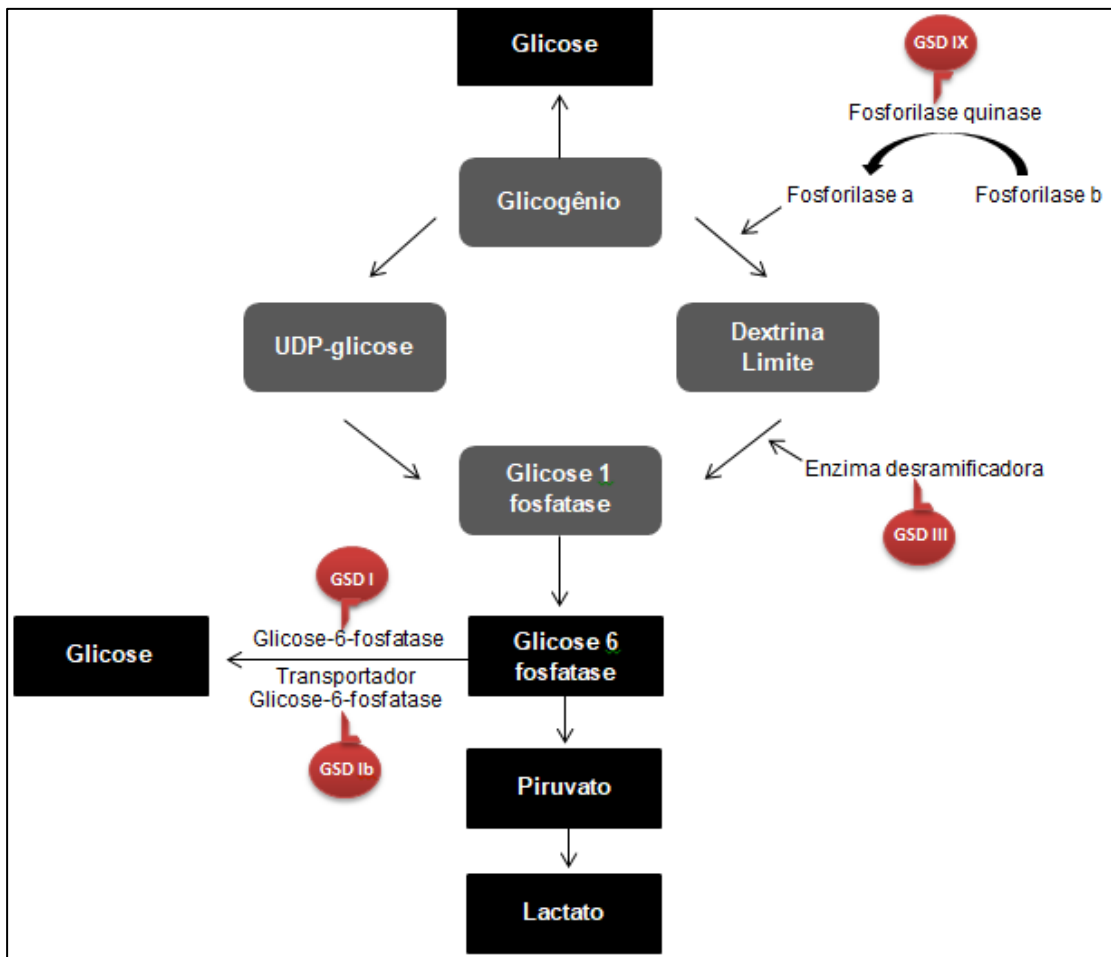


Figura 3 - Metabolismo do glicogênio e enzimas envolvidas nas glicogenoses hepáticas I, III e IX.

Legenda: GSD: glicogenose.

Fonte: Adaptado de Kishnani et al. 2019.

2.2.1 Glicogenose tipo I

A GSD do tipo I é a mais grave e comum entre todas, tem incidência de aproximadamente 1 a cada 20.000 nascidos vivos (25). É uma desordem genética autossômica recessiva, causada por um defeito na enzima glicose-6-fosfatase (G6Pase). Nos indivíduos saudáveis, a glicose-6-fosfato é sintetizada no citoplasma dos hepatócitos, sofrendo ação da enzima G6Pase ao ser transportada para o lúmen do retículo endoplasmático, produzindo, desta forma, glicose. A glicose volta para o citoplasma e, em seguida, vai para a corrente sanguínea através do transportador de glicose hepático (GLUT2) (21,25).

A gravidade da GSD tipo I se deve, a deficiência da enzima G6Pase, indispensável para o processo final das rotas gliconeogênese e glicogenólise, impedindo, desta forma, a degradação do glicogênio em glicose (22). Como consequência, os pacientes apresentam grave intolerância ao jejum e hipoglicemia; alterações bioquímicas como hiperlactatemia, hiperuricemia e hiperlipidemia, também são observadas (24).

Pacientes não tratados precocemente podem apresentar características físicas como, baixa estatura, obesidade androide, rosto arredondado/face de boneca e perda muscular (24), além de apresentarem risco para o desenvolvimento de complicações a longo prazo, como adenomas hepáticos, baixa DMO / osteoporose e doença renal, consequências também observadas em pacientes em tratamento, com mau controle metabólico (11).

Existem 4 subtipos de GSD hepática tipo I: Ia, Ib, Ic, Id, todas com a função da enzima G6Pase diminuída ou inativa. As mais comuns são os tipos Ia e Ib (26).

A GSD hepática tipo Ia, também conhecida como doença de *Von Gierke*, está associada a mutações no cromossomo 17q21 (5), que codifica a subunidade catalítica da G6Pase, a qual é expressa no fígado, rins e mucosa (27). A G6Pase é a enzima chave na regulação homeostática dos níveis de glicose no sangue (28).

Os pacientes com GSD Ia possuem incapacidade de converter glicose-6-fosfato em glicose, ocasionando o desvio da G6Pase para a derivação de fosfato de pentose e a via glicolítica. Resultando em aumento da síntese de ácido úrico, ácidos graxos e triglicerídeos. O bloqueio da gliconeogênese também leva ao acúmulo de lactato e piruvato, o qual pode entrar no ciclo de Krebs e levar a alterações em ATP/ADP e NADH/NAD⁺ em proporções que podem favorecer a tumorigênese (5).

A GSD tipo Ia é a única doença de armazenamento de glicogênio que é tanto um distúrbio de glicogenólise quanto de gliconeogênese (5). A incidência mundial é de 1 em 100.000 nascidos vivos (27) e a taxa de portadores é de aproximadamente 1 a cada 150 pessoas (5).

Os sintomas iniciais ocorrem no período neonatal e no primeiro ano de vida, com grave hipoglicemia de jejum, sudorese, tremores, hiperventilação, cianose, irritabilidade, fraqueza muscular, sonolência, convulsões, hepatomegalia, retardo no crescimento e desenvolvimento, podendo, em alguns casos, apresentar edema/disfunção cerebral, coma e morte (5,8). Bebês geralmente são agitados e incapazes de dormir durante a noite sem se alimentar frequentemente (27).

As crianças, podem apresentar hematomas, hemorragias nasais e anemia devido à função plaquetária prejudicada (5,8). É normal apresentarem também, obesidade troncular, rosto de boneca, músculos hipotróficos e abdômen protuberante, devido a grandes reservas de glicogênio no fígado (8,27).

O tratamento dietético melhora consideravelmente o prognóstico (5) e tem por objetivo prevenir a hipoglicemia, fornecendo uma fonte contínua de glicose, minimizando os distúrbios metabólicos secundários e complicações a longo prazo (7,27).

A dietoterapia pode ser contínua com sonda gástrica ou administração oral de polímeros de glicose de digestão lenta, é comumente utilizado o amido de milho cru, que pode ser introduzido a partir dos seis meses de idade, assim que o pâncreas do bebê e a atividade da amilase pancreática amadurecer (5,8,29).

O leite materno, apesar de sua alta quantidade de lactose, não é contraindicado. No entanto, ao observar crescimento deficiente, aumento da hepatomegalia, hipoglicemia ou hiperlactatemia, pode ser necessária a substituição parcial ou total por fórmula artificial sem lactose. Se já iniciado a introdução alimentar, aos 4 meses de idade, os alimentos podem ser enriquecidos com até 6% de farinha de arroz. Alimentação complementar pode ser iniciada como o habitual, aos 6 meses de idade, limitando lactose e frutose (27).

As crianças menores de 2 anos de idade geralmente necessitam de alimentação a cada 2 ou 3 horas. A ingestão de amido de milho deve ocorrer a cada 4 ou 5 horas em crianças mais velhas e adultos. As doses de amido de milho são individualizadas com base no monitoramento domiciliar e clínico da glicose e lactato, a fim de manter concentrações de glicose acima de 75 mg/dL e lactato menor que 2,2 mmol/L (5), prevenindo a hipoglicemia e evitando o armazenamento de glicogênio (7). O controle metabólico, mantido através do correto tratamento, pode evitar complicações comuns na GSD I (5,12).

A distribuição de nutrientes deve ser de 60 a 70% proveniente de carboidratos, 10 a 15% de proteínas e o restante de lipídios. Com a deficiência da enzima G6Pase, a frutose e galactose não são metabolizadas, sendo, portanto, restrito o consumo de sacarose (frutose e glicose) e lactose (galactose e glicose). Em decorrência das importantes restrições alimentares impostas na GSD I e

pela proporção de calorias provenientes do amido de milho, os pacientes normalmente apresentam baixo consumo de vitaminas e minerais, sendo, desta forma, necessária a suplementação de cálcio e polivitamínicos (30).

O tipo Ib é causado pela deficiência do transportador da enzima glicose-6-fosfatase (G6PT), responsável pelo transporte do glicogênio-6-fosfato do citoplasma celular para o lúmen do retículo endoplasmático (12), desta forma, não atuando como substrato para a G6Pase e não produzindo a glicose (5). Esse subtipo representa apenas 10 a 15%, cerca de 1 a cada 8 pacientes com GSD tipo I (27) e 1 em 1.000.000 indivíduos da população em geral (5).

Os pacientes com GSD Ib podem ser clínica e metabolicamente idênticos aos do tipo Ia nos primeiros anos de vida, entretanto, com o passar dos anos, grande parte desenvolve neutropenia, principal característica da GSD Ib, e consequente doença inflamatória intestinal e infecções bacterianas recorrentes. Entretanto, os desfechos clínicos são variáveis (5), uma vez que a neutropenia pode ser cíclica ou constante, apresentar-se desde o nascimento ou não aparecer até o final da infância. Estima-se que antes dos 12 meses de idade, aproximadamente dois terços dos pacientes apresentarão sintomas iniciais como redução de contagem de neutrófilos (27).

A doença inflamatória intestinal se assemelha à doença de Crohn e é decorrente da disfunção dos neutrófilos e consequente redução da sua concentração na corrente sanguínea. A complicação geralmente aparece entre 5 e 12 anos de idade (25). E, como consequência dos episódios frequentes de diarreia, comumente observa-se retardo no crescimento, anemia grave, infecções e úlceras periorais (5,7). As complicações sistêmicas podem ser idênticas às da GSD Ia.

O tratamento para pacientes com GSD Ib é semelhante àquele para GSD Ia, com a adição de terapia para a neutropenia e enterocolite (5).

Os tipos Ic e Id são extremamente raros e são causados pela deficiência no transporte microsomal hepático de fosfato e glicose (8).

2.2.2 Glicogenose tipo III

A GSD III também é conhecida como doença de Forbes, dextrinose limite ou doença de Cori. É uma doença autossômica recessiva, presente em diversos grupos étnicos, incluindo caucasianos, africanos, hispânicos e asiáticos (31). É um transtorno causado pela deficiência da enzima desramificadora do glicogênio (GDE), que, em conjunto com a glicogênio fosforilase, é responsável pela completa degradação do glicogênio em dois locais catalíticos: amilo-1,6-glicosidase e 4-alfa-glicanotransferase (32,33). Como resultado do comprometimento da enzima GDE, esse distúrbio causa um acúmulo anormal de uma forma de glicogênio chamada dextrina

limite, em vários tecidos, principalmente no fígado, coração e músculo esquelético, prejudicando, desta forma, o funcionamento dos órgãos afetados (33).

De acordo com a prevalência, a GSD III é rara, com uma incidência de 1:100.000 nascidos vivos (5,25,32).

Existem 4 subtipos de GSD III, classificados de acordo com as diferenças na expressão tecidual da enzima GDE (32). A deficiência da enzima GDE causa os tipos mais comuns de GSD III. O tipo IIIa representa 85% dos casos, nesta GSD a enzima é deficiente tanto no fígado como no músculo, causando, portanto, comprometimento hepático e muscular; o tipo IIIb, corresponde a 15% dos casos, ocorre pela deficiência enzimática apenas no fígado, portanto, apenas com sintomas hepáticas (5).

A GSD tipo III é um distúrbio fenotipicamente heterogêneo com diversas manifestações clínicas (33,34). Podendo variar de assintomática, na maioria das vezes, até disfunção cardíaca grave, insuficiência cardíaca congestiva e, raramente, morte súbita (5). Na infância, a doença manifesta-se principalmente pelo envolvimento hepático, com hepatomegalia, hipoglicemia, hiperlipidemia, elevação das concentrações séricas de transaminases e retardo de crescimento (33,34), além de leve hipotonia e atraso no desenvolvimento motor. No final da infância e adolescência, as manifestações hepáticas parecem reduzir, mas, a insuficiência hepática e fibrose podem ser progressivas e alguns pacientes podem desenvolver cirrose hepática, adenoma hepático ou hepatocelular (33). Nesta fase pode-se notar diminuição da resistência física e dor muscular ao realizar esforço físico (32). A fraqueza muscular e demais sintomas musculares normalmente aumentam de forma lenta e progressiva na idade adulta, podendo se tornar grave na terceira ou quarta década de vida (25). A perda da massa muscular e a intolerância ao exercício é frequentemente observada nos pacientes com GSD III (33).

Embora todos os pacientes com GSD tipo III apresentem sintomas, em casos raros, os sintomas hepáticos são leves e o diagnóstico é realizado apenas na idade adulta, quando os indivíduos apresentam sinais de doença neuromuscular (5), como miopatia e neuropatia (35).

O diagnóstico da GSD III pode ser realizado por demonstração de glicogênio anormal e excessivo no fígado e/ou músculo e a deficiência da atividade da enzima de desramificação em fibroblastos ou linfócitos da pele, ou então, pela análise de mutação genética e associação específica de algumas das mutações pela sub-tipagem analisando o DNA (25).

O tratamento tem como base o manejo dietético, no qual a principal fonte de energia deve ser proveniente da proteína. Recomenda-se 3-4 gramas/quilograma (g/kg) de proteína através de alimentação e suplementos dietéticos (5,10), com o propósito de prevenir o catabolismo muscular, preservando os músculos esqueléticos e cardíacos em momentos de privação de glicose (25). A

dieta hiperproteica é complementada com amido de milho cru, para manutenção das concentrações séricas de glicose (32). Na GSD III, somente a glicogenólise está prejudicada, a gliconeogênese continua funcionando, permitindo que lactato, aminoácidos e glicerol também possam ser utilizados para manutenção da normoglicemia (5,36).

Bem como no tipo I, a frequência das doses de amido de milho varia com a idade. Na infância, alimentação a cada três ou quatro horas é recomendada (32). Nas crianças mais velhas e adultos, a frequência diminui, podendo ser utilizado de 2 a 3 vezes por dia e, em alguns casos, administrado somente antes de dormir. A terapia enteral noturna incluindo aporte proteico pode ser benéfica para pacientes com cardiomiopatia hipertrófica moderada a grave (5), doença que causa espessamento anormal do músculo cardíaco (37). A ingestão de sacarose é limitada a 5g por refeição, a fim de minimizar a hiperinsulinemia pós-prandial e evitar o armazenamento excessivo de glicogênio (5). Já a frutose e galactose não são proibidas na GSD III (25). No entanto, o monitoramento das concentrações séricas de glicose é necessário, com a finalidade de adequar a frequência e a dose de amido de milho cru. Precisa-se verificar a adesão e manutenção do tratamento, uma vez que o mau controle acarreta em desenvolvimento de complicações como cirrose e cardiomiopatia hipertrófica (38).

2.2.3 Glicogenose tipo IX

A GSD tipo IX é um distúrbio geneticamente heterogêneo, resultante da disfuncionalidade da enzima fosforilase quinase (Phk). A Phk é uma enzima complexa que possui uma estrutura hexadecamérica, composta por quatro cópias de cada um dos quatro polipeptídios diferentes, incluindo subunidades α , β , γ e δ . Dependendo da subunidade afetada, diferentes subtipos de GSD IX são descritos (11,39).

Dentre todas as GSD, a IX constitui aproximadamente 25%, pode ser herdada de forma autossômica recessiva ou ligada ao X. A deficiência de Phk hepática ligada ao X ocorre em aproximadamente 75% dos casos de GSD IX (25). A atividade enzimática também pode ser deficiente em eritrócitos, leucócitos e fibroblastos (5).

A GSD IX possui quatro subtipos, o mais comum é IX α , resultante da atividade diminuída da Phk no fígado e/ou eritrócito, e é, atualmente, considerada uma condição leve e sem complicações, onde, o tratamento frequentemente é considerado desnecessário; a IX β é causada pela deficiência de Phk no fígado e nos músculos; o tipo IX γ é relacionado a mutações na subunidade gama da enzima Phk, ele apresenta um fenótipo mais grave e alta prevalência de

doença hepática e fibrose, podendo apresentar cirrose na infância; e o IX δ ou GSD muscular ligada ao X, é resultante da subunidade alfa prejudicar a atividade da Phk muscular (11,12).

Dentre as GSD, a tipo IX apresenta o quadro clínico mais heterogêneo, é classicamente leve, apresentando hepatomegalia, transaminases elevadas e dislipidemia, mas, pode apresentar-se de forma mais grave com sinais clínicos de hipoglicemia, baixa estatura e cirrose (11). A maioria dos pacientes é diagnosticado acidentalmente na idade adulta, após apresentarem hepatomegalia (5). No entanto, é comum o diagnóstico de pacientes com idade entre 1 e 5 anos, devido ao abdômen protuberante pela hepatomegalia, retardo no crescimento, atraso no desenvolvimento motor, dislipidemia e elevação das transaminases hepáticas (5,25). As complicações hepáticas como fibrose, cirrose, adenomas e carcinoma hepatocelular, ocorrem principalmente em pacientes com concentrações aumentadas de transaminases hepáticas e hiperlactatemia pós-prandial, anormalidades que comumente desaparecem espontaneamente com o passar dos anos, tornando os pacientes adultos praticamente assintomáticos, apesar de continuarem com a deficiência de Phk (5,11,25).

O diagnóstico pode ser realizado por meio de biópsia hepática, devido o sintoma inicial geralmente ser a hepatomegalia. Estudos enzimáticos com amostras de tecido, como fígado ou músculo, podem ser realizadas, no entanto, análises não invasivas, utilizando células sanguíneas para identificação da enzima Phk, já foram relatadas. Neste tipo de análise não fica claro o gene causador da doença, portanto, em indivíduos com suspeita de GSD IX é recomendada a análise de mutação (5).

Em casos sintomáticos, o tratamento pode corrigir o déficit estatural e os marcadores bioquímicos. Para tal, é necessário realizar o fracionamento das refeições evitando períodos de jejum, restringir a ingestão de açúcares simples e aumentar o aporte proteico, ofertando 2-3g/kg ao dia de proteína, além do consumo de amido de milho cru para manter a normoglicemia e evitar cetose em casos específicos. Porém, é importante ressaltar que a maioria dos pacientes não requer tratamento (5,40).

2.2.4 Glicogenoses hepáticas e densidade mineral óssea

As GSDs hepáticas apresentam diversas complicações, das quais, as complicações ósseas vem sendo relatadas mais recentemente, tais como a baixa DMO óssea, fraturas frequentes, osteopenia e osteoporose (16–19,41).

O aparecimento de complicações a longo prazo nas GSDs parece depender também da adesão ao tratamento e consequente controle metabólico (11,42). Alterações ósseas podem ser

resultantes de mecanismos de contra regulação da hipoglicemia na GSD I, no qual, diante de um episódio hipoglicêmico, o glucagon aumenta, ativando a formação de adenosina monofosfato cíclica no fígado por meio de receptores da proteína G, que acabam aumentando a atividade da enzima G6Pase, como a G6Pase não pode converter o glicogênio em glicose, ela acaba sendo convertida em piruvato, que, posteriormente, será convertido em lactato ou acetil coenzima A (28). A acidose láctica causa acidose metabólica, que está associada ao aumento da excreção urinária de cálcio, por meio da liberação do osso para a corrente sanguínea e por alterações na capacidade de reabsorção pelo rim, causada pela inibição do transporte do cálcio dentro do túbulo renal, induzindo a reabsorção óssea, e, conseqüentemente, causando perda da massa óssea (43). Da mesma forma, o cortisol é liberado na corrente sanguínea como resposta à hipoglicemia crônica, a produção e vida útil dos osteoblastos é diretamente afetada pelo excesso de glicocorticoides, enquanto os osteoclastos não sofrem alteração. Desta forma, com o mau controle metabólico, os pacientes apresentam redução no número de osteoblastos enquanto os osteoclastos continuam ativos, o que causa aumento da reabsorção e diminuição da formação óssea, desequilíbrio que pode causar osteoporose (28).

A doença renal, comum nas GSDs, principalmente no tipo I (42), também pode de alguma forma contribuir para a perda óssea. O rim é responsável pela reabsorção de substâncias que são excretadas na urina, seu mau funcionamento causa excreção de bicarbonato, cálcio e sódio, substâncias importantes para o organismo. Este mau funcionamento também causa acúmulo de substrato, tornando o ambiente tóxico. A acidose crônica, causada pelo acúmulo de lactato, é um fator que colabora para o desenvolvimento da osteoporose, causando aumento do tamponamento da acidose no sangue, fazendo com que o tecido ósseo libere carbonato de cálcio para regular a acidose na corrente sanguínea, cálcio que é posteriormente excretado pela urina (44–46).

No entanto, o mecanismo de osteopenia/osteoporose em GSDs é provavelmente multifatorial, com envolvimento da fisiologia muscular, meio metabólico anormal e alimentação desequilibrada, com redução na ingestão de micronutrientes. Contudo, torna-se necessário maiores investigações para elucidar fatores envolvidos em sua patogênese (18).

Alguns estudos já foram publicados relacionando a baixa DMO às GSDs. Melis et al. (2014) conduziu um estudo com pacientes com diagnóstico de GSD I, o qual investiga os efeitos do mau controle metabólico e o uso de tratamentos específicos para GSD I na DMO. Pacientes com GSD Ia e Ib apresentaram DMO reduzida em comparação com controles pareados por idade e sexo. Nos pacientes com GSD Ia, essas anormalidades se correlacionaram com a adesão à dieta e aos indicadores bioquímicos de controle metabólico. Em pacientes com GSD Ib, a DMO correlacionou-se com a idade da primeira administração da terapia com fator estimulante de

colônias de granulócitos, e também com sua duração. Demonstrando que o bom controle metabólico e a adesão à dieta são recomendados para melhorar o metabolismo ósseo em pacientes com GSD I (19).

Minarich et al. (2012) também verificou que pacientes com GSD I apresentam baixa DMO, 55,0% dos pacientes com GSD Ia e 66,7% do tipo Ib. Estes achados associaram-se a outras complicações da doença, tais como menor concentração sérica média de 25-OH vitamina D no tipo Ia, entretanto o tipo Ib não apresentou correlações significativas (28). Achados de Kaiser et al. (2019) apoiam a existência de baixa DMO nas GSD tipo I, 47,0% dos pacientes apresentaram redução da massa óssea, os resultados da DMO correlacionaram-se negativamente com concentração sérica de lactato.

Cabrera-Abreu et al. (2004) também descreveu em seu estudo que pacientes com GSD I e III apresentaram baixa DMO, o mesmo não foi observado em pacientes com o tipo IX (14). Mundy et al. (2008) descreve que pacientes com GSD III apresentam massa óssea significativamente anormal, colocando-os em risco aumentado de fratura potencial (16). Bem como Melis et al. (2016), que avaliou a DMO e o envolvimento dos fatores metabólicos, endócrinos e da atividade física no estado ósseo de pacientes com diagnóstico de GSD III. Os autores concluem que o desequilíbrio metabólico pode ser o fator chave que desencadeia a osteopenia. Podendo ocorrer por diferentes mecanismos, como hiperlipidemia crônica, redução dos níveis séricos de IGF-1 e insulina. Tendo como resultado, que pacientes apresentam DMO inferior aos controles. (18).

2.3 Densidade mineral óssea

O osso é um tecido conjuntivo dinâmico que tem função estrutural, fornecendo integridade mecânica, possibilitando a locomoção e proteção de órgãos e tecidos, e também tem envolvimento nas vias metabólicas associadas a homeostase mineral (47).

A estrutura óssea é composta 60% por minerais como cálcio e fósforo, e o restante é constituído por água e proteína, desta proteína, 90% é colágeno, formado também por osteoblastos. O colágeno não fornece suporte apenas para o osso, mas também para cartilagens, tendões e pele. A segunda proteína mais abundante do osso é a osteocalcina, provinda também dos osteoblastos, responsável por manter a homeostase de cálcio e estimular a síntese de colágeno, promovendo a formação da matriz óssea (48).

O metabolismo ósseo é regulado por sinais químicos, elétricos, mecânicos e magnéticos. Localmente, o tecido ósseo responde a estes estímulos, mantendo o equilíbrio entre formação e

reabsorção, processo denominado de remodelação óssea, necessário para a manutenção da homeostase (47).

As principais células envolvidas no metabolismo ósseo são os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Os osteoblastos são células derivadas das células tronco mesenquimais, eles participam da formação óssea, produzindo matriz orgânica óssea; os osteoclastos são derivados da linhagem hematopoiética, eles são responsáveis pela reabsorção óssea, dissolvendo a matriz mineral e extracelular óssea (figura 4) (49).

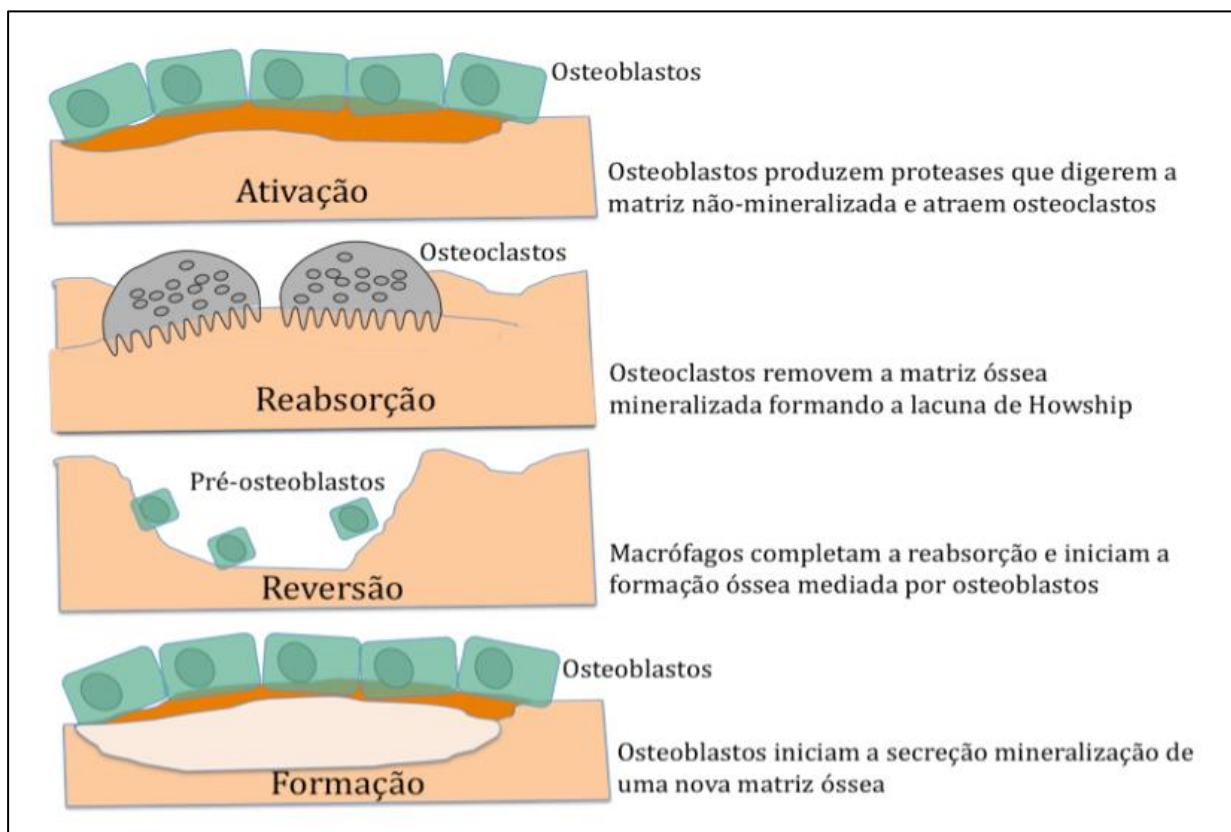


Figura 4 - Etapas da remodelação óssea

Fonte: Camargos, 2014 (50)

A homeostase óssea é mantida pelas interações entre osteoblastos e osteoclastos, que formam e removem o tecido ósseo sincronamente, processo chamado de acoplamento, conceito baseado no fato de que osteoblastos influenciam a formação e ativação dos osteoclastos, igualmente, os osteoclastos influenciam a diferenciação e a atividade dos osteoblastos (47). Os distúrbios no equilíbrio, causando maior reabsorção do que formação óssea resultam em perda da massa óssea, enfraquecendo a estrutura óssea e causando risco de fratura, osteopenia e osteoporose (51).

A quantidade óssea corporal é expressa em DMO, que é a quantidade de cálcio por unidade de superfície, já a concentração mineral óssea (CMO), expressa a quantidade total de mineral no osso, ela determina a resistência à fratura ao final do pico ósseo, quando os ossos atingem sua máxima densidade e rigidez (48).

A DMO sofre variações ao longo da vida, durante a infância e adolescência ocorre uma fase rápida de acúmulo de massa óssea, na idade adulta mantém-se sem grandes modificações, com o envelhecimento vem o aumento da perda da óssea (52). O pico de massa óssea se dá normalmente na adolescência, em torno de 18 anos nas meninas e 20 nos meninos, porém, a estrutura e remodelação óssea são afetadas por diversos fatores, como hormônios, estilo de vida, fatores nutricionais e genética (48,52).

A perda da massa óssea ocorre naturalmente ao longo dos anos, no entanto, causas secundárias podem acelerar este processo, como por exemplo, o estilo de vida, com consumo de álcool, tabagismo, sedentarismo, baixo peso (IMC inferior a 18,5kg/m²), raça branca e asiática também fazem parte dos fatores de risco; além de estados gerais de doença e uso de medicações específicas. Entre as doenças associadas à perda de massa óssea estão o hiperparatireoidismo, anorexia, síndromes de má absorção, hipertireoidismo, insuficiência renal crônica, hipogonadismo e condições crônicas resultando em deficiências de cálcio e / ou vitamina D (54).

A redução quantitativa da DMO e a ruptura da microarquitetura causa doença óssea, quando em um nível intermediário, denomina-se osteopenia, em casos mais graves o diagnóstico é osteoporose. Doenças do tecido ósseo que pode levar ao comprometimento da resistência do osso, aumentando o risco de fraturas (53).

A DMO pode ser analisada utilizando métodos como absorciometria de raios-X de dupla energia (DXA), tomografia computadorizada quantitativa (QCT), QCT periférica (pQCT) e ressonância magnética (RM), todas com suas vantagens e limitações. Em nosso estudo utilizamos o DXA, método considerado padrão ouro (55).

2.3.1 Absorciometria de raios-X de dupla energia

O DXA é um procedimento radiológico quantitativo, desenvolvido para avaliar a DMO por meio da imagem bidimensional, utilizando a imagem plana para estimar a área óssea através de feixes de raios X de baixa intensidade, que analisam todo o esqueleto ou locais específicos, conhecidos pela maior vulnerabilidade a fraturas (Figura 5) (55,56).



Figura 5 - Exame de absorciometria de raios-X de dupla energia.
Fonte: Certified Bone Densitometry Technologist (CBDT®) – ISCD (57)

A DXA fornece dados da DMO resultante da relação entre o tecido ósseo total e a área óssea. A DMO é expressa em gramas (g) e a área projetada do osso em centímetros quadrados (cm²) (55). O escore T ou Z é utilizado como forma de simplificar a interpretação dos resultados. O escore T compara a massa óssea obtida à de um adulto jovem saudável e o escore Z utiliza a DMO média de pessoas da mesma idade (58). A diferença é expressa como desvio padrão (DP) (56).

As análises realizadas pelo DXA tem por finalidade diagnosticar osteoporose e osteopenia, monitorar alterações na densidade óssea a longo prazo e também para estimar o risco de fraturas (59).

O DXA é considerado a técnica mais ampla, capaz de detectar a DMO total do osso cortical e trabecular. É definido globalmente como “padrão ouro” para diagnóstico não invasivo de osteoporose (55,56). Sua utilização é recomendada pela Pediatric Developmental Conference (PDC) 2013 e International Society for Densitometry (ISCD) 2019 em suas posições oficiais (55).

Os locais de medição de DXA recomendados pela ISCD 2019 baseiam-se em corpo total (sem cabeça) e coluna lombar em crianças, em adultos utilizam-se locais como o colo do fêmur e a coluna lombar (60,61), conforme tabela 1.

Tabela 1 - Critério diagnóstico absorciometria de raios-X de dupla energia

Faixa etária	Sítios avaliados	Critério diagnóstico	Conclusão diagnóstica
Crianças e adolescentes	Coluna lombar Corpo total sem cabeça	Escore Z ≤ -2,0 DP	Baixa densidade mineral óssea para idade
Adultos jovens	Coluna lombar (L1-L4)	Escore Z ≤ -2,0 DP	Abaixo da faixa esperada para a idade

(mulheres antes da menopausa e homens <50 anos)	Colo do fêmur ou fêmur proximal Quadril Coluna lombar (L1-L4)		
Mulheres pós menopausa e homens a partir de 50 anos	Colo do fêmur ou fêmur proximal Quadril	Score T: $\leq -2,5DP$	Osteoporose

Legenda: DP: Desvio padrão. \leq : menor igual

Fonte: ISCD 2019a; ISCD 2019b.

A análise da DMO por DXA é um método eficaz, rápido e seguro, pois apresenta baixa dose de radiação. As limitações do DXA correspondem a dependência do tamanho do osso, além de que, para interpretação, deve ser levado em consideração o gênero, etnia e idade. As análises de DXA são sujeitas a erros de artefato e necessitam de conhecimento técnico para reduzir a consequência nos resultados (56).

2.3.2 Marcadores de remodelação óssea

Durante a síntese e remodelação óssea, os marcadores do metabolismo ósseo são liberados na corrente sanguínea, eles são substratos de proteínas ósseas, principalmente do colágeno tipo 1, proteína que sofre modificações durante a síntese óssea, possibilitando, desta forma, avaliar e quantificar as atividades de formação e reabsorção ósseas (62,63). Marcadores de remodelação óssea são ferramentas complementares ao DXA na análise da DMO, avaliando o nível de remodelação óssea (64), verificando alterações que ocorrem a curto prazo, detectando de forma mais rápida o risco de fraturas, quando comparadas às alterações da DMO (63). As células envolvidas neste processo são os osteoclastos, osteoblastos e os osteócitos. Os osteoblastos possuem função de mineralizar nova matriz óssea, os osteoclastos fazem reabsorção óssea e os osteócitos atuam como mecanossensores (63,65).

Após o pico de massa óssea, o tecido ósseo passa por remodelação constante, processo cíclico e essencial para o crescimento e desenvolvimento esquelético, ele é dividido em fases de reabsorção, reversão, formação e repouso. No ciclo normal, a fase de reabsorção dura de 7 a 10 dias e a de formação de 2 a 3 meses. Até 20% do osso pode ser substituído por meio da remodelação óssea a cada ano (63,65). Em adultos jovens e saudáveis, a remodelação óssea está em equilíbrio e não causa perdas ósseas. No entanto, a taxa de remodelação óssea pode ser influenciada por hormônios, estresse mecânico, citocinas e fatores de crescimento (63).

Os marcadores bioquímicos que analisam a remodelação óssea são derivados de enzimas e peptídeos não enzimáticos. De acordo com sua função, os marcadores são agrupados em duas

categorias: os de formação óssea e os de reabsorção, conforme tabela 2. Os marcadores de formação óssea são produto dos osteoblastos, enquanto os de reabsorção são resultantes da degradação dos osteoclastos (65).

As concentrações de marcadores ósseos são mais altas em crianças do que adultos, principalmente durante o primeiro ano de vida e a puberdade, quando os valores são 2 a 10 vezes maiores que nos adultos (63). Desta forma, valores de referência são classificados por idade e sexo, conforme Bayer et al. (2014) e Wyness et al. (2013), tabela 3.

Diversas diretrizes globais incluindo a International Osteoporosis Foundation (IOF), a American Association of Clinical Endocrinologists / American College of Endocrinology (AAACE / ACE), a National Osteoporosis Foundation (NOF) e a Japan Osteoporosis Society (JOS), recomendam o uso de CTX e P1NP para monitoramento da osteoporose e risco de fraturas (66). No entanto, os marcadores não podem ser utilizados para diagnóstico de osteoporose, mas são bons preditores do risco de fratura, por analisar a taxa de renovação óssea, no qual o excesso causa deterioração da microarquitetura esquelética, contribuindo para o aumento no risco de fraturas, independente da idade, sexo, comorbidades ou DMO (63,65).

Os marcadores de remodelação óssea sofrem interferência de diversos fatores, como o ciclo circadiano, suas dosagens costumam ser mais altas no início da manhã, entre 2:00 e 8:00 horas e mais baixa durante a tarde e noite, entre 13:00 e 23:00 horas (63). A ingestão de alimentos costuma reduzir cerca de 20 a 40% os marcadores de reabsorção óssea após o consumo alimentar. O exercício físico intenso reduz marcadores de reabsorção e aumenta os de formação óssea, já o consumo de bebidas alcoólicas e o uso de algumas medicações (corticoesteroides, hormônios contraceptivos, drogas antirreumáticas, inibidores da aromatase, drogas antiepiléticas, tiazolidinedionas, diuréticos tiazídicos e antagonista da vitamina K) costumam reduzir as concentrações dos marcadores. No inverno as concentrações de CTX podem ser aumentadas devido a deficiência de 25-OH vitamina D (<15ng/dL). No entanto, é possível controlar estes fatores, orientando o paciente a manter o jejum necessário, não fazer uso de bebida alcoólica, não praticar exercícios extenuantes no dia anterior a coleta, verificando medicações em uso e realizando a coleta no período da manhã (67).

Tabela 2 - Marcadores de formação e reabsorção óssea

Marcadores de formação óssea	Fosfatase alcalina (ALP)	Soro ou plasma
	Osteocalcina (OC)	Soro ou plasma
	Propeptideo N terminal do procolágeno tipo 1 (P1NP)	Soro ou plasma
	Propeptideo C-terminal do procolágeno tipo 1 (P1CP)	Soro ou plasma

Marcadores de reabsorção óssea	Fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP)	Soro
	Telopectídeos de colágeno tipo I C-terminal (CTX)	Soro ou plasma
	Telopectídeos de colágeno tipo I N-terminal (NTX)	Urina ou soro
	Piridinolina (PYD)	Urina
	Desoxipiridinolina (DPD)	Urina

Fonte: Shetty et al. 2016; Younes et al. 2014.

Tabela 3 - Valores de referência para marcadores ósseos

Idade (anos)	Osteocalcina (ng/mL)		PINP (µg/l)		CTX (ng/mL)			
	Masculino	Feminino	Feminino	Masculino	Feminino		Masculino	
					P2,5	P97,5	P2,5	P97,5
0 – 1	20,8 a 144,3	20,8 a 144,3	227,2 a 4762,8	227,2 a 4762,8	0,404	1,529	0,354	1.199
1 -2	28,3 a 126,1	28,3 a 126,1	346,6 a 1088,0	346,6 a 1088,0	0,396	1,556	0,435	1,433
2- 3	30,7 a 85,4	30,7 a 85,4	178,3 a 645,7	178,3 a 645,7	0,396	1,556	0,435	1,433
3 – 4	23,9 a 98,4	23,9 a 98,4	135,2 a 746,1	135,2 a 746,1	0,396	1,556	0,435	1,433
4 – 5	22,8 a 129,3	22,8 a 129,3	85,7 a 901,7	85,7 a 901,7	0,396	1,556	0,435	1,433
5 – 6	42,1 a 128,2	42,1 a 128,2	111,5 a 768,4	111,5 a 768,4	0,396	1,556	0,435	1,433
6 – 7	30,9 a 122,2	30,9 a 122,2	187,6 a 887,3	187,6 a 887,3	0,565	1,570	0,509	1,697
7 – 8	12,5 a 232,5	12,5 a 232,5	49,9 a 1200,0	49,9 a 1200,0	0,565	1,570	0,509	1,697
8 – 9	25,7 a 151,1	25,7 a 151,1	120,4 a 1021,0	120,4 a 1021,0	0,565	1,570	0,509	1,697
9- 10	12,2 a 110,6	18,4 a 251,7	42,7 a 952,1	45,2 a 552,5	0,565	1,570	0,509	1,697
10 – 11	12,6 a 145,7	18,5 a 154,2	62,5 a 914,7	48,3 a 769,6	0,627	1,955	0,860	2,591
11 – 12	31,9 a 200,9	11,9 a 140,4	65,3 a 855,8	142,5 a 2501,7	0,627	1,955	0,860	2,591
12 – 13	19,8 a 164,9	13,1 a 186,7	47,0 a 980,9	67,2 a 854,8	0,627	1,955	0,860	2,591
13 – 14	58,7 a 236,2	16,8 a 238,9	37,1 a 1195,6	267,9 a 1514,6	0,627	1,955	0,860	2,591
14 – 15	25,7 a 241,0	15,4 a 88,8	58,5 a 451,4	148,1 a 1200,0	0,312	1,104	0,540	2,035
15 – 16	30,1 a 186,9	16,9 a 96,3	45,6 a 600,2	81,8 a 961,4	0,312	1,104	0,540	2,035
16 – 17	32,0 a 124,2	5,7 a 66,7	14,6 a 238,3	77,7 a 430,3	0,312	1,104	0,540	2,035
17 – 18	13,5 a 160,1	20,7 a 45,6	36,3 a 143,9	38,7 a 494,5	0,312	1,104	0,540	2,035
Adultos	11 a 48	11 a 48	13,8 a 60,9	13,9 a 85,5	<0,650		<0,850	

Legenda: P: percentil

Fonte: Bayer et al. 2014; Wyness et al. 2013.

2.3.2.1 Osteocalcina

Sintetizada por osteoblastos, odontoblastos e condrócitos hipertróficos, a OC é uma proteína que se liga à hidroxiapatita, formando cerca de 15% da matriz óssea não colágena (65). Sua síntese é estimulada por 1,25-dihidroxitamina D. A OC contém resíduos de ácido glutâmico, que são convertidos em gama-carboxiglutâmico (GLA) por carboxilação dependente de vitamina K. Durante o processo de carboxilação, a proteína é modificada estruturalmente, permitindo que a OC se ligue à hidroxiapatita durante a mineralização na matriz óssea (63).

A OC é liberada na circulação sanguínea durante os processos de reabsorção e formação óssea (68). Por ser um marcador tardio da atividade dos osteoblastos, é utilizada como marcador de formação óssea (65).

Entre as limitações do seu uso, podemos observar a influência das concentrações de vitamina K, função renal, ritmo circadiano, meia vida curta, instabilidade da molécula intacta (65) e alta variabilidade biológica (63).

2.3.2.2 Propeptídeo N-terminal do procolágeno de tipo 1

O P1NP é derivado de osteoblastos e fibroblastos (65), é liberado na corrente sanguínea como resultado da clivagem do procolágeno em colágeno tipo 1. A maioria é produzida a partir do osso, uma pequena parte é originada da pele, cartilagem e tendões, já que a matriz do colágeno 1 também está presente nestes tecidos (63).

O P1NP é composto por 3 cadeias de subunidades de procolágeno tipo 1, que estão ligadas de forma não covalente. Ele é produzido em quantidades iguais ao colágeno e é depositado no osso. Ao entrar na corrente sanguínea, o P1NP se conecta ao receptor nas células endoteliais do fígado, sendo então, degradado (62,67).

Uma pequena porção ou fragmento do P1NP é liberado na corrente sanguínea durante o processo de formação e síntese óssea, ou, posteriormente durante a sua degradação. Este marcador do metabolismo ósseo avalia a função osteoblástica e a taxa de formação óssea (69). É um marcador considerado referência pelo International Osteoporosis Foundation (IOF), pela sua boa precisão, baixa variabilidade, menor variação em decorrência do ciclo circadiano e pela estabilidade em temperatura ambiente (65).

2.3.2.3 Telopectídeo C-terminal do colágeno 1

Produto da degradação de colágeno tipo 1 do tecido ósseo (65), o CTX sofre modificações pós-traducionais, conhecidas como racemização e isomerização, dando origem a quatro isômeros de CTX: α -L, β -L, α -D e β -D. A renovação óssea acelerada é caracterizada por uma proporção aumentada de α CTX / β CTX (63). Fragmentos do peptídeo colágeno tipo 1 são liberados na corrente sanguínea durante o processo de reabsorção óssea, sendo portanto, um sinalizador desta reação (68).

A IOF recomenda a utilização do CTX como marcador de reabsorção óssea (65). As limitações deste marcador são decorrentes da variação circadiana e consumo de alimentos, sendo ideal que seja realizado jejum noturno de pelo menos 8 horas antes da coleta. A concentração de CTX pós prandial pode ser 20% inferior se comparado com o estado de jejum. Adicionalmente, o

CTX é eliminado pelo rim, portanto, alterações no funcionamento renal também podem interferir nos resultados (65,67).

2.3.3 Nutrição e densidade mineral óssea

A dietoterapia é a base para o tratamento das GSDs, com intervenções como uso de doses diárias de amido de milho cru, dieta hiperproteica nos tipos III e IX e restrição de sacarose, frutose e lactose no tipo I (70,71). Tais intervenções potencialmente reduzem o consumo de nutrientes importantes para o metabolismo ósseo.

O consumo de nutrientes como cálcio, vitamina D, fósforo, potássio, magnésio, vitamina K, consumo de frutas, legumes, verduras, grãos integrais, nozes, peixe e azeite tem efeito benéfico no tecido ósseo, reduzindo o risco de fratura. Já uma alimentação baseada em alto consumo de carne vermelha, grãos e cereais refinados, ácidos graxos saturados e refrigerantes, acarreta em maior risco de baixa DMO e de fraturas. Tais alimentos agem no metabolismo do cálcio, previnem a redução da ação dos osteoclastos, da formação da matriz óssea, participam da modulação do equilíbrio ácido base do nosso organismo, possuem capacidade antioxidante e diminuem a concentração de homocisteína (72).

Durante a infância e adolescência ocorre o acúmulo de massa óssea, a carga genética determina até 80% da variação da DMO, no entanto, alimentação, prática de exercícios físicos, peso e composição corporal e hormonal também afetam este processo. Cálcio, vitamina D e proteína são os nutrientes mais importantes durante as duas primeiras décadas de vida, quando ocorre o pico de formação de massa óssea (46).

Elencaremos a seguir os nutrientes chave no metabolismo ósseo, o mecanismo envolvido e suas principais fontes.

Proteína: A proteína participa da formação da matriz óssea, fornecendo 50% do volume e 1/3 da massa óssea em adultos (73). Além disso, os aminoácidos também contribuem para a manutenção da massa óssea através do estímulo de absorção de cálcio no intestino, aumentando o IGF-1 circulante, estimulando a formação óssea pelos osteoblastos e reduzindo a reabsorção pelos osteoclastos (74). Os aminoácidos do colágeno ósseo, utilizados no processo metabólico e de manutenção óssea, não podem ser reutilizados, desta forma, é imprescindível um aporte diário adequado de proteína para a manutenção deste tecido (75). Diversos estudos têm associado o consumo proteico adequado a uma melhora na DMO (76–78). No entanto, alguns estudos ainda sugerem que o consumo excessivo de proteína resultem em perda óssea pelo aumento da excreção

e balanço negativo de cálcio mediante dietas hiperproteicas. Fontes proteicas consistem em alimentos de origem animal, carnes, ovos e lácteos, além de leguminosas (75). Para pessoas saudáveis e com GSD tipo I, a recomendação de proteína é de 10 a 15% da necessidade energética diária (NED) (71,79), no tipo III de 20 a 30% da NED (31) e 20 a 25% no tipo IX (40).

Cálcio: Mais de 99% do cálcio do organismo humano encontra-se armazenado nos ossos, ele tem funções na coagulação sanguínea, no sistema cardiovascular e é responsável pela DMO. O cálcio, juntamente com a vitamina D, formam os cristais de hidroxiapatita, os quais compõem a matriz mineral óssea. Desta forma, é necessário um bom aporte destes nutrientes, pois, baixas concentrações séricas de cálcio estimulam a liberação deste mineral pelos ossos, desencadeando reabsorção do tecido ósseo (73,80). O consumo adequado de cálcio na infância e adolescência é indispensável para atingir o pico de massa óssea, além de reduzir as perdas ósseas associadas ao envelhecimento (81). As maiores fontes de cálcio da dieta são os laticínios (leite, queijo, iogurte), vegetais verdes escuros, frutas e sementes, além de peixes (80). A recomendação de cálcio varia de acordo com a faixa etária: crianças de 1-3 anos: 500 mg; 4-8 anos: 800 mg; 9 – 18 anos: 1300 mg e 19 – 30 anos: 1000 mg (79).

Fósforo: O armazenamento do fósforo também se dá, principalmente, nos ossos, cerca de 80 a 90%. Este mineral também tem ligação com a perda mineral óssea, já que sua ingestão insuficiente e desproporcional às quantidades de cálcio, causa a reabsorção e inibe a formação óssea. Já o excesso, diante de uma ingestão insuficiente de cálcio, aumenta a excreção de paratormônio (PTH), causando a perda da massa óssea. Boas fontes de fósforo são encontradas em carnes, lácteos, oleaginosas, ovos e leguminosas (73). Recomendação de ingestão diária: 1-3 anos: 460 mg; 4-8 anos: 500 mg; 9 – 18 anos: 1250 mg e 19 – 30 anos: 700 mg (79).

Potássio: O potássio atua reduzindo a excreção renal de cálcio, por meio da manutenção da carga ácida no organismo, o que reduz também a retirada de cálcio do tecido ósseo. Tendo também efeitos na redução de biomarcadores de reabsorção óssea. Encontramos potássio em alimentos como a beterraba, batata doce, tomate, aveia, abacate, banana, uva passa (80). Ingesta diária recomendada: 1-3 anos: 3,0g; 4-8 anos: 3,8g; 9 – 13 anos: 4,5g; 14 – 30 anos: 4,7g (79).

Magnésio: Cerca de 50 a 60% do magnésio encontra-se acumulado no tecido ósseo, os íons de magnésio ligam-se aos cristais de hidroxiapatita, tendo influência na formação e tamanho dos cristais. Outra função importante deste mineral é a indução da proliferação de osteoblastos, células responsáveis pela formação óssea. Magnésio também tem efeitos nas concentrações de vitamina D, já que a maioria das enzimas envolvidas no metabolismo da vitamina necessitam de magnésio para sua ativação. Ele atua na troca de íons de cálcio e potássio nas membranas celulares e tem funções na contração muscular e atividade neuronal (80). A relação direta entre magnésio e saúde

óssea se dá através da sua deficiência, que causa diminuição da atividade dos osteoblastos e osteoclastos, disfunção na produção de PTH e aumento da liberação de cálcio do tecido ósseo (73,82). Fontes de magnésio são alimentos integrais, vegetais folhosos, legumes e nozes (80). Recomendação diária: 1- 3 anos: 80 mg; 4 - 8 anos: 130 mg; 9 – 13 anos: 240 mg; 14 – 18 anos: homens: 410 mg, mulheres: 360 mg; e 19 – 30 anos: homens: 400 mg, mulheres: 310 mg (79).

Vitamina D: A vitamina D regula a homeostase de cálcio, atuando de forma direta e indiretamente no osso, e está envolvida na manutenção da força e massa muscular. Ela determina a adequada concentração sérica de cálcio, regula sua absorção no trato gastrointestinal, reduz a síntese de PTH e a reabsorção de fosfato no osso, além de atuar na diferenciação dos osteoblastos (73,80). A deficiência de vitamina D causa mineralização óssea inadequada nas crianças, desencadeando raquitismo; nos adultos ocorre um defeito na mineralização do tecido ósseo, causando osteomalácia. A hipovitaminose D pode aumentar indiretamente a mobilização de cálcio do osso por meio do hiperparatireoidismo, causado por sua insuficiência (81). Cerca de 80 a 90% da vitamina D é obtida pela síntese cutânea diante da exposição solar. O restante é provindo do consumo de alimentos fonte, como peixes oleaginosos, cogumelos e produtos lácteos fortificados (80). Recomendação de ingestão diária: 1 - 30 anos: 5 µg (79).

Vitamina B12: A cobalamina, ou vitamina B12 está envolvida na metilação da homocisteína em metionina, sua deficiência causa hiperhomocisteinemia, que está associada à baixa DMO, osteoporose e risco de fraturas. Fontes alimentares: peixes, carnes, ovos, frutos do mar e lácteos (73,83). Recomendação diária: 1- 3 anos: 0,9 µg; 4 - 8 anos: 1,2 µg; 9 – 13 anos: 1,8 µg; 14 – 30 anos: 2,4 µg (79).

Vitamina K: Tem funções durante a formação e mineralização da matriz óssea. Ela atua como um co-fator, facilitando a conversão dos resíduos de glutamyl em γ -carboxiglutamyl (GLA) na osteocalcina, além de sua influência em diversas proteínas dependentes de vitamina K. As principais fontes de vitamina K são os vegetais verde escuros (80). Recomendação: 1- 3 anos: 30µg; 4 - 8 anos: 55 µg; 9 – 13 anos: 60 µg; 14 – 18 anos: 75 µg; 19 - 30 anos: homens:120 µg, mulheres: 90 µg (79).

3. MARCO CONCEITUAL

Nas GSDs hepáticas, o defeito ou deficiência na atividade das enzimas específicas em cada tipo, ocasionam sintomas distintos, os mais comuns são a hepatomegalia, hipoglicemia e atraso no desenvolvimento. No entanto, pacientes com baixa adesão à dieta, mau controle metabólico, podem apresentar baixa DMO, fratura óssea recorrente, osteopenia e osteoporose. Porém, com o

tratamento adequado, é possível um melhor controle metabólico, diminuindo os sintomas, melhorando o quadro clínico e prevenindo comorbidades. Figura 6.

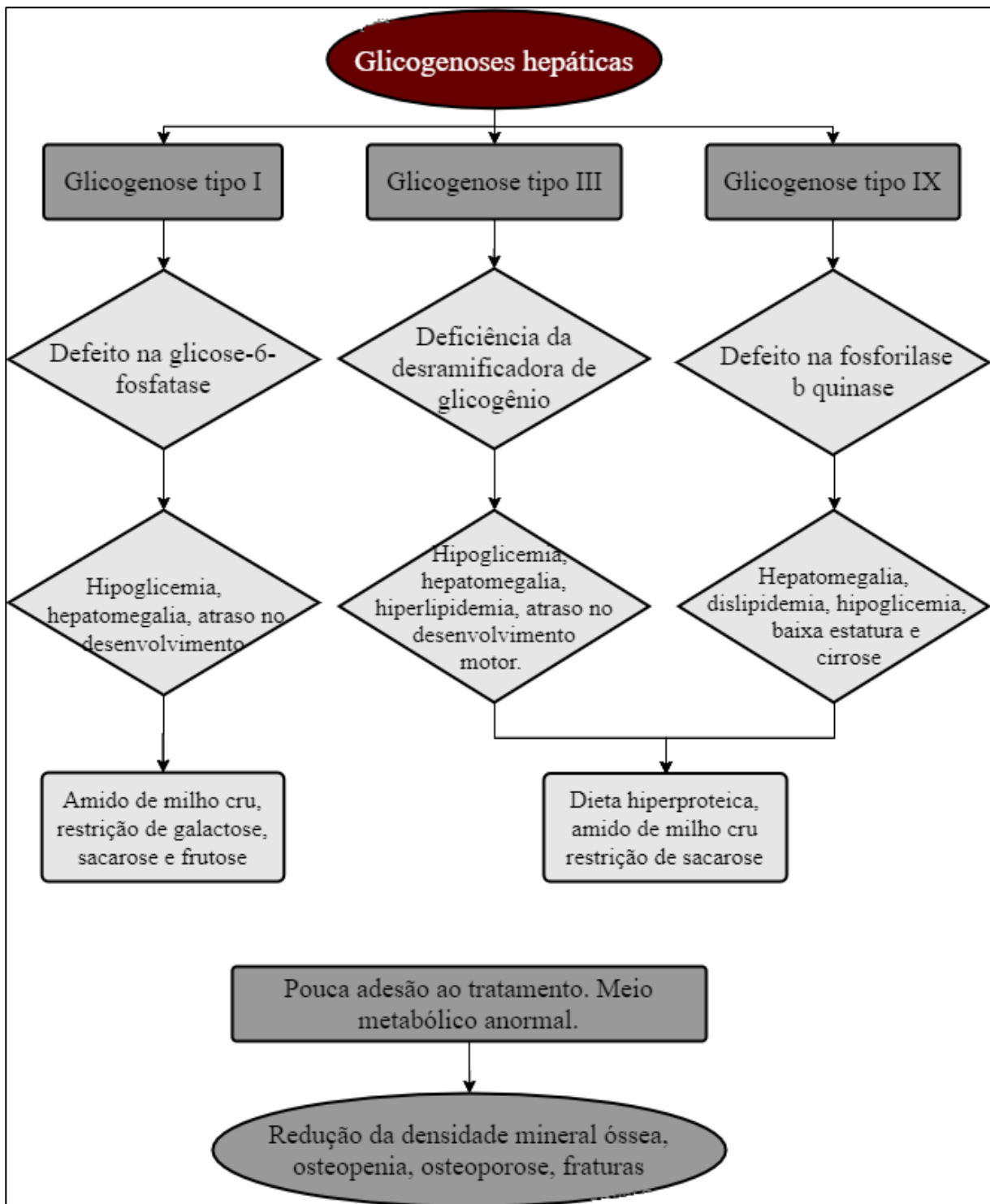


Figura 6 - Marco conceitual das glicogenoses hepáticas e densidade mineral óssea

Fonte: Referências 10,15,18,19,31,32,40

4. JUSTIFICATIVA

As complicações decorrentes das GSDs hepáticas são frequentes e afetam consideravelmente a qualidade de vida dos pacientes. As pesquisas em diagnóstico e tratamento demonstram avanços clínicos, reduzindo a morbidade e mortalidade nas GSDs. Porém, ainda existem muitas lacunas em relação ao desenvolvimento de complicações e comorbidades, como por exemplo a baixa DMO em pacientes com GSDs hepáticas.

Alguns estudos sugerem que pacientes diagnosticados com GSD hepática tem maior risco de fraturas e maior predisposição a baixa densidade mineral óssea, a qual parece estar associada ao mau controle metabólico, porém, estes achados são pouco explorados na literatura, sendo necessário uma melhor exploração da fisiopatologia da baixa DMO nas GSDs hepáticas.

O Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM/HCPA) é um centro nacional para tratamento e diagnóstico de GSD e é referência na área para o país e para a América Latina. Pacientes de todas as regiões do país são atendidos ambulatorialmente. No SGM/HCPA os EIM, incluindo as GSDs hepáticas, são acompanhados por uma equipe multidisciplinar com ampla experiência no tratamento desta condição. Tratando-se de uma doença rara, o SGM/HCPA possui uma amostra significativa de pacientes com GSD, contabilizando aproximadamente 40 pacientes.

Esta pesquisa almeja uma melhor compreensão das GSD hepáticas, contribuindo para melhorias na prática clínica e, conseqüentemente, na qualidade de vida dos pacientes.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo primário

Analisar a densidade mineral óssea e a concentração dos marcadores de remodelação óssea de uma amostra de pacientes brasileiros com glicogenoses hepáticas.

5.2 Objetivo secundário

- 1) Investigar a associação da densidade mineral óssea com achados clínicos e bioquímicos, de tratamento em pacientes com glicogenoses hepáticas;
- 2) Estudar a associação da densidade mineral óssea e o controle metabólico e nutricional nas glicogenoses;
- 3) Avaliar a associação entre a densidade mineral óssea e os níveis de osteocalcina, propeptídeo N-terminal do procolágeno de tipo 1 e telopeptídeo C-terminal do colágeno 1 em pacientes com glicogenoses hepáticas;

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fukao T, Nakamura K. Advances in inborn errors of metabolism. *J Hum Genet* [Internet]. 2019;64(2):65. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s10038-018-0535-7>
2. Ezgu F. Inborn Errors of Metabolism [Internet]. 1^o ed. Vol. 73, *Advances in Clinical Chemistry*. Elsevier Inc.; 2016. 195–250 p. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.acc.2015.12.001>
3. El-Hattab AW. Inborn Errors of Metabolism. *Clin Perinatol* [Internet]. 2015;42(2):413–39. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clp.2015.02.010>
4. Ferreira CR, van Karnebeek CDM. Inborn errors of metabolism [Internet]. 1^o ed. Vol. 162, *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V.; 2019. 449–481 p. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-64029-1.00022-9>
5. Chen MA, Weinstein DA. Glycogen storage diseases: Diagnosis, treatment and outcome. *Transl Sci Rare Dis*. 2014;1:45–72.
6. Wolfsdorf JI, Holm IA, Weinstein DA. Glycogen storage diseases: Phenotypic, genetic, and biochemical characteristics, and therapy. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1999;28(4):801–23.
7. Weinstein DA, Steuerwald U, Souza CFM De, Derks TGJ. Inborn Errors of Metabolism with Hypoglycemia Glycogen Storage Diseases and Inherited Disorders of Gluconeogenesis. 2018;65:247–65.
8. Özen H, Bayraktar Y. Glycogen storage diseases: New perspectives Professor, Series Editor. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2007;13(18):2541–53. Available at: www.wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com/1007-9327/13/2541.asp>
9. Oterdoom LH, Verweij KE, Biermann K, Langeveld M, van Buuren HR. Hepatocellular adenomas and carcinoma in asymptomatic, non-cirrhotic type III glycogen storage disease. *J Gastrointest Liver Dis*. 2015;24(4):515–8.
10. Ross KM, Ferrecchia IA, Dahlberg KR, Damska M, Ryan PT, Weinstein DA. Dietary Management of the Glycogen Storage Diseases : Evolution of Treatment and Ongoing Controversies. *Adv Nutr* [Internet]. 2020;11(2):439–46. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31665208/>
11. Burda P, Hochuli M. Hepatic glycogen storage disorders. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2015;18(4):415–21.
12. Kanungo S, Wells K, Tribett T, El-Gharbawy A. Glycogen metabolism and glycogen storage disorders. *Ann Transl Med*. 2018;6(24):474–474.

13. Steunenberg TAH, Peeks F, Hoogeveen IJ, Mitchell JJ, Mundy H, de Boer F, et al. Safety issues associated with dietary management in patients with hepatic glycogen storage disease. *Mol Genet Metab* [Internet]. 2018;125(1–2):79–85. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.07.004>
14. Cabrera-Abreu J, Rabtree NJC, Lias EE, Raser WF, Ramb RC. Bone mineral density and markers of bone turnover in patients with glycogen storage disease types I , III and IX. *J Inherit MetabDis*. 2004;27:1–10.
15. Kaiser N, Gautschi M, Bosanska L, Baumgartner MR, Spinass GA. Glycemic control and complications in glycogen storage disease type I: Results from the Swiss registry. *Mol Genet Metab* [Internet]. 2019; Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2019.02.008>
16. Mundy HR, Williams JE, Lee PJ, Fewtrell MS. Reduction in bone mineral density in glycogenosis type III may be due to a mixed muscle and bone deficit. *J Inherit Metab Dis*. 2008;31(3):418–23.
17. Rake JP, Rake JP, Visser G, Huismans D, Huitema S, Van Der Veer E, et al. Bone mineral density in children, adolescents and adults with glycogen storage disease type Ia: A cross-sectional and longitudinal study. *J Inherit Metab Dis* [Internet]. 2003;26(4):371–84. Available at: <http://link.springer.com/10.1023/A:1025111220095>
18. Melis D, Rossi A, Pivonello R, Del Puente A, Pivonello C, Cangemi G, et al. Reduced bone mineral density in glycogen storage disease type III: Evidence for a possible connection between metabolic imbalance and bone homeostasis. *Bone* [Internet]. 2016;86:79–85. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2016.02.012>
19. Melis D, Pivonello R, Cozzolino M, Della Casa R, Balivo F, Del Puente A, et al. Impaired bone metabolism in glycogen storage disease type 1 is associated with poor metabolic control in type 1a and with granulocyte colony-stimulating factor therapy in type 1b. *Horm Res Paediatr*. 2014;81(1):55–62.
20. Berg LEM Van Den, Zandbergen AA, Capelle CI Van, Vries JM De, Hop WC, Hout JM Van Den, et al. Low bone mass in Pompe disease Muscular strength as a predictor of bone mineral density. *Bone* [Internet]. 2010;47(3):643–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2010.06.021>
21. Stone WL, Basit H, Adil A. Glycogen Storage Disease. *StatPearls* [Internet]. 2020.
22. Damska M, Labrador EB, Kuo CL, Weinstein DA. Prevention of complications in glycogen storage disease type Ia with optimization of metabolic control. *Pediatr Diabetes*. 2017;18(5):327–31.
23. Wolfsdorf JI. Bones benefit from better biochemical control in type 1 glycogen storage

- disease. *J Pediatr*. 2002;141(3):308–10.
24. Derks TGJ, van Rijn M. Lipids in hepatic glycogen storage diseases: pathophysiology, monitoring of dietary management and future directions. *J Inher Metab Dis*. 2015;38(3):537–43.
 25. Hendriksz; Gissen CP. Glycogen Storage Diseases. *Paediatr Child Health (Oxford)* [Internet]. 2014;25(3):139–44. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.paed.2014.10.007>
 26. Chen S-Y, Pan C-J, Nandigama K, Mansfield BC, Ambudkar S V., Chou JY. The glucose-6-phosphate transporter is a phosphate-linked antiporter deficient in glycogen storage disease type Ib and Ic. *FASEB J*. 2008;22(7):2206–13.
 27. Saudubray JM, Van Den Berghe G, Walter JH. Preface to the 5th edition. *Inborn Metab Dis Diagnosis Treat*. 2012;5.
 28. Minarich LA, Kirpich A, Fiske LM, Weinstein DA. Bone mineral density in glycogen storage disease type Ia and Ib. *Genet Med*. 2012;14(8):737–41.
 29. Henrique F, Nunes S. Doença de von Gierke: estudo de revisão Von Gierke disease: revision study *Revisões em Pediatria*. 2009;21–8.
 30. Ross K. General Nutrition Guidelines for Glycogen Storage Disease Type I. University of Florida Glycogen Storage Dis Progr [Internet]. Available at: <https://ufhealth.org/sites/default/files/media/GSD/General-Nutrition-Guidelines-for-Glycogen-Storage-Disease-Type-I.pdf>
 31. Kishnani PS, Austin SL, Arn P, Bali DS, Boney A, Case LE, et al. Glycogen Storage Disease Type III diagnosis and management guidelines. *Genet Med*. 2010;12(7):446–63.
 32. Dagli AI, Sentner CP, Weinstein DA. Glycogen storage disease type III. *Gene Rev*. 2016;1–16.
 33. Lim JA, Choi SJ, Gao F, Kishnani PS, Sun B. A Novel Gene Therapy Approach for GSD III Using an AAV Vector Encoding a Bacterial Glycogen Debranching Enzyme. *Mol Ther - Methods Clin Dev* [Internet]. 2020;18(September):240–9. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.05.034>
 34. Dagli AI, Sentner CP, Weinstein DA. Doença do Armazenamento de Glicogênio Tipo III Resumo. 2018;1–15.
 35. Hobson-Webb LD, Austin SL, Bali DS, Kishnani PS. The electrodiagnostic characteristics of Glycogen Storage Disease Type III. *Genet Med*. 2010;12(7):440–5.
 36. Shi WQ, Liu J, Cao Y, Zhu YY, Guan K, Chen YM. Association of dietary and serum Vitamin E with bone mineral density in middle-aged and elderly Chinese adults: A cross-sectional study. *Br J Nutr*. 2016;115(1):113–20.

37. Hensley N, Dietrich J, Nyhan D, Mitter N, Yee MS, Brady MB. Hypertrophic cardiomyopathy: A review. *Anesth Analg*. 2015;120(3):554–69.
38. Ross KM, Ferrecchia IA, Dahlberg KR, Damska M, Ryan PT, Weinstein DA. Dietary Management of the Glycogen Storage Diseases: Evolution of Treatment and Ongoing Controversies. *Adv Nutr*. 2020;11(2):439–46.
39. Beauchamp NJ, Dalton A, Ramaswami U, Niinikoski H, Mention K, Kenny P, et al. Glycogen storage disease type IX: High variability in clinical phenotype. *Mol Genet Metab*. 2007;92(1–2):88–99.
40. Kishnani PS, Goldstein J, Austin SL, Arn P, Bachrach B, Bali DS, et al. Diagnosis and management of glycogen storage diseases type VI and IX: a clinical practice resource of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med*. 2019;0(0).
41. Schwahn B, Rauch F, Wendel U, Schönau E. Low bone mass in glycogen storage disease type 1 is associated with reduced muscle force and poor metabolic control. *J Pediatr*. 2002;141(3):350–6.
42. Bhattacharya K. Investigation and management of the hepatic glycogen storage diseases. *Transl Pediatr* [Internet]. 2015;4(3):240–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26835382><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4729058>
43. Alexander RT, Cordat E, Chambrey R, Dimke H, Eladari D. Acidosis and urinary calcium excretion: Insights from genetic disorders. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(12):3511–20.
44. Blaine J, Chonchol M, Levi M. Renal control of calcium, phosphate, and magnesium homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(7):1257–72.
45. Raphael KL. Metabolic acidosis and cardiovascular disease risk in CKD. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2018;29:376–82.
46. Mitchell PJ, Cooper C, Dawson-Hughes B, Gordon CM, Rizzoli R. Life-course approach to nutrition. *Osteoporos Int*. 2015;26(12):2723–42.
47. Morgan EF, Barnes GL, Einhorn TA. The Bone Organ System : Form and Function [Internet]. Fourth Edi. Osteoporosis. Elsevier; 2013. 3–20 p. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-415853-5.00001-7>
48. Osterhoff G, Morgan EF, Shefelbine SJ, Karim L, McNamara LM, Augat P. Bone mechanical properties and changes with osteoporosis *Georg. Physiol Behav*. 2016;47(2):11–20.
49. Shahi M, Peymani A, Sahmani M. Regulation of Bone Metabolism. *Biochem Mol Biol*.

- 2017;5(2):73–82.
50. Camargos BM. Expressão de ativina A em células-tronco embrionárias de camundongo durante o processo de diferenciação em osteoblastos. 2013.
 51. Appelman-Dijkstra NM, Papapoulos SE. Modulating Bone Resorption and Bone Formation in Opposite Directions in the Treatment of Postmenopausal Osteoporosis. *Drugs*. 2015;75(10):1049–58.
 52. Sale C, Elliott-Sale KJ. Nutrition and Athlete Bone Health. *Sport Med* [Internet]. 2019;49(s2):139–51. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40279-019-01161-2>
 53. Sozen T, Ozisik L, Calik Basaran N. An overview and management of osteoporosis. *Eur J Rheumatol*. 2017;4(1):46–56.
 54. Varacallo M, Seaman T, Jandu J. Osteopenia. *StatPearls* [Internet]. 2020.
 55. Iorgi N Di, Maruca K, Patti G, Mora S. Update on bone density measurements and their interpretation in children and adolescents. *Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2018;32(4):477–98. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.beem.2018.06.002>
 56. Dimai HP. Use of dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) for diagnosis and fracture risk assessment; WHO-criteria, T- and Z-score, and reference databases. *Bone* [Internet]. 2016;104:39–43. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2016.12.016>
 57. Certified Bone Densitometry Technologist (CBDT®) - ISCD [Internet]. ISCD. Available at: <https://iscd.org/certify/certification/certified-bone-densitometry-technologist-cbdt/>
 58. Carey JJ, Delaney MF, Love TE, Richmond BJ, Cromer BA, Miller PD, et al. DXA-Generated Z-Scores and T-Scores May Differ Substantially and Significantly in Young Adults. *J Clin Densitom*. 2007;10(4):351–8.
 59. Lewiecki EM, Binkley N, Morgan SL, Shuhart CR, Camargos BM, Carey JJ, et al. Best Practices for Dual-Energy X-ray Absorptiometry Measurement and Reporting : International Society for Clinical Densitometry Guidance. *J Clin Densitom* [Internet]. 2016;19(2):127–40. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jocd.2016.03.003>
 60. ISCD. Official Positions Pediatric ISCD 2019. *Psychol Appl to Work An Introd to Ind Organ Psychol Tenth Ed Paul*. 2019;
 61. ISCD. Official Positions Adult ISCD 2019. *Psychol Appl to Work An Introd to Ind Organ Psychol Tenth Ed Paul* [Internet]. 2019; Available at: <https://iscd.app.box.com/s/5r713cfzvf4gr28q7zdccg2i7169fv86>
 62. Morris HA, Eastell R, Jorgensen NR, Cavalier E, Vasikaran S, Chubb SAP, et al. *Clinica Chimica Acta* Clinical usefulness of bone turnover marker concentrations in osteoporosis. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2017;467:34–41. Available at:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2016.06.036>

63. Hlaing TT, Compston JE. Biochemical markers of bone turnover - uses and limitations. *Ann Clin Biochem.* 2014;51(2):189–202.
64. Younes M, Hachfi H, Neffati FH, Zrour S, Ismail B, Touzi M, et al. Intérêt des marqueurs du remodelage osseux dans le diagnostic de l'ostéoporose et la prédiction du risque de fracture. *La Sociétié Tunisienne des Sci Médicales.* 2014;92(05):304–10.
65. Shetty S, Kapoor N, Bondu JD, Thomas N, Paul TV. Bone turnover markers : Emerging tool in the management of osteoporosis. 2016;20(6):846–52.
66. Wu C, Chang Y, Chen C, Reid I, Tsai K, Lewiecki EM, et al. Consensus Statement on the Use of Bone Turnover Markers for Short-Term Monitoring of Osteoporosis Treatment in the Asia- Pacific Region. *J ofClinical Densitom Assess Manag ofMusculoskeletal Heal.* 2019;0:1–11.
67. Lorentzon M, Branco J, Luisa M, Cyrus C, Bernard C, Serge AD, et al. Algorithm for the Use of Biochemical Markers of Bone Turnover in the Diagnosis , Assessment and Follow-Up of Treatment for Osteoporosis. *Adv Ther.* 2019;36:2811–24.
68. Naylor K, Eastell R. Bone turnover markers : use in osteoporosis. *Nat Rev Rheumatol.* 2012;8(July):379–89.
69. Imbeloni AA. Análise dos marcadores bioquímicos no metabolismo ósseo de *Chlorocebus aethiops* mantidos em cativeiro. 2015;
70. Kishnani PS, Goldstein J, Austin SL, Arn P, Bachrach B, Bali DS, et al. Diagnosis and management of glycogen storage diseases type VI and IX: a clinical practice resource of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med.* 2019;21(4):772–89.
71. Kishnani PS, Austin SL, Abdenur JE, Arn P, Bali DS, Boney A, et al. Diagnosis and management of glycogen storage disease type I: A practice guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med.* 2014;16(11):1–29.
72. Denova-Gutiérrez E, Méndez-Sánchez L, Muñoz-Aguirre P, Tucker KL, Clark P. Dietary patterns, bone mineral density, and risk of fractures: A systematic review and meta-analysis. *Nutrients.* 2018;10(12).
73. Ratajczak AE, Rychter AM, Zawada A, Dobrowolska A, Krela-Kaźmierczak I. Nutrients in the prevention of osteoporosis in patients with inflammatory bowel diseases. *Nutrients.* 2020;12(6):1–18.
74. En- C. Bone health and nutrition: Introduction to the special issue. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;410:1–2.

75. Kim YS, Paik IY, Rhie YJ, Suh SH. Integrative physiology: Defined novel metabolic roles of osteocalcin. *J Korean Med Sci.* 2010;25(7):985–91.
76. Isanejad M, Sirola J, Mursu J, Kröger H, Tuppurainen M, Erkkilä AT. Association of protein intake with bone mineral density and bone mineral content among elderly women: The OSTPRE fracture prevention study. *J Nutr Heal Aging.* 2017;21(6):622–30.
77. Cauley JA, Cawthon PM, Peters K, Cummings S, Ensrud K, Lee DSH, et al. Risk Factors for Hip Fracture in Older Men: The Osteoporotic Fractures in Men Study (MrOS). *J Bone Min Res.* 2016;31(10):1810–9.
78. Kim J, Kim B, Lee H, Choi H, Won C. The relationship between prevalence of osteoporosis and proportion of daily protein intake. *Korean J Fam Med.* 2013;34(1):43–8.
79. Padovani RM, Amaya-Farfán J, Colugnati FAB, Domene SMÁ. Dietary reference intakes: Application of tables in nutritional studies. *Rev Nutr.* 2006;19(6):741–60.
80. Muñoz-garach A, García-fontana B, Muñoz-torres M. Nutrients and dietary patterns related to osteoporosis. *Nutrients.* 2020;12(7):1–15.
81. Cashman KD. Diet , Nutrition , and Bone Health. *J Nutr.* 2007;137:2507–12.
82. Veronese N, Stubbs B, Solmi M, Noale M, Vaona A, Demurtas J, et al. Dietary magnesium intake and fracture risk: Data from a large prospective study. *Br J Nutr.* 2017;117(11):1570–6.
83. Van Wijngaarden JP, Doets EL, Szczecińska A, Souverein OW, Duffy ME, Dullemeijer C, et al. Vitamin B12, folate, homocysteine, and bone health in adults and elderly people: A systematic review with meta-analyses. *J Nutr Metab.* 2013;2013.
84. Chou, Janice Y., Jun, Hyun Sik, Mansfield BC. Glycogen storage disease type I and G6Pase-B deficiency: etiology and therapy. *Nat Rev Endocrinol.* 2010;6(12):676–88.
85. Sentner CP, Hoogeveen IJ, Weinstein DA, Santer R, Murphy E, McKiernan PJ, et al. Glycogen storage disease type III: diagnosis, genotype, management, clinical course and outcome. *J Inherit Metab Dis [Internet].* 2016;39(5):697–704. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s10545-016-9932-2>
86. Minarich LA, Kirpich A, Fiske LM, David A, Program SD. Bone mineral density in glycogen storage disease type Ia and Ib. *Genet Med.* 2014;14(8):737–41.
87. Castro MJ de, Lamas C de, Sánchez-Pintos P, González-Lamuño D, Couce ML. Bone Status in Patients with Phenylketonuria : *Nutrients.* 2020;12(2154):1–15.
88. Shetty S, Kapoor N, Bondu JD, Thomas N, Paul TV. Review Article Bone turnover markers : Emerging tool in the management of osteoporosis. *J Endocrinol Metab.* 2016;20:846–52.

89. Greenblatt MB, Tsai JN, Wein MN. Review Bone Turnover Markers in the Diagnosis and Monitoring of Metabolic Bone Disease CONTENT : SUMMARY : Clin Chem. 2017;63(2):464–74.
90. WMA. Declaração de Helsinki VI. Vol. 7, Jornal Brasileiro de Reproducao Assistida. 2003. p. 29–32.
91. Bayer M. Reference values of osteocalcin and procollagen type I N-propeptide plasma levels in a healthy Central European population aged 0-18 years. Osteoporos Int. 2014;25(2):729–36.
92. Wyness SP, Roberts WL, Straseski JA. Pediatric reference intervals for four serum bone markers using two automated immunoassays. Clin Chim Acta. 2013;415:169–72.
93. Okechuku GO, Shoemaker LR, Dambaska M, Brown LM, Mathew J, Weinstein DA. Tight metabolic control plus ACE inhibitor therapy improves GSD I nephropathy. J Inherit Metab Dis. 2017;40(5):703–8.
94. Melis D, Cozzolino M, Minopoli G, Balivo F, Parini R, Rigoldi M, et al. Progression of renal damage in glycogen storage disease type i is associated to hyperlipidemia: A multicenter prospective Italian study. J Pediatr [Internet]. 2015;166(4):1079–82. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2014.12.015>
95. World Health Organization. Physical Status: The Use and Interpretation of Anthropometry. Geneva, Switzerland: Report of a WHO Expert Committee.; 1995.
96. World Health Organization. WHO Child Growth Standards: Methods and Development: Length/Height-for-Age, Weight-for- Age, Weight-for-Length, Weight-for-Height and Body Mass Index-for-Age. WHO. 2006;
97. Dai Z, Wang R, Ang L-W, Yuan J-M, Koh W-P. Bone turnover biomarkers and risk of osteoporotic hip fracture in an Asian population. Bone. 2016;83:171–7.
98. Soltani S, Hunter GR, Kazemi A, Shab-Bidar S. The effects of weight loss approaches on bone mineral density in adults: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Osteoporos Int [Internet]. 2016;27(9):2655–71. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s00198-016-3617-4>
99. Leeuwen J van, Koes BW, Paulis WD, van Middelkoop M. Differences in bone mineral density between normal-weight children and children with overweight and obesity: a systematic review and meta-analysis. Obes Rev. 2017;18(5):526–46.
100. Qiao D, Li Y, Liu X, Zhang X, Qian X, Zhang H, et al. Association of obesity with bone mineral density and osteoporosis in adults: a systematic review and meta-analysis. Public Health. 2020;180:22–8.

101. Yu C, Wang S, Meng X, Li W, Deng Y, Li N, et al. The impact of height on low/reduced bone mineral density in Chinese adolescents aged 12-14 years old: gender differences. *Arch Osteoporos*. 2019;14(1):2–7.
102. Nilsen OA, Ahmed LA, Winther A, Christoffersen T, Thrane G, Evensen E, et al. Body Weight and Body Mass Index Influence Bone Mineral Density in Late Adolescence in a Two-Year Follow-Up Study. *The Tromsø Study: Fit Futures. JBMR Plus*. 2019;3(9):e10195.
103. Rowe P, Koller A, Sharma S, Hospital MF. *Physiology , Bone Remodeling. StatPearls [Internet]*. 2020. 1–14 p.
104. Fintini D, Cianfarani S, Cofini M, Andreoletti A, Ubertini GM, Cappa M, et al. The Bones of Children With Obesity. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11(April):1–16.
105. Ferron M, Lacombe J. Regulation of energy metabolism by the skeleton: Osteocalcin and beyond. *Arch Biochem Biophys [Internet]*. 2014;561:137–46. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2014.05.022>
106. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, et al. Endocrine Regulation of Energy Metabolism by the Skeleton. *Cell*. 2007;130(3):456–69.
107. Harper C, Pattinson AL, Fernando HA, Zibellini J, Seimon R V., Sainsbury A. Effects of obesity treatments on bone mineral density, bone turnover and fracture risk in adults with overweight or obesity. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2016;28(3):133–49.
108. Zibellini J, Seimon R V., Lee CM, Gibson AA, Hsu MS, Shapses SA, et al. Does Diet-Induced Weight Loss Lead to Bone Loss in Overweight or Obese Adults? A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials. *J Bone Miner Res*. 2015;30(12):2168–78.
109. Hinton PS, Rector RS, Thomas TR. Weight-bearing, aerobic exercise increases markers of bone formation during short-term weight loss in overweight and obese men and women. *Metabolism*. 2006;55(12):1616–8.
110. De Luis DA, Perez Castrillon JL, Aller R, Izaola O, Bachiller C. Response of osteocalcin and insulin resistance after a hypocaloric diet in obese patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(12):2174–9.
111. Lucey AJ, Paschos GK, Cashman KD, Martínez JA, Thorsdottir I, Kiely M. Influence of moderate energy restriction and seafood consumption on bone turnover in overweight young adults. *Am J Clin Nutr*. 2008;87(4):1045–52.
112. FAO. *Dietary Assessment: A resource guide to method selection and application in low resource settings*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2018. 367–375 p.

113. Guan VX, Probst YC, Neale EP, Tapsell LC. Evaluation of the dietary intake data coding process in a clinical setting: Implications for research practice. *PLoS One*. 2019;14(8):1–18.
114. Weinstein DA, Somers MJG, Wolfsdorf JI. Decrease urinary citrate excretion in type 1a glycogen storage disease. *J Pediatr*. 2001;138(3):378–82.
115. Kim KM, Choi SH, Lim S, Moon JH, Kim JH, Kim SW, et al. Interactions between dietary calcium intake and bone mineral density or bone geometry in a low calcium intake population (KNHANES IV 2008-2010). *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(7):2409–17.
116. Karpouzou A, Diamantis E, Farmaki P, Savvanis S, Troupis T. Nutritional Aspects of Bone Health and Fracture Healing. *J Osteoporos*. 2017;2017.
117. Wang J, Wang Y, Gao W, Wang B, Zhao H, Zeng Y, et al. Diversity analysis of gut microbiota in osteoporosis and osteopenia patients. *PeerJ*. 2017;2017(6):1–14.
118. Weaver CM. Diet, Gut Microbiome, and Bone Health Gut Microbiome-a New Frontier? HHS Public Access. *Curr Osteoporos Rep*. 2015;13(2):125–30.
119. Li C, Huang Q, Yang R, Dai Y, Zeng Y, Tao L, et al. Gut microbiota composition and bone mineral loss—epidemiologic evidence from individuals in Wuhan, China. *Osteoporos Int*. 2019;30(5):1003–13.
120. McCabe L, Britton RA, Parameswaran N. Prebiotic and Probiotic Regulation of Bone Health: Role of the Intestine and its Microbiome Laura. *Curr Osteoporos Rep*. 2015;13(6):363–71.
121. Colonetti K, dos Santos BB, Nalin T, de Souza CFM, Triplett EW, Dobbler PT, et al. Hepatic glycogen storage diseases are associated to microbial dysbiosis. *PLoS One*. 2019;14(4):1–17.
122. Ceccarani C, Bassanini G, Montanari C, Casiraghi MC, Ottaviano E, Morace G, et al. Proteobacteria overgrowth and butyrate-producing taxa depletion in the gut microbiota of glycogen storage disease type 1 patients. *Metabolites*. 2020;10(4):1–16.
123. Palacios C. The role of nutrients in bone health, from A to Z. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2006;46(8):621–8.
124. Laird E, Ward M, McSorley E, Strain JJ, Wallace J. Vitamin D and bone health; Potential mechanisms. *Nutrients*. 2010;2(7):693–724.
125. Allen LH, Miller JW, De Groot L, Rosenberg IH, Smith AD, Refsum H, et al. Biomarkers of Nutrition for Development (BOND): Vitamin B-12 Review. *J Nutr*. 2018;148:1995S–2027S.
126. Meyer HE, Willett WC, Fung TT, Holvik K, Feskanich D. Association of High Intakes of

Vitamins B6 and B12 From Food and Supplements With Risk of Hip Fracture Among Postmenopausal Women in the Nurses' Health Study. *JAMA Netw open*. 2019;2(5):e193591.

7. ARTIGO

Comprovante de submissão do artigo à revista *Nutrients*

Journals Information Initiatives About
nutricionista.jesica@gmail.com My Profile Logout Submit

▼ User Menu

- Home
- Manage Accounts
- Change Password
- Edit Profile
- Logout

Manuscript Status

Incomplete submissions (0) | Under processing (2) | Website Online (0) | Rejected / Withdrawn (0)

Manuscript ID	Journal	Section / Special Issue	Title	Status	Submission Date
nutrients-1033780	Nutrients		Bone mineral density and biomarkers of bone turnover in patients with hepatic glycogen storage diseases	Pending review	2020-11-26 01:53:08

27/11/2020

Gmail - [Nutrients] Manuscript ID: nutrients-1033780 - Submission Received



Jésica Jacoby <nutricionista.jesica@gmail.com>

[Nutrients] Manuscript ID: nutrients-1033780 - Submission Received

1 mensagem

25 de novembro de 2020 21:53

Editorial Office <nutrients@mdpi.com>

Responder a: nutrients@mdpi.com

Para: Jésica Tamara Jacoby <nutricionista.jesica@gmail.com>

Cc: Bruna Bento dos Santos <bruna.bdsantos@hotmail.com>, Tatiéle Nalin <tatalinalin@gmail.com>, Karina Colonetti <karinacolonetthotmail.com>, Lilia Farret Refosco <lrefosco@hcpa.edu.br>, Carolina Fischinger Moura de Souza <cfsoouza@hcpa.edu.br>, Poli Mara Spritzer <spritzer@ufrgs.br>, Soraia Poloni <soraia.poloni@yahoo.com.br>, Roberta Hack Mendes <betamendeshack@gmail.com>, Ida Vanessa Doederlin Schwartz <ischwartz@hcpa.edu.br>

Dear Mrs. Jacoby,

Thank you very much for uploading the following manuscript to the MDPI submission system. One of our editors will be in touch with you soon.

Journal name: Nutrients

Manuscript ID: nutrients-1033780

Type of manuscript: Article

Title: Bone mineral density and biomarkers of bone turnover in patients with hepatic glycogen storage diseases

Authors: Jésica Tamara Jacoby *, Bruna Bento dos Santos, Tatiéle Nalin, Karina Colonetti, Lilia Farret Refosco, Carolina Fischinger Moura de Souza, Poli Mara Spritzer, Soraia Poloni, Roberta Hack Mendes, Ida Vanessa Doederlin Schwartz *

Received: 26 November 2020

E-mails: nutricionista.jesica@gmail.com, bruna.bdsantos@hotmail.com, tatalinalin@gmail.com, karinacolonetthotmail.com, lrefosco@hcpa.edu.br, cfsoouza@hcpa.edu.br, spritzer@ufrgs.br, soraia.poloni@yahoo.com.br, betamendeshack@gmail.com, ischwartz@hcpa.edu.br

You can follow progress of your manuscript at the following link (login required):

https://susy.mdpi.com/user/manuscripts/review_info/a8e48274446976fe43f8202778a1af56

The following points were confirmed during submission:

1. Nutrients is an open access journal with publishing fees of 2000 CHF for an accepted paper (see <https://www.mdpi.com/about/apc/> for details). This manuscript, if accepted, will be published under an open access Creative Commons CC BY license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), and I agree to pay the Article Processing Charges as described on the journal webpage (<https://www.mdpi.com/journal/nutrients/apc>). See <https://www.mdpi.com/about/openaccess> for more information about open access publishing.

Please note that you may be entitled to a discount if you have previously received a discount code or if your institute is participating in the MDPI Institutional Open Access Program (IOAP), for more information see <https://www.mdpi.com/about/ioap>. If you have been granted any other special discounts for your submission, please contact the Nutrients editorial office.

2. I understand that:

a. If previously published material is reproduced in my manuscript, I will provide proof that I have obtained the necessary copyright permission. (Please refer to the Rights & Permissions website: <https://www.mdpi.com/authors/rights>).

b. My manuscript is submitted on the understanding that it has not been published in or submitted to another peer-reviewed journal. Exceptions to this rule are papers containing material disclosed at conferences. I confirm that I will inform the journal editorial office if this is the case for my manuscript. I confirm that all authors are familiar with and agree with submission of the contents of the manuscript. The journal editorial office reserves the right to contact all authors to confirm this in case of doubt. I will provide email addresses for all authors and an institutional e-mail address for at least one of the co-authors, and specify the name, address and e-mail for invoicing purposes.

If you have any questions, please do not hesitate to contact the Nutrients editorial office at nutrients@mdpi.com

Kind regards,

Nutrients Editorial Office
St. Alban-Anlage 66, 4052 Basel, Switzerland
E-Mail: nutrients@mdpi.com
Tel. +41 61 683 77 34
Fax: +41 61 302 89 18

*** This is an automatically generated email ***

*Article***Bone Mineral Density and Biomarkers of Bone Turnover in Patients with Hepatic Glycogen Storage Diseases**

Jésica Tamara Jacoby^{1,*}, **Bruna Bento dos Santos**², **Tatiéle Nalin**³, **Karina Colonetti**^{2,3}, **Lília Farret Refosco**^{4,5}, **Carolina F. M. de Souza**^{4,5}, **Poli Mara Spritzer**⁶, **Soraia Poloni**³, **Roberta Hack Mendes**⁷ and **Ida Vanessa Doederlein Schwartz**^{1,2,4,5,8,*}

¹ Graduate Program in Medical Sciences: Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

² Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

³ Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences (BRAIN) Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

⁴ Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

⁵ Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

⁶ Gynecological Endocrinology Unit, Division of Endocrinology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Department of Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

⁷ University College Dublin School of Agriculture and Food Science, Dublin, Ireland

⁸ Nuclimed, Center for Clinical Research, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

* Correspondence: nutricionista.jesica@gmail.com (JTJ); ischwartz@hcpa.edu.br (IVDS); Tel.: +55 (51) 3359 8011; Fax +55 (51) 3359 8010

Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract: The association between bone mineral density (BMD) and hepatic glycogen storage diseases (GSDs) is still unclear. To evaluate the BMD of patients with GSD I, IIIa and IX α and their relationship with biomarkers of bone turnover, a cross-sectional study was performed including 23 patients (GSD Ia= 13, Ib= 5, IIIa= 2 and IX α = 3; median age= 11.9 years) who underwent a dual-energy X ray absorptiometry (DXA). Osteocalcin (OC, $n= 18$), procollagen type 1 N-terminal propeptide (P1NP, $n= 19$), collagen type 1 C-terminal telopeptide (CTX, $n= 18$) and 25-OH Vitamin D ($n= 23$) were also measured. The participants completed a 3-day food diary ($n= 20$). Information on additional biomarkers was extracted from medical records. Low BMD was defined as a Z-score <-2.0 . All participants were receiving uncooked cornstarch (median dosage= 6.3 g/kg/day) at inclusion, and 11 (47.8%) were adherent to treatment. Obesity was found in 10, and low BMD in 3 patients (GSD Ia= 1; IIIa= 2). Regarding bone turnover, six patients presented at least one biomarker increased (OC= 1, CTX= 2, P1NP= 6), of these, all had normal BMD. CTX, OC and P1NP correlated negatively with body weight. 25-OH Vitamin D concentration was decreased in 7 patients. Our data suggests that patients with hepatic GSDs may have low BMD, especially in the presence of muscular involvement and poor metabolic control. Systematic nutritional monitoring of these patients is essential.

Keywords: glycogenesis; bone mineral density; GSD; bone; osteocalcin; photon absorptiometry

1. Introduction

Glycogen storage diseases (GSDs) are characterized by abnormal storage or catabolism of glycogen due to the deficient activity of enzymes that catalyze glycogen synthesis or degradation [1]. Their incidence is approximately 1 in 20.000–43.000 live births worldwide. Approximately 80% of hepatic GSDs are of types I, III and IX [2]. GSD I is caused by deficient activity of glucose-6-phosphatase [3, 4]. GSD III results from a deficiency of glycogen debranching enzyme [5, 6], and it is classified in IIIa, which causes hypoglycemia and muscular compromise, and IIIb, which causes only with liver symptoms [7]. GSDIX α , caused by pathogenic variations in the *PHKA2* gene, results from the absence of liver- α subunit of the phosphorylase kinase, causing compromise in liver and hypoglycemia [8, 9].

The treatment of hepatic GSDs usually consists of dietary management, with frequent periodic administration of uncooked cornstarch (UCCS) and restriction of simple carbohydrate intake [10]. Dietary management aims to maintain normoglycemia, preventing secondary metabolic derangement and development of complications such as hepatocellular adenomas/carcinomas, myopathy, renal failure and osteoporosis [11]. In GSD I, the restriction of sucrose, fructose, galactose and lactose is widely used; in GSD III and IX, the restriction of sucrose and the intake of a high-protein diet are also common [4, 6, 12]. Other strategies for treatment are described, such as the continuous infusion of glucose at night, ketogenic diet [10, 13], medium chain triglycerides (TCM) [14, 15] and liver transplant [2].

Low bone mineral density (BMD) in GSDs patients, and a higher risk for developing fractures, has been described by several studies [16–21]. Its etiology seems to be multifactorial, a combined result of malnutrition, metabolic imbalance, secondary lactic acidosis and hypogonadism [16, 18]. A lower BMD has also been described in other inborn errors of metabolism (IEM), such as phenylketonuria (PKU). For instance, Castro et al. (2020) found that patients with PKU had lower BMD than controls, but with Z-score values within normal limits. When analyzing bone turnover biomarkers, they found an imbalance between bone formation and resorption, suggesting that bone resorption is increased in PKU patients. The authors suggest that this finding may be associated with the restricted diet and the toxic effect of the disease [22].

Increased bone turnover markers (BTMs) are associated with bone loss, increased fracture risk and poor adherence to the treatment of osteoporosis [23]. It is important to point out that there are many determinants of the variability of bone turnover, such as age and gender. Also, there are conditions characterized by an acceleration of bone turnover such as primary hyperparathyroidism and vitamin D deficiency [24]. The bone formation marker procollagen type 1 N-terminal propeptide (P1NP) and the resorption marker collagen type 1 C-terminal telopeptide (CTX), are the preferred markers for evaluating bone turnover in the clinical setting due to their specificity to bone, performance in clinical studies, wide use and relatively low analytical variability [23]. Some studies have correlated BTMs with hepatic GSD and treatment variables, and those few studies have reported inconclusive findings [16, 18, 21, 25].

The aim of this study was to evaluate the BMD of patients with GSD I, IIIa and IX α by dual emission X-ray absorptiometry (DXA) and serum biomarkers of bone metabolism analysis, as well as their relationship with metabolic and nutritional control in GSDs.

2. Materials and Methods

This is a cross-sectional outpatient study carried out at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil. The study was approved by the HCPA Research Ethics Committee (protocol

numbers 14-0120 and 15-0218) and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki [26]. All participants (or their legal guardians when appropriate) provided written informed consent.

2.1. Subjects

The study included 23 patients with previous diagnosis of GSD (Ia= 13, Ib= 5, IIIa= 2, IX α = 3), confirmed by genetic analysis and recruited from the Medical Genetics Service of HCPA (MGS-HCPA), Brazil; 12/23 were female, with a median age of 11.9 years, ranging from 3 to 33 years (0 to 11 years, $n = 12$; 12 to 19 years, $n = 5$; ≥ 20 years, $n = 6$). The treatment protocol for patients with GSD I seen at the MSG-HCPA includes restriction of sucrose, fructose, galactose and lactose, in addition to regular consumption of UCCS; for types III and IX, it is also recommended restriction of sucrose, the intake of UCCS and a high-protein diet.

2.2. Data collection

2.2.1. DXA analysis

BMD was assessed by DXA using a Lunar Prodigy Primo device (Encore version 14.1, Radiation Corporation, Madison, WI). Patients fasted for only 2 hours before the scan, as they cannot tolerate longer periods without presenting hypoglycemia. In adults, the lumbar spine (L1-L4) and proximal femur (total femur and femoral neck) were evaluated, while in children, the lumbar spine (L1-L4) and whole body (minus the head) were assessed. Precision error was assessed as recommended by the International Society for Clinical Densitometry (ISCD), taking into account the minimum acceptable precision for an individual technologist [27, 28].

As per the 2019 ISCD position statement, results were expressed as Z-scores for age. In children, adolescents, and young adults, a Z-score of -2.0 standard deviations (SD) or lower is defined as a “BMD below the expected range for age” [27, 28], and this was the criteria adopted for classifying the BMD as low or reduced in this study.

Patients with short stature for age did not have their height corrected for DXA, to avoid false normalization of BMD in patients whose height deficit may be due to the underlying GSD.

2.2.2. Biochemical analysis

On the same day of the DXA scan, a blood sample was collected after the same 2-hour fasting. Serum was separated from the sample, stored at -80°C , and sent to a reference laboratory (Fleury S.A., São Paulo), where commercially available kits (Roche Diagnostics, coefficient of variation 5%) were used to quantitate three BTMs: osteocalcin (OC), P1NP and CTX by electrochemiluminescence. The reference ranges for these BTMs were classified by age and sex according to Bayer et al. (2014) and Wyness et al. (2013) (table S1) [29, 30]. 25-OH Vitamin D concentrations were also measured (NRV= $>20\text{ng/mL}$).

Additional test results, such as vitamin B12, calcium, phosphorus, triglycerides, cholesterol (total and fractions), glucose, lactate and arterial blood gas were collected from the medical records of each patient on the date closest to (up to 20 days before or after) the DXA scan. For lactate and glucose, the median of all values available for the 24 months preceding DXA was also reported.

Serum triglyceride (the measurement closest to the date of DXA), glucose and lactate concentrations (median value of the previous 24 months-measurements) were used to determine

the metabolic control of patients [21, 25, 31]. Patients were considered adherent to treatment (e.g., with a good metabolic control) if the values for all the three variables were within the normal reference range (glucose: 4.2 - 5.6 mmol/L; lactate: 0.5 - 2.2 mmol/L; triglycerides: < 2.3 mmol/L).

2.2.3. Food diary

The patients were trained by specialized professionals to record their dietary intake related to the week before the DXA performance, on a three-day food diary (2 weekdays and 1 weekend day). Patients were instructed to write down detailed information about their food consumption, including details as to how foods are prepared, any condiments and seasonings used and the brands of all products. Analysis of dietary intake was performed using the Nutribase software environment (NB16Cloud, CyberSoft, Inc., Phoenix, AZ, USA). Household measurements were converted to grams by a clinical nutritionist, using the 2008–2009 Brazilian Household Budget Survey as a basis. Three-day dietary intake values were averaged for further analysis and comparison against the Dietary Reference Intake (DRI) reference tables [32] (for calories, lipids, vitamins and minerals) or GSD I, III, and IX treatment guidelines for protein [4, 6, 10, 12]. The daily energy requirement was calculated using the Harris Benedict formula, which takes weight, structure, age, in addition to the degree of physical activity (male: $REE = 66.47 + 13.75 \times Wt + 5.0 \times Ht - 6.76 \times age$; female: $REE = 655.10 + 9.56 \times Wt + 1.85 \times Ht - 4.68 \times age$), the degree of physical activity was considered mild in all patients: 1.4 - 1.59. Percent adequacy (quantity ingested / recommended quantity \times 100) was calculated for each of these nutrients. In addition, a questionnaire was used to collect data on vitamin and mineral consumption, date of menarche and history of fractures.

2.2.4. Anthropometric measurements

On the same day DXA was performed, weight was measured on a digital scale (0.1 kg resolution; Model 2096PP/2; Toledo, São Paulo, Brazil), and height, with a wall-mounted Harpenden stadiometer (0.1 cm accuracy; Holtain Ltd., Crymych, Wales, United Kingdom). Measurements were obtained with the participants standing upright, wearing lightweight clothing. The body mass index (BMI) was calculated as the weight (kg) divided by height (m) squared, and classified as underweight, eutrophic, overweight, or obese, according to the World Health Organization (WHO) criteria. In patients under age 19, nutritional status was calculated using BMI for age, with Z-scores from WHO Anthro version 3.2.2 and WHO AnthroPlus version 1.0.4 [33, 34].

2.3. Statistical analysis

Categorical variables were expressed as absolute and relative frequencies, and continuous variables, as medians, standard error, range and percentiles. The Kruskal–Wallis test was used to compare groups and the Spearman test for correlations. All statistical analyses were performed in IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0 (Armonk, NY: IBM Corp.). The significance level was set using Bonferroni correction at $p \leq 0.003$.

3. Results

3.1. Characteristics of the sample

The clinical and laboratory findings of the sample are shown in Table 1. Data was stratified by age group (children, aged 0 to 11; adolescents, aged 12 to 19; and adults, aged 20 or older). All patients were on UCCS therapy (4 to 8 times a day, median dose= 6.3 g/kg/day) and no patient received additional therapies like MCT diet, ketogenic diet or liver transplant. Overall, 11/23 (47.8%) patients had good metabolic control (children= 6/12, adolescents= 1/5, adults= 4/6) (Table S2). No patient presented metabolic acidosis.

Table 1. Clinical and laboratorial characteristics of patients with hepatic glycogen storage diseases included in the study ($n = 23$).

Variables	Overall ($n = 23$)	Children ($n = 12$)	Adolescents ($n = 5$)	Adults ($n = 6$)	Reference range
Sex (F/M)	12/11	4/8	3/2	5/1	-
GSD type (Ia / Ib / IIIa / IX α)	(13/5/2/3)	(6/3/1/2)	(3/1/1/0)	(4/1/0/1)	-
Weight (kg)	56.0 (38.8-72.0)	38.9 (28.5-46.5)	76.0 (66.0-79.0)	67.0 (59.3-85.0)	-
Age at diagnosis (years)	1.0 (0.6-4.0)	0.9 (0.6-2.2)	1.0 (0.6-4.0)	11.9 (1.1-24.3)	-
Height (cm)	145.0 (132.0-154.0)	135.0 (117.5-143.0)	160.0 (152.0-162.0)	152.0 (149.8-154.0)	-
BMI (kg/m ²)	25.1 (20.7-29.0)	21.5 (19.2-27.0)	29.0 (25.1-29.6)	27.7 (24.3-35.8)	Children: \geq p3- < p85; Adults: 18.5 to 24.9.
Treatment duration (years)	9.4 (5.8-15.4)	8.5 (6.2-10.4)	15.4 (9.5-15.5)	12.3 (2.5-20.8)	-
UCCS (g/kg/day)	6.3 (4.5-8.0)	8.0 (4.8-10.9)	5.3 (4.2-5.6)	5.6 (3.2-6.7)	-
Serum:					
- 25-OH Vitamin D (ng/mL)	26.8 (18.1-30.5)	26.1 (18.4-31.7)	28.3 (26.8-40.0)	19.9 (11.0-27.0)	Desirable: >20
-Vitamin B12 (pg/mL)	379.7 (289.1-561.7)	416.1 (364.3-1074.5)	263.0 (146.8-379.3)	402.1 (160.0-561.7)	> 221.4
- Calcium (mmol/L)	2.3 (2.3-2.4)	2.4 (2.3-2.4)	2.3 (2.2-2.4)	2.3 (2.2-2.4)	2.1 - 2.5
- Phosphorus (mmol/L)	1.4 (1.2-1.6)	1.6 (1.4-1.7)	1.3 (1.2-1.5)	1.2 (1.1-1.3)	0.8 - 1.5
- Glucose (mmol/L)	4.4 (3.9-5.0)	4.5 (3.9-5.1)	4.0 (3.9-4.3)	4.6 (3.8-5.4)	4.2 - 5.6
- Glucose (mmol/L)*	4.6 (4.3-4.9)	4.6 (4.4-4.9)	4.4 (4.3-4.6)	4.8 (4.1-5.2)	4.2 - 5.6
- Lactate (mmol/L)	1.3 (1.0-2.8)	1.3 (1.1-3.5)	1.5 (1.0-1.6)	1.2 (0.9-1.8)	0.5 - 2.2
- Lactate (mmol/L)*	1.5 (1.3-2.3)	1.5 (1.2-2.2)	1.4 (1.3-1.5)	1.9 (1.5-3.4)	0.5 - 2.2
- Triglycerides (mmol/L)	2.2 (1.2-3.2)	2.2 (1.7-3.0)	2.9 (2.9-3.4)	1.3 (0.9-3.2)	< 2.3
-Total cholesterol (mmol/L)	4.5 (3.6-5.2)	4.5 (4.3-5.6)	4.2 (3.6-4.6)	4.6 (3.6-5.2)	<5.2
-HDL	0.9 (0.7-1.0)	0.8 (0.8-0.9)	0.7 (0.6-1.1)	1.0 (0.9-1.1)	>1.0
-LDL	2.6 (1.8-2.9)	2.7 (1.8-3.6)	1.8 (1.7-2.7)	2.5 (2.1-3.2)	<3.3
Bone turnover biomarkers (serum)					
-CTX (ng/mL)	0.7 (0.3-1.1)	1.1 (0.9-1.5)	0.5 (0.2-1.0)	0.5 (0.2-0.7)	ref [30, 31]
-OC (ng/mL)	55.6 (31.9-102.2)	99.9 (79.7-114.4)	48.4 (26.6-82.6)	30.2 (23.6-36.1)	ref [30, 31]
-P1NP (μ g/L)	304.1 (75.1-420.2)	420.2 (386.0-750.7)	254.4 (139.9-337.1)	62.4 (57.3-82.1)	ref [30, 31]
DXA – Z-score:					
-Whole body	-0.1 (-0.9 to 0.20)	-0.1 (-1.0-0.3)	-0.2 (-0.9-0.0)	N/A	> - 2.0
-Proximal femur	-0.8 (-1.0 to -0.5)	N/A	N/A	-0.8 (-1.0 to -0.5)	> - 2.0
-Lumbar spine	-0.6 (-1.3 to -0.2)	-0.6 (-1.3 to -0.2)	-0.6 (-1.0 to -0.1)	-0.7 (-1.8 to -0.4)	> - 2.0

Values expressed as median and interquartile range (IQR), except sex and type of GSD; F: female. M: male. UCCS: uncooked cornstarch. P: percentile. CTX: collagen type 1 C-terminal telopeptide. OC: osteocalcin. P1NP: procollagen

type 1 N-terminal propeptide. **LDL: low-density lipoprotein. HDL: high-density lipoprotein. N/A: not applicable;**
Age range: children, 0 to 11 years; adolescents, 12 to 19 years; adults, 20 years or older; *Median of the 24 months preceding DXA;

According to the child growth standards, 9/12 of the children were overweight or obese. Adolescents ($n=4/5$) and adults ($n=4/6$) were also overweight, with a median BMI of 29.0 kg/m² and 27.7 kg/m² respectively.

Overall, 4/12 of the children and 3/6 of the adults could be classified as 25-OH Vitamin D-deficient. Of these, only one patient was not on a multivitamin or Vitamin D supplement.

3.2. DXA

Low BMD was diagnosed in three patients (Table S3 and S4). Only children (GSD Ia; 6.6 years, female) and adolescents (GSD IIIa; 11.9 years, female and 16.5 years, male) presented a Z-score below the expected range for age (Table S3). All three patients had adequate serum levels of 25-OH Vitamin D and BTMs (Tables, S3 and S4; patients 1, 19 and 20). The patient with GSD Ia and low BMD also had the highest lactate level (5.8 mmol/L).

The low stature for age was observed in 3/23 patients (patients 1, 17 and 19, Table S2, S3 and S4), two with low BMD and one with a normal DXA Z-score. Of these patients, one was a 16-year-old male and two were girls, aged 6 and 11 years; neither had reached menarche at the time of data collection.

3.3. BTMs and correlations with DXA, metabolic control and biochemical parameters (Table S2 and S3)

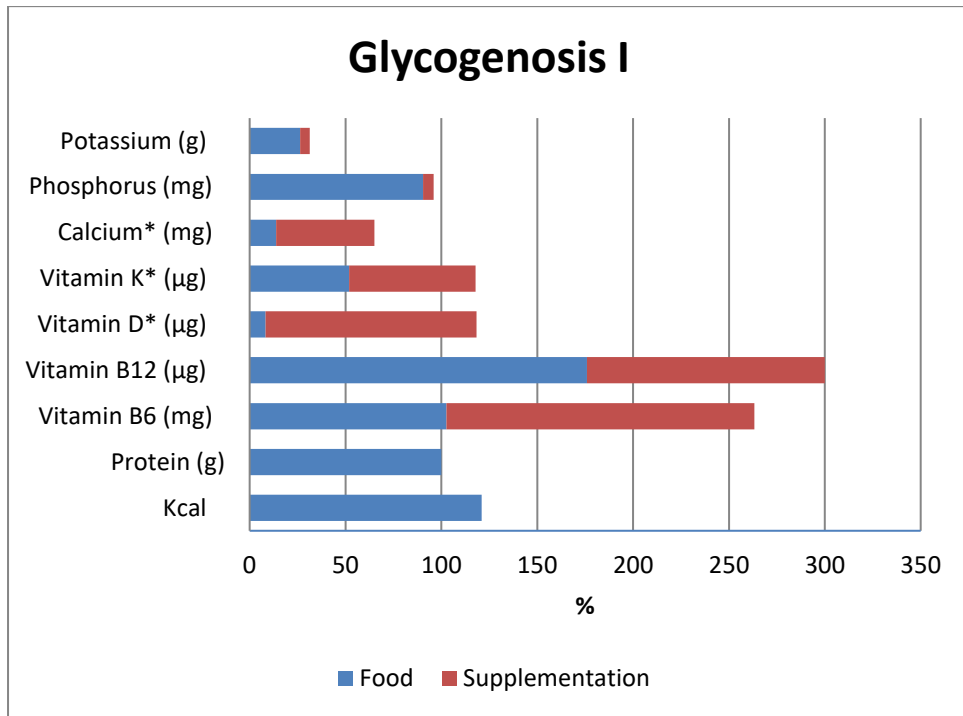
Six patients (GSD Ia= 4, Ib= 2) presented at least one BTM increased (patients 8, 9, 11, 14, 15, 18, table S3). CTX was elevated in 2/18 patients, while 6/19 had increased P1NP and 1/18 patient had elevated OC concentrations. Out of them, two presented low levels of 25-OH-vitamin D (patients 9 and 15), and three, a low intake of calcium (patients 11, 14 and 18). There was a negative correlation between body weight and BTMs (CTX, $r = -0.652$, $p = 0.003$; P1NP, $r = -0.690$, $p = 0.001$; OC, $r = -0.668$, $p = 0.002$). The difference of BTMs between types of GSD was not significant.

A history of non-pathological fracture at 7 years was evidenced in one 11-year-old patient (patient 4). BMD, bone turnover biomarkers and serum 25-OH Vitamin D were adequate. Also, the patient demonstrated poor metabolic control, reduction of energy intake, and intake of vitamins D and K, calcium, phosphorus and potassium, despite approximately 3 years of calcium supplementation.

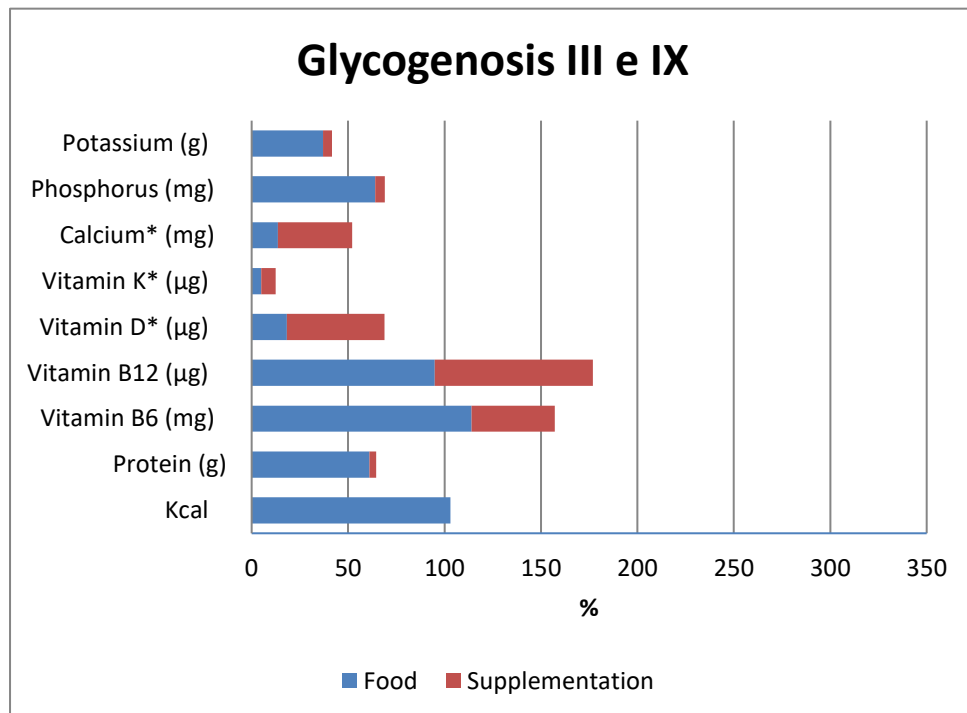
According to the dietary data, energy intake median adequacy ratio was moderate to strongly associated with bone biomarkers CTX, OC and P1NP ($r = -0.686$, $p = 0.005$; $r = -0.761$, $p = 0.001$; and $r = -0.776$, $p = 0.001$, respectively) (Table S5).

3.4. Nutritional adequacy

Figure 1 illustrates the adequacy of nutrient intake (from the diet and with the addition of prescribed dietary supplements) in the sample.



(A)



(B)

Figure 1. Adequacy of dietary and supplemental intake of nutrients essential for bone metabolism. **A)** Data for Glycogenosis Ia ($n = 11$) and Ib ($n = 5$) patients. **B)** Data for Glycogenosis IIIa ($n = 1$) and IX α ($n = 3$) patients. Three patients did not complete the food diary. Data expressed as median; adequacy expressed as % of RDA or *AI. Data obtained through food record; adequacy according to GSD treatment guidelines (for protein) and DRI tables (all other nutrients).

The adequacy of energy intake was higher than expected, and higher than recommended, in patients with GSD Ia and Ib (121.0% adequacy of the recommended energy requirement). Those with types IIIa and IX α showed adequate intake (104.0%). Overall, 11/20 of the patients had energy intake above and 4/20 had energy intake below the DRI. According to guidelines protein consumption was less than recommended in patients with GSD IIIa and IX α : 4/5 (1.6 g/kg/d) (table S6).

Considering only dietary intake in the analyses, both groups of patients had insufficient intake of vitamins D and K, calcium, potassium and phosphorus. After supplementation, all patients, except those with GSD IX α , had optimal or above-adequate Vitamin D intake, but calcium, phosphorus and potassium intake did not reach the minimum necessary levels even after supplementation.

The utilization of nutritional supplement (multivitamin, calcium or vitamin D) was reported by 20/23 of the patients. There was no association between supplement use, BTMs and BMD.

A summary of the findings of the present study, and a comparison with previous studies on the literature about DXA and hepatic GSD, is shown in table S7.

4. Discussion

Our study shows that patients with hepatic may present low BMD, but not so frequently as previously reported. Patients with muscular involvement, with short stature for age or with lactic acidemia appear to be at higher risk for developing this finding.

The differences observed between our cohort and other cohorts regarding the prevalence of low BMD may be associated with the younger age range and the higher BMI of our sample. Moreover, there are differences in DXA site (lumbar only) [21, 25]; cutoff points for osteopenia and osteoporosis (SD -1.0 and -2.5 respectively) [16, 21]; and differences in dietary therapy (normal diet or overnight enteral glucose feeding [16, 20], lower UCCS dose [18, 21] as compared to our patients. In addition to these differences, we found that levels of triglycerides and lactate [18, 20, 21, 25], total cholesterol [18, 21, 25] and lactate [20, 21] were lower than reported by previous studies, suggesting a better metabolic control of our sample.

The interpretation of the values of BTMs represents a challenge, especially in young patients [29]. BTMs are high in the infancy, decrease in childhood and then increase during puberty. So, the use of appropriate reference range for age group is mandatory [24]. Other authors demonstrated increased bone remodeling and/or reduced bone deposition in patients with GSD I and III, through the analysis of calcitonin, CTX, N-terminal telopeptide of type 1 collagen (NTX), hydroxyproline and OC [18, 21]. On the other hand, Cabrera-Abreu et al. (2004) measured type 1 collagen terminal propeptide (P1CP), P1NP, CTX and bone alkaline phosphatase (ALP) levels and found no correlation with BMD in patients with GSD I, III or IX [16]. We found evidence for a higher bone turnover rate in 6/19 (31.6%) patients, being P1NP the BTM most frequently increased. For at least 2 patients, the increase in BTMs could be due to vitamin D deficiency. Unfortunately, we

have not evaluated other causes of increased BTM, such as hyperparathyroidism and thyrotoxicosis.

The negative correlation between body weight and OC, P1NP and CTX is a finding that deserves more investigation. The relationship between BMI and BMD has already been reported; higher BMI is associated with lower prevalence of osteopenia and osteoporosis [35, 36]. Studies with Brazilian healthy males (adolescents and young adults) also demonstrated a positive correlation between BMI and BMD [37, 38]. Conversely, reductions in body weight were associated with decreased bone buildup in adolescents [39]. This relationship between higher weight and better BMD may be attributable to a larger mechanical load on bones [36], or to the hypothesis that adipocytes may be hormone-producing cells and thus may interfere directly or indirectly with the activity of osteoclasts and osteoblasts [40].

In our study, we also observed a negative association between adequacy of energy intake and BTMs. The correlation between caloric intake and OC concentrations is not well described; however, energy expenditure appears to be greater when OC is increased. Studies with animal models have found that higher concentrations of OC are associated with lower odds of developing obesity, as the increased energy expenditure leads to less buildup of fat and body mass [41, 42].

Regarding biochemical data, we observed a median of 25-OH Vitamin D concentration lower than those found by Kaiser et al. (2019) and Melis et al. (2014). Like the aforementioned authors, we found no association between 25-OH Vitamin D levels and BMD [20, 21]. Despite the reduced consumption of vitamin D in the diet, few patients had low 25-OH Vitamin D concentrations, probably because food consumption does not necessarily reflect serum concentrations. The main source of vitamin D is endogenous synthesis after skin exposure to UVB radiation. [43].

We also observed a low intake of nutrients important for bone metabolism, even considering that about half of the patients had a poor metabolic control. The main sources of nutrients supporting bone health are dairy products, as they provide a good supply of calcium, phosphorus, potassium, protein and vitamin D [44]. Patients with GSD I have very strict restrictions on sucrose, lactose and fructose intake [4], which makes it difficult for them to reach their nutritional goals. In GSD III and IX, intake of these sugars is not as restricted as in I, but remains limited [6, 12]. Our data suggest that the poor metabolic control, as defined herein, do not necessarily reflect a higher intake of the controlled food.

A healthy and varied diet is the optimal means of achieving nutritional goals, since nutrients from food are safer and more bioavailable than those from supplements; however, the UCCS therapy and dietary restrictions imposed on patients with hepatic GSDs make this a difficult task. Thus, treatment guidelines for GSD I systematically recommend supplementation with calcium and multivitamins [4, 10]. The use of low-dose calcium supplementation is justified by the risk of kidney stone formation due to hypocitraturia in patients with GSD I [45]. For GSD III and IX, recommendations are individualized on the basis of the nutritional needs and dietary intake of each patient [6]. As we observed a similarly insufficient nutrient intake profile in the two groups, our findings suggest that it would be prudent to assess renal function of patients and then recommend supplementation in both groups. It is important to highlight that intestinal calcium absorption may be influenced by the gut microbiota [46–48]. Colonetti et al. (2019) and Ceccarani et al. (2020) described that patients with GSD presented intestinal dysbiosis and increased pro-inflammatory rate. This can indicate a higher risk for low BMD, which was not confirmed by our study [48–50].

According to the DRI, intake of energy, vitamin B6 and vitamin B12 exceeded daily recommendations. Previous studies, with older populations, note that excessive intake of vitamins B6 and B12 is associated with an increased risk of hip fracture [51, 52]. We suggest that the association between bone health and intake of B vitamins in patients with hepatic GSDs be investigated in future studies.

This study has some limitations, such as the small and heterogeneous sample, lack of data on the Tanner scale and physical activity level, and reliance on self-reported food records (which may under- or overestimate actual dietary intake).

5. Conclusions

Our data suggests low BMD may not be a frequent finding in GSD patients, especially when they present high BMI and good metabolic control. On other hand, patients with muscular involvement seem to be prone to develop this complication, pointing out the importance of additional studies on exercise and physical activity in this cohort.

Overall, our results reinforce the importance of a specialized health professional team to manage patients with GSDs. We highlight the need for dietitians as part of the medical team for adequate management of these disease, and for periodic monitoring of BMD in order to promote the bone health of the patients.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Table S1: Reference intervals for biomarkers of bone turnover, Table S2: Sample profile, Table S3: Bone mineral density and biomarkers of bone turnover in patients with hepatic glycogen storage diseases, Table S4: Summary of patients with low bone mineral density, Table S5: Spearman correlations, Table S6: Intake of nutrients essential for bone metabolism among patients with hepatic glycogen storage diseases (n = 20/23), Table S7: Hepatic Glycogenosis: comparison among studies that evaluated BMD using DXA.

Acknowledgments: The authors thank the patients for their time and willingness to participate in this study, as well as all those who provided support: coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES); Brazilian National Agency for Research (CNPq); Agency for Research of the State of Rio Grande do Sul, Brazil (FAPERGS); and the Hospital das Clínicas de Porto Alegre Research and Event Incentive Fund (FIPE/HCPA). The authors confirm independence from the sponsors; the content of the article has not been influenced by the sponsors.

Author Contributions: Conceptualization, Ida V. D. Schwartz and Tatiéle Nalin; Data curation, Jéssica T. Jacoby, Roberta Hack Mendes, Ida V. D. Schwartz and Soraia Poloni; Formal analysis, Jéssica T. Jacoby, Ida V. D. Schwartz and Roberta Hack Mendes; Funding acquisition, Ida V. D. Schwartz; Investigation, Bruna B. dos Santos, Ida V. D. Schwartz, Karina Colonetti and Lília Farret Refosco; Methodology, Tatiéle Nalin, Ida V. D. Schwartz and Soraia Poloni; Project administration, Ida V. D. Schwartz; Resources, Ida V. D. Schwartz, Carolina Fischinger Moura de Souza and Poli Mara Spritzer; Software, Jéssica T. Jacoby, Ida V. D. Schwartz and Bruna B. dos Santos; Supervision, Ida V. D. Schwartz and Roberta Hack Mendes; Validation, Roberta Hack Mendes and Ida V. D. Schwartz; Visualization, Roberta Hack Mendes, Jéssica T. Jacoby and Ida V. D. Schwartz; Writing – original draft, Jéssica T. Jacoby, Roberta Hack Mendes and Ida V. D. Schwartz; Writing – review & editing, Jéssica T. Jacoby; Ida V. D. Schwartz and Roberta Hack Mendes. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Conflicts of Interest: Tatiéle Nalin has been an employee of Ultragenyx Farmacêutica do Brasil since April 2019.

References

- [1] Burda, P.; Hochuli, M. Hepatic Glycogen Storage Disorders. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **2015**, *18* (4), 415–421. <https://doi.org/10.1097/mco.000000000000181>.

- [2] Özen, H.; Bayraktar, Y. Glycogen Storage Diseases: New Perspectives Professor, Series Editor. *World J Gastroenterol*, **2007**, *13* (18), 2541–2553.
- [3] Chou, Janice Y., Jun, Hyun Sik, Mansfield, B. C. Glycogen Storage Disease Type I and G6Pase-B Deficiency: Etiology and Therapy. *Nat Rev Endocrinol*, **2010**, *6* (12), 676–688. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2010.189>.Glycogen.
- [4] Kishnani, P. S.; Austin, S. L.; Abdenur, J. E.; Arn, P.; Bali, D. S.; Boney, A.; Chung, W. K.; Dagli, A. I.; Dale, D.; Koeberl, D.; et al. Diagnosis and Management of Glycogen Storage Disease Type I: A Practice Guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet. Med.*, **2014**, *16* (11), 1–29. <https://doi.org/10.1038/gim.2014.128>.
- [5] Sentner, C. P.; Hoogeveen, I. J.; Weinstein, D. A.; Santer, R.; Murphy, E.; McKiernan, P. J.; Steuerwald, U.; Beauchamp, N. J.; Taybert, J.; Laforêt, P.; et al. Glycogen Storage Disease Type III: Diagnosis, Genotype, Management, Clinical Course and Outcome. *J. Inherit. Metab. Dis.*, **2016**, *39* (5), 697–704. <https://doi.org/10.1007/s10545-016-9932-2>.
- [6] Kishnani, P. S.; Austin, S. L.; Arn, P.; Bali, D. S.; Boney, A.; Case, L. E.; Chung, W. K.; Desai, D. M.; El-Gharbawy, A.; Haller, R.; et al. Glycogen Storage Disease Type III Diagnosis and Management Guidelines. *Genet. Med.*, **2010**, *12* (7), 446–463. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181e655b6>.
- [7] Derks, T. G. J.; van Rijn, M. Lipids in Hepatic Glycogen Storage Diseases: Pathophysiology, Monitoring of Dietary Management and Future Directions. *J. Inherit. Metab. Dis.*, **2015**, *38* (3), 537–543. <https://doi.org/10.1007/s10545-015-9811-2>.
- [8] Chen, M. A.; Weinstein, D. A. Glycogen Storage Diseases: Diagnosis, Treatment and Outcome. *Transl. Sci. Rare Dis.*, **2014**, *1*, 45–72. <https://doi.org/10.3233/978-1-61499-718-4-271>.
- [9] Zhang, J.; Yuan, Y.; Ma, M.; Liu, Y.; Zhang, W.; Yao, F.; Qiu, Z. Clinical and Genetic Characteristics of 17 Chinese Patients with Glycogen Storage Disease Type IXa. *Gene*, **2017**, *627* (May), 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.06.026>.
- [10] Ross, K. M.; Ferrecchia, I. A.; Dahlberg, K. R.; Dambaska, M.; Ryan, P. T.; Weinstein, D. A. Dietary Management of the Glycogen Storage Diseases: Evolution of Treatment and Ongoing Controversies. *Adv. Nutr.*, **2020**, *11* (2), 439–446. <https://doi.org/10.1093/advances/nmz092>.
- [11] Steunenbergh, T. A. H.; Peeks, F.; Hoogeveen, I. J.; Mitchell, J. J.; Mundy, H.; de Boer, F.; Lubout, C. M. A.; de Souza, C. F.; Weinstein, D. A.; Derks, T. G. J. Safety Issues Associated with Dietary Management in Patients with Hepatic Glycogen Storage Disease. *Mol. Genet. Metab.*, **2018**, *125* (1–2), 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.07.004>.
- [12] Kishnani, P. S.; Goldstein, J.; Austin, S. L.; Arn, P.; Bachrach, B.; Bali, D. S.; Chung, W. K.; El-Gharbawy, A.; Brown, L. M.; Kahler, S.; et al. Diagnosis and Management of Glycogen Storage Diseases Type VI and IX: A Clinical Practice Resource of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet. Med.*, **2019**, *21* (4), 772–789. <https://doi.org/10.1038/s41436-018-0364-2>.
- [13] Francini-pesenti, F.; Tresso, S.; Vitturi, N. Modified Atkins Ketogenic Diet Improves

- Heart and Skeletal Muscle Function in Glycogen Storage Disease Type III. **2019**, 17–20.
- [14] Bhattacharya, K. Investigation and Management of the Hepatic Glycogen Storage Diseases. *Transl. Pediatr.*, **2015**, 4 (3), 240–248. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2224-4336.2015.04.07>.
- [15] Das, A. M.; Lücke, T.; Meyer, U.; Hartmann, H.; Illsinger, S. Glycogen Storage Disease Type 1: Impact of Medium-Chain Triglycerides on Metabolic Control and Growth. *Ann. Nutr. Metab.*, **2010**, 56 (3), 225–232. <https://doi.org/10.1159/000283242>.
- [16] Cabrera-Abreu, J.; Rabtree, N. J. C.; Lias, E. E.; Raser, W. F.; Ramb, R. C. Bone Mineral Density and Markers of Bone Turnover in Patients with Glycogen Storage Disease Types I, III and IX. *J. Inherit. Metab. Dis.*, **2004**, 27, 1–10.
- [17] Minarich, L. A.; Kirpich, A.; Fiske, L. M.; Weinstein, D. A.; David, A.; Program, S. D. Bone Mineral Density in Glycogen Storage Disease Type Ia and Ib. *Genet. Med.*, **2012**, 14 (8), 737–741. <https://doi.org/10.1038/gim.2012.36>.
- [18] Melis, D.; Rossi, A.; Pivonello, R.; Del Puente, A.; Pivonello, C.; Cangemi, G.; Negri, M.; Colao, A.; Andria, G.; Parenti, G. Reduced Bone Mineral Density in Glycogen Storage Disease Type III: Evidence for a Possible Connection between Metabolic Imbalance and Bone Homeostasis. *Bone*, **2016**, 86, 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.02.012>.
- [19] Wolfsdorf, J. I. Bones Benefit from Better Biochemical Control in Type 1 Glycogen Storage Disease. *J. Pediatr.*, **2002**, 141 (3), 308–310. <https://doi.org/10.1067/mpd.2002.127504>.
- [20] Kaiser, N.; Gautschi, M.; Bosanska, L.; Meienberg, F.; Baumgartner, M. R.; Spinass, G. A.; Hochuli, M. Glycemic Control and Complications in Glycogen Storage Disease Type I: Results from the Swiss Registry. *Mol. Genet. Metab.*, **2019**, 126 (4), 355–361. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2019.02.008>.
- [21] Melis, D.; Pivonello, R.; Cozzolino, M.; Della Casa, R.; Balivo, F.; Del Puente, A.; Dionisi-Vici, C.; Cotugno, G.; Zuppaldi, C.; Rigoldi, M.; et al. Impaired Bone Metabolism in Glycogen Storage Disease Type 1 Is Associated with Poor Metabolic Control in Type 1a and with Granulocyte Colony-Stimulating Factor Therapy in Type 1b. *Horm. Res. Paediatr.*, **2014**, 81 (1), 55–62. <https://doi.org/10.1159/000351022>.
- [22] Castro, M. J. de; Lamas, C. de; Sánchez-Pintos, P.; González-Lamuño, D.; Couce, M. L. Bone Status in Patients with Phenylketonuria : *Nutrients*, **2020**, 12 (2154), 1–15.
- [23] Lorentzon, M.; Branco, J.; Brandi, M. L.; Bruyère, O.; Chapurlat, R.; Cooper, C.; Cortet, B.; Diez-Perez, A.; Ferrari, S.; Gasparik, A.; et al. Algorithm for the Use of Biochemical Markers of Bone Turnover in the Diagnosis, Assessment and Follow-Up of Treatment for Osteoporosis. *Adv. Ther.*, **2019**, 36 (10), 2811–2824. <https://doi.org/10.1007/s12325-019-01063-9>.
- [24] Szulc, P.; Naylor, K.; Hoyle, N. R.; Eastell, R.; Leary, E. T. Use of CTX-I and PINP as Bone Turnover Markers: National Bone Health Alliance Recommendations to Standardize Sample Handling and Patient Preparation to Reduce Pre-Analytical Variability. *Osteoporos. Int.*, **2017**, 28 (9), 2541–2556. <https://doi.org/10.1007/s00198-017-4082-4>.
- [25] Rake, J. P.; Rake, J. P.; Visser, G.; Huismans, D.; Huitema, S.; Van Der Veer, E.; Piers, D. A.; Smit, G. P. A. Bone Mineral Density in Children, Adolescents and Adults with

- Glycogen Storage Disease Type Ia: A Cross-Sectional and Longitudinal Study. *J. Inherit. Metab. Dis.*, **2003**, 26 (4), 371–384. <https://doi.org/10.1023/A:1025111220095>.
- [26] WMA. Declaração de Helsinko VI. *Jornal Brasileiro de Reproducao Assistida*. 2003, pp 29–32.
- [27] ISCD. Official Positions Pediatric ISCD 2019. *Psychol. Appl. to Work An Introd. to Ind. Organ. Psychol. Tenth Ed. Paul*, **2019**. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- [28] ISCD. Official Positions Adult ISCD 2019. *Psychol. Appl. to Work An Introd. to Ind. Organ. Psychol. Tenth Ed. Paul*, **2019**. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- [29] Bayer, M. Reference Values of Osteocalcin and Procollagen Type I N-Propeptide Plasma Levels in a Healthy Central European Population Aged 0-18 Years. *Osteoporos. Int.*, **2014**, 25 (2), 729–736. <https://doi.org/10.1007/s00198-013-2485-4>.
- [30] Wyness, S. P.; Roberts, W. L.; Straseski, J. A. Pediatric Reference Intervals for Four Serum Bone Markers Using Two Automated Immunoassays. *Clin. Chim. Acta*, **2013**, 415, 169–172. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.10.036>.
- [31] Okechuku, G. O.; Shoemaker, L. R.; Dambaska, M.; Brown, L. M.; Mathew, J.; Weinstein, D. A. Tight Metabolic Control plus ACE Inhibitor Therapy Improves GSD I Nephropathy. *J. Inherit. Metab. Dis.*, **2017**, 40 (5), 703–708. <https://doi.org/10.1007/s10545-017-0054-2>.
- [32] Padovani, R. M.; Amaya-Farfán, J.; Colugnati, F. A. B.; Domene, S. M. Á. Dietary Reference Intakes: Application of Tables in Nutritional Studies. *Rev. Nutr.*, **2006**, 19 (6), 741–760. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732006000600010>.
- [33] World Health Organization. WHO Child Growth Standards: Methods and Development: Length/Height-for-Age, Weight-for-Age, Weight-for-Length, Weight-for-Height and Body Mass Index-for-Age. *WHO*, **2006**.
- [34] World Health Organization. Assessment of Fracture Risk and Its Application to Screening for Postmenopausal Osteoporosis : Report of a WHO Study Group. 1994.
- [35] Soltani, S.; Hunter, G. R.; Kazemi, A.; Shab-Bidar, S. The Effects of Weight Loss Approaches on Bone Mineral Density in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Osteoporos. Int.*, **2016**, 27 (9), 2655–2671. <https://doi.org/10.1007/s00198-016-3617-4>.
- [36] Leeuwen, J. van; Koes, B. W.; Paulis, W. D.; van Middelkoop, M. Differences in Bone Mineral Density between Normal-Weight Children and Children with Overweight and Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Obes. Rev.*, **2017**, 18 (5), 526–546. <https://doi.org/10.1111/obr.12515>.
- [37] Vargas, D. M.; Kleis, S. K.; Lehmkühl, N. R. D. S.; de Sousa, C. A.; de Azevedo, L. C. Predictors of Bone Mineral Density in Adolescents with Excess Weight. *Rev. Bras. Med. do Esporte*, **2020**, 26 (6), 508–512. <https://doi.org/10.1590/1517-869220202606160524>.
- [38] Rodrigues Filho, E. de A.; Santos, M. A. M. Dos; Silva, A. T. P. da; Farah, B. Q.; Costa, M. da C.; Campos, F. de A. C. E. S.; Falcão, A. P. S. T. Relation between Body Composition and Bone Mineral Density in Young Undergraduate Students with Different Nutritional Status. *Einstein (Sao Paulo)*, **2016**, 14 (1), 12–17.

<https://doi.org/10.1590/S1679-45082016AO3569>.

- [39] Nilsen, O. A.; Ahmed, L. A.; Winther, A.; Christoffersen, T.; Thrane, G.; Evensen, E.; Furberg, A.-S.; Grimnes, G.; Dennison, E.; Emaus, N. Body Weight and Body Mass Index Influence Bone Mineral Density in Late Adolescence in a Two-Year Follow-Up Study. The Tromsø Study: Fit Futures. *JBMR Plus*, **2019**, *3* (9), e10195. <https://doi.org/10.1002/jbm4.10195>.
- [40] Rowe, P.; Koller, A.; Sharma, S.; Hospital, M. F. *Physiology , Bone Remodeling*; 2020.
- [41] Ferron, M.; Lacombe, J. Regulation of Energy Metabolism by the Skeleton: Osteocalcin and Beyond. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2014**, *561*, 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.05.022>.
- [42] Lee, N. K.; Sowa, H.; Hinoi, E.; Ferron, M.; Ahn, J. D.; Confavreux, C.; Dacquin, R.; Mee, P. J.; McKee, M. D.; Jung, D. Y.; et al. Endocrine Regulation of Energy Metabolism by the Skeleton. *Cell*, **2007**, *130* (3), 456–469. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.047>.
- [43] Laird, E.; Ward, M.; McSorley, E.; Strain, J. J.; Wallace, J. Vitamin D and Bone Health; Potential Mechanisms. *Nutrients*, **2010**, *2* (7), 693–724. <https://doi.org/10.3390/nu2070693>.
- [44] Muñoz-garach, A.; García-fontana, B.; Muñoz-torres, M. Nutrients and Dietary Patterns Related to Osteoporosis. *Nutrients*, **2020**, *12* (7), 1–15. <https://doi.org/10.3390/nu12071986>.
- [45] Weinstein, D. A.; Somers, M. J. G.; Wolfsdorf, J. I. Decrease Urinary Citrate Excretion in Type 1a Glycogen Storage Disease. *J. Pediatr.*, **2001**, *138* (3), 378–382. <https://doi.org/10.1067/mpd.2001.111322>.
- [46] Wang, J.; Wang, Y.; Gao, W.; Wang, B.; Zhao, H.; Zeng, Y.; Ji, Y.; Hao, D. Diversity Analysis of Gut Microbiota in Osteoporosis and Osteopenia Patients. *PeerJ*, **2017**, *2017* (6), 1–14. <https://doi.org/10.7717/peerj.3450>.
- [47] Weaver, C. M. Diet, Gut Microbiome, and Bone Health Gut Microbiome-a New Frontier? HHS Public Access. *Curr Osteoporos Rep*, **2015**, *13* (2), 125–130. <https://doi.org/10.1007/s11914-015-0257-0>.
- [48] Li, C.; Huang, Q.; Yang, R.; Dai, Y.; Zeng, Y.; Tao, L.; Li, X.; Zeng, J.; Wang, Q. Gut Microbiota Composition and Bone Mineral Loss—Epidemiologic Evidence from Individuals in Wuhan, China. *Osteoporos. Int.*, **2019**, *30* (5), 1003–1013. <https://doi.org/10.1007/s00198-019-04855-5>.
- [49] Ceccarani, C.; Bassanini, G.; Montanari, C.; Casiraghi, M. C.; Ottaviano, E.; Morace, G.; Biasucci, G.; Paci, S.; Borghi, E.; Verduci, E. Proteobacteria Overgrowth and Butyrate-Producing Taxa Depletion in the Gut Microbiota of Glycogen Storage Disease Type 1 Patients. *Metabolites*, **2020**, *10* (4), 1–16. <https://doi.org/10.3390/metabo10040133>.
- [50] Colonetti, K.; dos Santos, B. B.; Nalin, T.; de Souza, C. F. M.; Triplett, E. W.; Dobbler, P. T.; Schwartz, I. V. D.; Roesch, L. F. W. Hepatic Glycogen Storage Diseases Are Associated to Microbial Dysbiosis. *PLoS One*, **2019**, *14* (4), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214582>.
- [51] Meyer, H. E.; Willett, W. C.; Fung, T. T.; Holvik, K.; Feskanich, D. Association of High

Intakes of Vitamins B6 and B12 From Food and Supplements With Risk of Hip Fracture Among Postmenopausal Women in the Nurses' Health Study. *JAMA Netw. open*, **2019**, 2 (5), e193591. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2019.3591>.

- [52] Garcia Lopez, M.; Bønaa, K. H.; Ebbing, M.; Eriksen, E. F.; Gjesdal, C. G.; Nygård, O.; Tell, G. S.; Ueland, P. M.; Meyer, H. E. B Vitamins and Hip Fracture: Secondary Analyses and Extended Follow-Up of Two Large Randomized Controlled Trials. *J. Bone Miner. Res.*, **2017**, 32 (10), 1981–1989. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3189>.

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Material suplementar do artigo

S1: Reference intervals for biomarkers of bone turnover

Age (years)	Osteocalcin (ng/mL)		P1NP (µg/l)		CTX (ng/mL)			
	Female	Male	Female	Male	Female		Male	
					P2.5	P97.5	P2.5	P97.5
0 – 1	20.8 a 144.3	20.8 a 144.3	227.2 a 4762.8	227.2 a 4762.8	0.404	1.529	0.354	1.199
1 -2	28.3 a 126.1	28.3 a 126.1	346.6 a 1088.0	346.6 a 1088.0	0.396	1.556	0.435	1.433
2- 3	30.7 a 85.4	30.7 a 85.4	178.3 a 645.7	178.3 a 645.7	0.396	1.556	0.435	1.433
3 – 4	23.9 a 98.4	23.9 a 98.4	135.2 a 746.1	135.2 a 746.1	0.396	1.556	0.435	1.433
4 – 5	22.8 a 129.3	22.8 a 129.3	85.7 a 901.7	85.7 a 901.7	0.396	1.556	0.435	1.433
5 – 6	42.1 a 128.2	42.1 a 128.2	111.5 a 768.4	111.5 a 768.4	0.396	1.556	0.435	1.433
6 – 7	30.9 a 122.2	30.9 a 122.2	187.6 a 887.3	187.6 a 887.3	0.565	1.570	0.509	1.697
7 – 8	12.5 a 232.5	12.5 a 232.5	49.9 a 1200.0	49.9 a 1200.0	0.565	1.570	0.509	1.697
8 – 9	25.7 a 151.1	25.7 a 151.1	120.4 a 1021.0	120.4 a 1021.0	0.565	1.570	0.509	1.697
9- 10	18.4 a 251.7	12.2 a 110.6	42.7 a 952.1	45.2 a 552.5	0.565	1.570	0.509	1.697
10 – 11	18.5 a 154.2	12.6 a 145.7	62.5 a 914.7	48.3 a 769.6	0.627	1.955	0.860	2.591
11 – 12	11.9 a 140.4	31.9 a 200.9	65.3 a 855.8	142.5 a 2501.7	0.627	1.955	0.860	2.591
12 – 13	13.1 a 186.7	19.8 a 164.9	47.0 a 980.9	67.2 a 854.8	0.627	1.955	0.860	2.591
13 – 14	16.8 a 238.9	58.7 a 236.2	37.1 a 1195.6	267.9 a 1514.6	0.627	1.955	0.860	2.591
14 – 15	15.4 a 88.8	25.7 a 241.0	58.5 a 451.4	148.1 a 1200.0	0.312	1.104	0.540	2.035
15 – 16	16.9 a 96.3	30.1 a 186.9	45.6 a 600.2	81.8 a 961.4	0.312	1.104	0.540	2.035
16 – 17	5.7 a 66.7	32.0 a 124.2	14.6 a 238.3	77.7 a 430.3	0.312	1.104	0.540	2.035
17 – 18	20.7 a 45.6	13.5 a 160.1	36.3 a 143.9	38.7 a 494.5	0.312	1.104	0.540	2.035
Adults	11 a 48	11 a 48	13.8 a 60.9	13.9 a 85.5	<0.650		<0.850	

P: percentile. *P1NP*: procollagen type 1 N-terminal propeptide. *CTX*: collagen type 1 C-terminal telopeptide.

Reference: Bayer et al. 2014; Wyness et al. 2013.

Table S2: Sample profile

Patient	Gender	Age (years)	GSD	Body mass index	Treatment duration (years)	Dietary supplementation	Glucose (mmol/L)	Lactate (mmol/L)	Triglycerides (mmol/L)	Total cholesterol (mmol/L)
1	F	6.6	Ia	Overweight	5.8	Multi	4.6	5.8	1.8	4.5
2	F	8.0	Ia	Obesity	6.6	Multi, Ca	4.6	3.3	3.0	4.5
3	M	10.9	Ia	Obesity	10.6	Multi, Ca	5.1	1.5	2.1	4.3
4	M	11.6	Ia	Overweight	10.9	Multi	4.2	1.5	2.7	6.6
5	M	11.8	Ia	Obesity	6.8	Multi, Ca	5.4	2.4	8.6	6.7
6	F	13.1	Ia	Obesity	6.0	Multi, Ca	4.3	1.4	2.9	5.1
7	F	13.5	Ia	Overweight	9.5	Multi, D, Ca	4.7	2.3	3.8	3.6
8	F	19.2	Ia	Eutrophic	18.6	Multi, D, Ca	4.1	1.3	3.4	4.6
9	F	20.9	Ia	Obesity	20.8	Ca, D	4.8	1.5	1.7	5.2
10	F	21.2	Ia	Obesity	20.4	Ca, D	5.2	1.7	0.7	3.6
11	F	24.5	Ia	Eutrophic	2.5	Multi, Ca	5.2	3.4	3.2	5.7
12	F	30.4	Ia	Overweight	0.2	N	3.2	4.7	4.6	4.5
13	M	10.4	Ia	Obesity	9.4	Multi, Ca	4.7	1.1	3.7	5.6
14	F	3.5	Ib	Overweight	3.0	Multi	4.5	1.9	1.7	2.9
15	M	5.1	Ib	Obesity	2.5	Multi, Ca	4.3	1.9	2.2	5.6
16	M	10.8	Ib	Overweight	10.3	Multi	4.9	0.8	0.6	2.5
17	M	15.9	Ib	Obesity	15.4	Multi, Ca	4.4	1.5	2.9	3.6
18	F	33.6	Ib	Overweight	31.7	Multi	4.8	2.1	0.9	3.4
19	F	11.9	IIIa	Eutrophic	11.3	Ca	5.0	1.4	2.2	5.1
20	M	16.4	IIIa	Obesity	15.5	Multi, Ca	4.6	0.6	1.2	4.2
21	M	11.3	IX α	Eutrophic	9.3	Multi, Ca	4.4	1.4	2.3	-
22	M	11.7	IXα	Eutrophic	7.7	N	4.8	0.9	0.5	4.4
23	M	29.2	IXα	Eutrophic	4.2	N	4.1	0.6	0.9	4.7

F: female. M: male. Supplementation: Multi: multivitamin; D: vitamin D; Ca: calcium; N: none. -: No information. In bold, patients classified as adherent to treatment.

Lactate and glucose values refer to the median of the 24 months preceding DXA. Triglycerides and total cholesterol refer to the closest measurement to DXA. Patients with normal lactate, triglyceride and glucose concentrations were considered adherent to treatment.

Table S3: Bone mineral density and biomarkers of bone turnover in patients with hepatic glycogen storage diseases

Patients		DXA						Bone turnover biomarkers		
n	Fractures	Lumbar		Femur		Whole body		CTX ng/mL	P1NP mcg/L	OC ng/mL
		g/cm ²	Z-score	g/cm ²	Z-score	g/cm ²	Z-score			
1	No	0.491	-2.2	N/A	N/A	0.545	-2.1	-	356.7	-
2	No	0.773	1.0	N/A	N/A	0.733	0.5	-	-	-
3	No	0.695	-0.6	N/A	N/A	0.330	-1.0	-	-	-
4	Yes*	0.716	-0.6	N/A	N/A	0.794	-0.1	1.070	389.8	93.5
5	No	0.764	-0.2	N/A	N/A	0.834	0.3	0.461	234.9	69.3
6	No	1.113	1.1	N/A	N/A	1.029	1.6	0.774	370.2	63.0
7	No	0.887	-1.0	N/A	N/A	0.837	-0.9	-	-	-
8	No	1.110	-0.6	N/A	N/A	0.928	-1.3	0.273	<u>75.1</u>	33.9
9	No	1.087	-0.8	0.896	-0.9	N/A	N/A	0.599	<u>82.1</u>	31.9
10	No	1.137	-0.4	0.953	-0.5	N/A	N/A	0.174	60.5	23.6
11	No	0.958	-1.8	0.879	-1.0	N/A	N/A	<u>0.945</u>	<u>124.2</u>	42.8
12	No	1.114	-0.6	0.91	-0.8	N/A	N/A	0.070	22.6	12.8
13	No	0.650	-1.0	N/A	N/A	0.763	-0.1	1.440	530.3	129.8
14	No	0.513	N/A	N/A	N/A	0.549	-	<u>1.710</u>	<u>826.5</u>	<u>111.2</u>
15	No	0.513	-1.3	N/A	N/A	0.608	0.1	1.070	<u>856.9</u>	117.7
16	No	0.788	0.2	N/A	N/A	0.918	0.9	-	-	-
17	No	1.121	-0.1	N/A	N/A	1.018	0.0	0.094	204.8	19.4
18	No	0.947	-1.9	0.83	-1.3	N/A	N/A	0.342	<u>64.4</u>	36.1
19	No	0.643	-2.3	N/A	N/A	0.666	-2.1	1.070	386.0	48.2
20	No	0.893	-2.0	N/A	N/A	1.024	-0.2	1.220	304.1	102.2
21	No	0.727	-0.4	N/A	N/A	0.788	-0.1	0.750	420.2	90.2
22	No	0.768	-0.2	N/A	N/A	0.818	0.1	1.670	750.7	106.3
23	No	1.187	-0.3	1.06	-0.2	N/A	N/A	0.699	57.3	28.5

N/A: Not applicable; -: Data not collected.

CTX: collagen type 1 C-terminal telopeptide. OC: osteocalcin. P1NP: procollagen type 1 N-terminal propeptide.

*Fracture after fall from height.

Bold: patients have abnormal BMD. Underlined: Bone turnover markers above the NRV.

Table S4: Summary of patients with low bone mineral density

Patient	1	19	20
GSD	Ia	IIIa	IIIa
Gender	F	F	M
Age (yr)	6	11	16
Height (cm, Z-score)	108 (<-2)	134 (<-2)	165 (>-2 and <-1)
BMI (kg/m ²)	18.0	21.6	29.0
Adherence to treatment	No	Yes	Yes
Age at onset of treatment (mo)	8	6	12
Blood:			
- Vitamin D (ng/mL)	30.5	21.7	24.7
- Vitamin B12 (pg/mL)	1456.0	—	—
- Calcium (mmol/L)	2.3	2.2	2.3
- Phosphorus (mmol/L)	1.9	—	1.4
- Glucose (mmol/L)*	4.6	5.0	4.6
- Glucose (mmol/L)	4.4	6.6	5.0
- Lactate (mmol/L)*	5.78	1.1	0.6
- Lactate (mmol/L)	3.8	0.9	0.7
- Triglycerides (mmol/L)	1.8	2.2	1.2
- Total cholesterol (mmol/L)	4.5	5.1	4.2
- HDL	1.0	0.5	0.6
- LDL	2.7	3.6	2.9
Food record data:			
- Energy intake (kcal)	1635.6	—	2308.7
- Protein (g)	52.7	—	73.3
- Vitamin B6 (mg)	1.3	—	2.0
- Vitamin B12 (µg)	2.0	—	2.3
- Vitamin D (µg)	2.7	—	30.0
- Vitamin K (µg)	24.0	—	6.0
- Calcium (mg)	193.7	—	176.7
- Phosphorus (mg)	608.0	—	649.7
- Potassium (mg)	1241.3	—	1247.0
Supplemental intake:			
- Energy intake (kcal)	0.0	0.0	0.0
- Protein (g)	0.0	0.0	0.0
- Vitamin B6 (mg)	0.2	0.0	1.5
- Vitamin B12 (µg)	0.6	1.0	3.0
- Vitamin D (µg)	80.0	0.0	280.0
- Vitamin K (µg)	0.0	0.0	65.0
- Calcium (mg)	0.0	500.0	750.0
- Phosphorus (mg)	0.0	0.0	0.0
- Potassium (mg)	0.0	0.0	0.0

—: Data not collected. F: female. M: male. GSD: glycogen storage disease. BMI: body mass index. **LDL: low-density lipoprotein. HDL: high-density lipoprotein.**

*Median of the 24 months preceding DXA.

Bold face denotes above-adequate values; bold + underline denotes below-adequate values. Food record data: (dietary intake + prescribed supplementation). The daily energy requirement was calculated using the Harris Benedict formula, which takes weight, structure, age, in addition to the degree of physical activity (male: REE = 66.47 + 13.75 3 Wt + 5.0 3 Ht 2 6.76 3 age; female: REE = 655.10 + 9.56 3 Wt + 1.85 3 Ht 2 4.68 3 age), the degree of physical activity was considered mild in all patients: 1.4 - 1.59. Adequacy was considered if values were between 90 and 110% of expected.

Table S5: Spearman correlations

Correlation	N	r	p
CTX vs			
- BMI	18	-0.568	0.014
- Weight	18	-0.652	0.003
Osteocalcin vs.			
- Weight	18	-0.668	0.002
P1NP vs.			
-Weight	19	-0.690	0.001
Adequacy of Kcal intake vs.			
- CTX	15	-0.686	0.005
- Osteocalcin	15	-0.761	0.001
- P1NP	16	-0.776	0.001

Moderate and strong correlations with $n \geq 15$ (65% of the sample). Significant at $p \leq 0.007$ (Bonferroni correction for multiple comparisons).

Table S6: Intake of nutrients essential for bone metabolism among patients with hepatic glycogen storage diseases (n= 20/23)

	Children (n=11)			Adolescents (n = 5)			Adults (n = 4)		
	Ia (n = 6)	Ib (n = 3)	IX α (n = 2)	Ia (n = 3)	Ib (n = 1)	IIIa (n = 1)	Ia (n = 2)	Ib (n = 1)	IX α (n = 1)
Energy (kcal)	2113.2 \pm 160.4	2195.3 \pm 279.2	1791.5	2689.7 \pm 257.2	2481.7	2308.7	3219.5	2372.7	2983.0
Cornstarch (g/kg/day)	6.4 \pm 1.1	10.9 \pm 1.1	5.8	5.3 \pm 1.1	5.6	4.2	6.7	4.8	1.7
Protein (kcal)	61.2 \pm 7.5	75.7 \pm 10.0	58.7	103.7 \pm 13.7	48.7	73.3	69.8	74.7	133.0
Vitamin B6 (mg)	2.2 \pm 0.3	2.0 \pm 0.2	0.9	3.0 \pm 0.4	2.6	3.6	2.7	3.6	1.7
Vitamin B12 (mcg)	5.9 \pm 0.8	3.6 \pm 0.8	1.6	8.4 \pm 1.4	3.1	5.3	2.4	9.8	4.3
Vitamin D (IU)	227.3 \pm 76.9	234.7 \pm 7.8	70.3	699.3 \pm 90.7	201.0	310.0	404.3	213.0	152.3
Vitamin K (mcg)	93.9 \pm 18.3	20.0 \pm 24.1	1.3	113.0 \pm 36.5	117.0	71.0	65.0	72.0	9.0
Calcium (mg)	709.7 \pm 118.5	427.7 \pm 303.5	405.0	905.0 \pm 175.1	1119.0	926.7	650.0	289.0	789.3
Phosphorus (mg)	649.5 \pm 64.4	746.7 \pm 119.6	710.7	886.7 \pm 135.8	561.3	774.7	665.0	794.7	1491.0
Potassium (mg)	1098.0 \pm 154.9	1194.0 \pm 91.7	1443.5	1423.7 \pm 342.7	783.3	1247.0	1537.7	1278.7	3160.0

Data refer to both food intake, obtained from the 3-day food diary, and supplementation.

Values expressed as median and standard error, except for adolescents and adults with GSD Ib, IIIa and IX α (given as mean).

N=20 (Ia:11; Ib: 5; III: 1; IX α : 3). 3 patients did not complete the food diary. Age range: children, 0 to 11 years; adolescents, 12 to 19 years; adults, 20 years or older.

Table S7 - Hepatic Glycogenesis: comparison among studies that evaluated BMD using DXA

Reference	Country	Sample (n, type GSD)	Age (y)	BMI (kg/m ²)	Treatment	DXA			Biomarkers bone turnover		Biochemical/ nutritional Biomarkers	Criteria for adherence- metabolic control
						Skeletal sites/equipment	Diagnostic criteria	BMD findings	Types	Results		
Rake et al. (2003)	The Netherlands	29 GSD Ia Prepubertal=8 Adolescents=12 Adults=9 Not controlled.	15.7 (median)	NA	Galactose and fructose intake restricted (all patients). Frequent meals during the daytime and: -GDF overnight (n=4); -UCCS during the daytime and continuous GDF overnight (n= 19); -UCCS during the daytime and overnight (n= 6).	Lumbar spine. DXA = Hologic QDR 1000, Hologic, Inc., Waltham, MA, USA.	Low BMD Z-score ≤2.0	Low BMD Adolescents=12/12 Adults=9/9	NA	NA	Cholesterol negatively correlated with BMD. BMD does not depend on the metabolic control.	Plasma cholesterol and triglycerides, and urinary excretion of lactate. Optimal / Intermediate / Non-optimal: Prepubertal= 1 / 4 / 3 Adolescents= 4 / 6 / 2 Adults= 2 / 4 / 3
Cabrera Abreu et al. (2004)	United Kingdom	14 GSD (I=6; III=4; IX=4)**. Not controlled.	I=21.5 III=31.1 IX=31.1 (means)	NA	Gastrostomy (I=1); Protein supplementation (III=1); Protein, calcium and vitamin supplementation (III=1); Normal diet (I=5; III=2; IX=4).	Total body; spine; right and left hips. DXA= Lunar DPX-L pencil beam densitometer, GE Medical Systems, Waukesha, Wisconsin, USA, Software 13Z.	Low BMD Z-score -1 to -2.5 Very low BMD Z-score <-2.5	Very low BMD I=1/6 Low BMD I=5/6 III=2/4 IX=1/4	PICP; PINP; CTX; bone- specific ALP (serum).	No consistent pattern either within or between GSD groups. No correlation between any markers of bone and total body BMD Z- score. The patient with the lowest total body BMD Z- score showed the highest ratios of both urinary fPYD: creatinine and fDPD: creatinine.	NA	NA
Mundy et al. (2008)	United Kingdom	15 GSD III (IIIa=12; IIIb=3). 15 control subjects.	IIIa=23.6 IIIb=26.5 (means) Mean difference controls and	IIIa=23.5 IIIb=22.3 (means)	Not clearly described in the manuscript.	Adults: Whole body; lumbar spine; both hips. Children: Whole body; lumbar spine;	Low BMD Z- score <-2.0	Low BMD 40% patients for total body, 64% for lumbar spine and 11% for hip. GSD IIIa patients showed lower bone mass for the	NA	NA	No differences in the plasmatic calcium, 25(OH)D, ALP or PTH levels when compared with control subjects.	NA

			patients: 1.49, p=0.05.			DXA = GE Lunar Prodigy, GE Healthcare, Hertfordshire, UK.		whole body and lumbar spine than GSD IIIb patients.				
Minarich et al. (2012)	USA	54 GSD I (Ia=42; Ib=12) Not controlled.	Ia=28.8 Ib= 29.7 (medians)	NA	Not clearly described in the manuscript.	Lumbar spine and either the left hip or total body less head. No details about bone scan method.	Low BMD Z-score <-2.0	Low BMD Ia=23/42 Ib=8/12	NA	NA	GSD Ia: mean serum 25(OH)D level was higher in patients with low BMD than in patients with normal BMD.	NA
Melis et al. (2014)*	Italy	38 GSD I (Ia=29; Ib=9). 58 control subjects.	Ia=11.4 Controls=12.1 Ib=14.2 Controls=17.8 (means)	Ia=22.1 Controls = 21.0 Ib=24.3 Controls=24.1 (means)	UCCS during the day, and nocturnal GDF (Ia=22; Ib=2); Only UCCS (Ia=7; Ib=7). UCCS dosage ranged between 1-1.5 g/kg/meal.	Lumbar spine DXA = Hologic QDR 1000; Hologic Inc., Waltham, Mass., USA.	Osteopenia Z-score <-1.0 Osteoporosis : Z-score <-2.5	DXA Z-score Ia= -1.4 Ib= -1.7 (means)	Serum CTX; urinary NTX and hydroxyproline; OC.	Increased levels of CTX, NTX and hydroxyproline in patients.	Calcitonin was positively correlated with insulin and inversely correlated with PTH in GSD Ia. DXA Z-score was correlated with lactic acid (r=-0.89, p=0.03) and insulin (r= 0.67, p=0.04).	Mean values of serum glucose, lactate, uric acid, triglycerides, insulin and free IGF-I over a period of 5 consecutive years before enrollment. Good / Poor adherence Ia= 14 / 15 Ib= 7 / 2
Melis et al. (2016)*	Italy	9 GSD III (IIIa=4; IIIb=5). 18 control subjects.	IIIa=12.5 IIIb=7.5 (medians) Controls matched to age and sex.	No significant differences in BMI were observed between patients and controls.	UCCS during day and night for all patients; Protein supplementation (4 patients). The dose of UCCS ranged between 0.50-0.80 g/kg/meal.	Lumbar spine. DXA = Hologic QDR 1000; Hologic Inc., Waltham, Mass., USA.	DXA: Z-scores reference values according to the manufacturer's internal reference database.	The patients presented a lower DXA Z-score (-1.21 vs 0.74, p=<0.05) and QUS (-2.10 vs 0.13, p=<0.05) when compared with controls.	ALP; CTX; OC (serum).	Patients had lower levels of OC and increased levels of CTX than controls.	GSD III patients showed decreased levels of calcitonin. DXA Z-score is inversely correlated with total cholesterol levels and triglycerides.	NA
Kaiser et al. (2019)	Switzerland	25 GSD I (Ia=22; Ib=3) No control subjects.	Ia=19 Ib=22 (medians)	Ia=21.7 Ib=25.2 (medians)	Regular carbohydrate intake. -UCCS during daytime (17 patients). Type of night-time nutrition for adults: UCCS=12 GDF=4	Lumbar spine; Hip. No details about DXA machine in the manuscript.	Low BMD Z-score <-2.0	Low BMD Ia=6/22 Ib=2/3 Mean Z-scores were lower at the lumbar spine compared to the hip.	NA	NA	Z-score correlated negatively with serum lactate in GSD Ia patients presenting normal bone age.	NA

		Type of night-time nutrition for children: UCCS=2 GDF=7										
This study	Brazil	23 GSD I (Ia=13; Ib=5; IIIa=2; IXα=3). No control subjects.	Ia=13.1 Ib=10.8 IIIa=14.2 IXα=11.7 (medians)	Ia=27.6 Ib=21.9 IIIa=25.3 IXα=19.1 (medians)	UCCS 4 to 8 times a day for all patients; median dose 6.3 g/kg/day. The diet for GSD I patients includes restriction of sucrose, fructose, galactose and lactose. For types III and IX, the restriction of sucrose and high-protein diet is recommended	Adults: Lumbar spine; proximal femur. Children: Lumbar spine; total body. DXA = Lunar Prodigy Primo device; Encore version 14.1, Radiation Corporation, Madison, WI.	Low BMD Z-score ≤-2.0	Low BMD Ia=1/13 IIIa=2/2 Normal BMD Ia=12/13 Ib=5/5 IIIa=0/2 IXα=3/3	CTX; P1NP; OC (serum).	CTX, OC and P1NP correlated negatively both with caloric intake and body weight.	No correlations between biochemical biomarkers and BMD. Phosphorus, calcium, and potassium intakes were below the dietary requirements, even after nutritional supplementation intake	Serum triglyceride (the measurement closest to the date of DXA), glucose and lactate concentrations (median value of the previous 24 months-measurements). Good / Poor adherence Ia=3 / 10 Ib=4 / 1 IIIa=2 / 0 IXα=2 / 1

GSD: Hepatic glycogen storage diseases. Y: years. BMI: Body mass index. DXA: Dual-energy X ray absorptiometry. BMD: Bone mineral density. GDF: *gastric drip feeding*. UCCS: uncooked cornstarch. P1NP: Procollagen Type I C-terminal Propeptide. P1NP: procollagen type 1 N-terminal propeptide. CTX: collagen type 1 C-terminal telopeptide. fPYD: Free pyridinoline. Fdpd: Free deoxypyridinoline. ALP: alkaline phosphatase. PTH: parathyroid hormone. USG: Ultrasonography. NTX: N-terminal telopeptides. IGF: insulin-like growth factor. OC: Osteocalcin. QUS: quantitative ultrasound. 25(OH)D: 25-OH vitamin D.

* = BMD was also evaluated using quantitative ultrasonography. Lateral surfaces of the fingers (II–V; nondominant hand) in the proximity of the condyles QUS = DBM Sonic 1,200 apparatus; IGEA, Carpi, Italy. Z score, on the basis of the standards provided by the manufacturer. ** = subtypes were not identified by the authors. NA = not available.

8. CONCLUSÕES

As conclusões da presente dissertação serão apresentadas abaixo, de acordo com os objetivos específicos.

- 1) *Investigar a associação da densidade mineral óssea com achados clínicos, bioquímicos, de tratamento em pacientes com glicogenoses hepáticas;*

Os resultados evidenciaram que os pacientes com GSD hepáticas podem ter metabolismo ósseo alterado; no entanto, apresentam uma baixa prevalência de redução da DMO em comparação com o descrito na literatura até o momento. Não observamos correlação entre dados bioquímicos e clínicos com a DMO.

- 2) *Estudar a associação da densidade mineral óssea e o controle metabólico e nutricional nas glicogenoses hepáticas;*

A DMO não apresentou associação com o controle metabólico e nutricional. Foi observado consumo aumentado de energia, vitaminas B6 e B12, além da insuficiência na ingestão de vitamina D, cálcio, fósforo e potássio. Mesmo após vigência da suplementação, a necessidade diária não foi atingida para cálcio e potássio em todos os pacientes e vitamina D, K e fósforo para tipo III e IX α .

- 3) *Avaliar a associação da densidade mineral óssea com os níveis de osteocalcina, propeptídeo N-terminal do procolágeno de tipo 1 e telopeptídeo C-terminal do colágeno 1 em pacientes com glicogenoses hepáticas;*

Os três marcadores de metabolismo ósseo estudados correlacionaram-se negativamente com o peso corporal. A maioria dos pacientes apresentaram excesso de peso. Os marcadores de formação óssea OC e PINP associaram-se negativamente ao consumo calórico. Não foi observada correlação entre a DMO e os marcadores do metabolismo ósseo.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS


A partir dos achados, percebe-se que os indivíduos brasileiros com GSD hepática, apresentam uma prevalência de baixa DMO inferior ao observado em coortes internacionais. No entanto, observamos a necessidade de realização de estudos prospectivos e de coorte com tamanho amostral mais expressivo, que possam esclarecer a relação entre a baixa DMO e as GSD hepáticas, e os fatores envolvidos na redução da DMO nestes pacientes.

Faz-se necessário, também, mais estudos que busquem entender o mecanismo envolvido no desenvolvimento de complicações nas GSD hepáticas, visto que há lacunas em diversos aspectos envolvidos neste processo. Sendo necessário entender os fatores envolvidos na fisiopatologia, evitando, reduzindo ou retardando as complicações tão comuns nas GSDs.

Sugere-se também, estudos que objetivem avaliar a DMO de pacientes com GSD, relacionando o nível de atividade física, densidade e força muscular.

10. APÊNDICES

10.1 Apêndice 1 – Carta de aprovação do projeto 14-0120



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO CIENTÍFICA

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

Projeto: 140120
Data da Versão do Projeto:

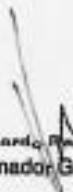
Pesquisadores:
IDA VARESSA DOEDERLEN SCHWARTZ
CAROLINA FISCHINGER NOURA DE SOUZA
ANA PAULA VANZ
TÁSSIA TONON
FILIPPO PINTO VAIRO

Título: AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CORPORAL E ANÁLISE DO ÂNGULO DE FASE A PARTIR DA BIOIMPEDÂNCIA ELÉTRICA EM PACIENTES COM GLICOGÊNOSE HEPÁTICA

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 08 de maio de 2014.


Prof. Eduardo Randolf Passos
Coordenador GPPG/HCPA

10.2 Apêndice 2 – Carta de aprovação do projeto 15-0218



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO CIENTÍFICA

À Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

Projeto: 150218

Data da Versão do Projeto: 08/05/2015

Pesquisadores:

IDA VANESSA DOEDERLEIN SCHWARTZ

LILIA FARRET REPOSCO

POLI MARA SPRITZER

SANDRA LEITNER SEGAL

KRISTIANE MICHELIN TIRELLI

MARINA SIEBERT

OSVALDO ALFONSO PINTO ARTIGALÍS

ANA PAULA VANZ

FERNANDA SPERB LUDWIG

TATIELE NALIN

ACACIO APARECIDO NAVARRIETE

NAMILA CASTRO GRIKOSKI

CHENIA CALDEIRA MARTINEZ

BANCA LÓCIA HEINECK

FLAVIA ROMARIZ FERREIRA

TACIANE BORBATTO

GIOVANA REGINA WEBER

VITOR BERTOLOZZI MENDES

LUIZ FERNANDO WURDIG ROESCH

FELIPE PINHEIRO DE OLIVEIRA

FLIPPO PINTO VAIRO

VICTOR SATLER PYLRO

CAROLINA FISCHINGER MOURA DE SOUZA

ROBERTA HACK MENDES

Título: Metagenoma Microbiótico como fator modificador dos Erros Inatos do Metabolismo.



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

COMISSÃO CIENTÍFICA

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 29 de maio de 2015.


Prof. José Roberto Jardim
Coordenador CEP/HCPA

10.3 Apêndice 3 – Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes – projeto 14-0120

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE e ESCLARECIDO – PACIENTES

Projeto: Avaliação da composição corporal e análise do ângulo de fase a partir da bioimpedância elétrica em pacientes com Glicogenose hepática

Pesquisador responsável: **Dra. Ida Vanessa D. Schwartz. Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.** Rua Ramiro Barcelos, 2350. Porto Alegre-RS. Tel: 51-3359 8011.

Nome do paciente: _____

Prezado paciente (ou responsável),

Gostaríamos de convidá-lo para participar de um estudo onde será avaliado o estado nutricional de pacientes com Glicogenose (GSD) e de controles (pessoas sem essa condição). A GSD é uma doença hereditária causada por falta de uma enzima do fígado, dependendo do tipo de GSD, diferentes enzimas estão faltando. Quando não temos uma dessas enzimas e temos então GSD, nas situações em que ficamos em jejum, não conseguimos manter o açúcar do sangue normal.

O açúcar baixo no sangue traz como sintomas: tremores, suor frio, cansaço fácil, sonolência e até convulsão (ataque). O tratamento é a alimentação frequente, com alimentos que mantêm os níveis de açúcar no sangue elevados por mais tempo, como é o caso do amido de milho (Maisena) cru.

Alguns estudos mostraram que podem ocorrer alterações no estado nutricional de pacientes com GSD, como excesso de peso. Estamos realizando, por isso, um estudo com o objetivo de avaliar o estado nutricional, através de um aparelho chamado Bioimpedância Elétrica (BIA), em pacientes com diagnóstico de GSD.

Serão coletados dados de prontuário, como por exemplo, idade, tipo de Glicogenose, valores de glicose, peso e estatura. Será realizada a Bioimpedância Elétrica (BIA), que objetiva avaliar a quantidade de gordura, líquido e músculo do corpo. Esse aparelho é composto por 4 eletrodos descartáveis (adesivos que irão auxiliar a passagem da corrente elétrica) que serão colocados no braço e no pé do paciente e que, através de uma corrente elétrica de baixa intensidade e inofensiva, pode informar as medidas que estamos estudando. Esse exame é indolor e não invasivo.

Estima-se que para realizar as avaliações serão necessários entre 30 minutos e 1 hora.

RISCOS E BENEFÍCIOS

Não são conhecidos riscos relacionados aos procedimentos do estudo, o que pode ocorrer é você/seu filho(a) sentir-se desconfortável com passagem de baixa corrente elétrica durante a BIA. Os benefícios consistem na realização de uma avaliação nutricional mais detalhada, e que, talvez, permita a identificação de alguma alteração do seu estado nutricional. Caso isto aconteça, o seu médico ou nutricionista será comunicado e os ajustes necessários ao seu tratamento serão realizados.

DÚVIDAS

Se você tiver alguma dúvida em relação à pesquisa, deve contatar a Dra. Ida Vanessa D. Schwartz (Fone: (51) 3359 8011), no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Além disso, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, que aprovou esse projeto, através do telefone (51) 3359 7640 ou localmente no segundo andar do HCPA na rua Ramiro Barcelos, 2.350, Bairro Santa Cecília, Porto Alegre / RS, horário de funcionamento, das 8h às 17h, de segunda à sexta.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO NA PARTICIPAÇÃO DO ESTUDO

Sua participação no estudo é voluntária. Se você decidir não participar do estudo, isto não afetará em nada o seu tratamento no HCPA. A sua participação pode também ser interrompida a qualquer momento por você mesmo (a). Em qualquer caso, você não será penalizado (a).

CONFIDENCIALIDADE DAS INFORMAÇÕES

As informações dessa pesquisa serão mantidas em sigilo, sendo apenas utilizadas de forma científica e sem identificação do seu nome em relatos especializados. Caso alguma informação derivada desse estudo for importante a você, todo esforço será realizado para informá-lo.

Pelo presente termo, você declara que foi informado (a), de forma clara e detalhada, sobre a presente pesquisa e que teve suas dúvidas esclarecidas por_____.

Declara ter sido esclarecido que não receberá nenhuma remuneração financeira pela participação no estudo e que não terá custos por participar do mesmo. Declara que foi informado da garantia de receber resposta ou esclarecimento sobre a pesquisa a ser realizada, bem como da liberdade de não participar do estudo e da possibilidade de desistir, em qualquer momento, da participação. Além disso, declara que assinou duas vias deste consentimento e que uma ficou em seu poder.

Data: ___/___/_____

Paciente: _____

Responsável legal: _____

Eu expliquei a _____ os objetivos e procedimentos necessários para esta pesquisa e entreguei cópia deste termo de consentimento para o mesmo.

Data: ____/____/____

Pesquisador: _____

10.4 Apêndice 4 – Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes adultos – projeto 15-0218

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PACIENTES ADULTOS)

Caro participante:

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário, do projeto: “**Metagenoma Microbiótico como fator modificador dos Erros Inatos do Metabolismo**”.

Os Erros Inatos do Metabolismo (EIM) são doenças genéticas, raras individualmente, mas, frequentes como grupo. O sistema mais acometido nos EIM é o neurológico, além disso, a síndrome metabólica/obesidade tem sido cada vez mais relatada como uma das complicações associadas ao seu tratamento. Existe uma ampla diferença clínica e laboratorial associada aos EIM, inclusive no que diz respeito à resposta ao tratamento e a razão para esse achado não é, na maioria dos casos, compreendida. Por fim, o envolvimento do sistema imunológico, que é responsável por defender nosso corpo, não tem sido muito estudado entre os pacientes com EIM. Uma das substâncias que podem ser avaliadas do sistema imunológico são as citocinas (moléculas que são produzidas por células específicas do sistema imunológico e emitem sinais localmente entre células e, assim, tem um efeito em outras células). As citocinas podem ser indutoras da inflamação (pró-inflamatórias) ou combaterem a inflamação (antiinflamatórias). No que diz respeito ao sistema ósseo, também há muitas questões não compreendidas quando se trata de pacientes com EIM. Para auxiliar na compreensão do envolvimento do sistema ósseo nestes pacientes, existem algumas substâncias que podem ser avaliadas, conhecidas como marcadores de *turnover* ósseo (substâncias que demonstram como está a formação e desgaste do osso).

A sua participação é voluntária e consistirá na coleta de amostras de fezes, coleta de amostra de sangue, exame de Densitometria Óssea (DXA) e Calorimetria Indireta, todos realizados apenas uma vez.

A coleta de fezes será realizada pelo próprio participante, com auxílio de familiares se necessário e ocorrerá em suas próprias residências. A coleta para este estudo será semelhante à coleta de fezes feita para exames clínicos de rotina, utilizando um pote coletor. As fezes serão

utilizadas para extrair o material genético (DNA) das bactérias presentes nas fezes, a fim de identificá-las. Também será realizada coleta de uma amostra de sangue por um profissional treinado, para análise dos níveis de citocinas.

O exame de DXA será realizado por um profissional treinado e você precisa seguir as seguintes recomendações para a realização deste exame: Ingerir no mínimo 8 copos de água (2 litros) no dia anterior à realização do exame, ou, para as crianças, o recomendado é ingerir uma quantidade maior do que a de costume e informar o pesquisador no dia da consulta a quantidade de água ingerida; não fazer ginástica ou exercícios vigorosos no dia anterior ao exame; evitar ingerir 24h (1 dia) antes do exame álcool, chá, café, refrigerantes, chocolates e bebidas energéticas que contenham cafeína; retirar jóias, relógio ou outros objetos metálicos no dia da realização do exame; estar em jejum de 12h. Essas orientações serão lembradas a você um dia antes da consulta a qual iremos agendar.

Também será realizada calorimetria indireta, para avaliar o gasto energético basal, ou seja, quanta energia é necessária para o corpo manter as funções vitais. Para a realização deste exame será necessário que você permaneça deitado por aproximadamente 20 minutos com o equipamento.

A pesquisa também prevê coleta de informações clínicas que podem durar até 20 minutos e os participantes ou responsáveis terão liberdade para não responder algum item caso não se sintam à vontade.

O participante ou responsável não precisa pagar nenhum tipo de taxa para participar da pesquisa. Os participantes voluntários da pesquisa não receberão qualquer forma de pagamento pela participação na pesquisa. É garantido o direito de recusar participar do projeto, além do direito de retirar o consentimento para a pesquisa em qualquer momento e de solicitar que todos os dados e amostra sejam apagados e destruídos, sem causar qualquer prejuízo à assistência e aos tratamentos que estiverem sendo, ou vierem a ser, dispensados a você e à sua família no Hospital.

A identidade do participante não será revelada. Esta é uma pesquisa sigilosa e garantido o anonimato dos participantes do projeto, isto significa que somente os pesquisadores responsáveis pela pesquisa terão acesso à identidade dos participantes e comprometem-se a não divulgá-las sem o consentimento destes. Os resultados da pesquisa serão divulgados em revistas científicas que circulem entre os profissionais que tenham interesse nessa área e, sua identidade, assim como a de sua família, não será divulgada nestas publicações.

Os riscos e desconfortos causados pela coleta de fezes são desconforto no momento da coleta. O desconforto associado a esta coleta será minimizado pelo fato de ser realizada na própria residência. Os riscos e desconfortos causados pela coleta de sangue são semelhantes aos riscos envolvidos na coleta de sangue para exames laboratoriais de rotina (manchas roxas e dor no local da coleta). O desconforto e os riscos associados a estas avaliações serão minimizados pela realização da coleta por profissional treinado. Possível desconforto para responder as perguntas do questionário é o gasto de tempo (cerca de 20 minutos) para responder ao questionário. Você tem direito de interromper a participação a qualquer momento.

Cabe salientar que esse estudo talvez não traga benefícios para você ou o pelo qual você é responsável, mas, pode contribuir para um melhor entendimento desta doença e a melhorar, futuramente, o acompanhamento e tratamento dos pacientes com Erros Inatos do Metabolismo.

Em relação aos procedimentos do estudo, você declara que autorizou ao(s) seguinte(s) procedimento(s); (marcar com um X):

- coleta de amostra de fezes para análise de DNA de bactérias
- coleta de 9mL de sangue para análise de citocinas e marcadores de *turnover* ósseo.
- realização de densitometria óssea
- realização de calorimetria indireta
- preenchimento de questionário

Se você permitir, o material coletado que restar após a realização dos exames previstos neste estudo, serão armazenados por cinco anos e poderão ser utilizados, neste período, em estudos aprovados eticamente pelos órgãos ou comissões responsáveis. Em relação ao armazenamento e utilização de algum material (sangue e fezes) que tenha restado após a realização dos exames previstos neste estudo, você declara que autorizou:

que este material poderá ser armazenado por cinco anos e poderá vir a ser utilizado em estudos futuros, aprovados eticamente pelos órgãos ou comissões responsáveis, desde que você revise e assine o termo de consentimento de tais estudos futuros. Após cinco anos, este material será obrigatoriamente descartado.

que este material não poderá ser armazenado por cinco anos e não poderá vir a ser utilizado em estudos futuros aprovados eticamente pelos órgãos ou comissões responsáveis. O

material coletado deverá ser utilizado somente neste estudo e o material que sobrar não deverá ser armazenado, sendo obrigatoriamente descartado.

A pesquisadora responsável pelo desenvolvimento do projeto é a profa Ida Vanessa D. Schwartz do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A pesquisadora responsável coloca-se a disposição para esclarecer qualquer dúvida referente ao projeto, assim como, para fornecer aos participantes acesso às suas informações pessoais do projeto. Em caso de necessidade, pode ser feito contato com a Dra. Ida Vanessa D. Schwartz, pesquisadora responsável no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo fone (51) 3359-8011 ou, pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, que aprovou esse projeto, através do telefone (51) 3359 8304. O horário de atendimento para os contatos acima é de segunda à sexta feira, das 8h às 17h.

Caso você decida participar deve assinar este documento em duas vias, sendo que uma ficará com você e a outra via ficará com a pesquisadora responsável.

Data: ____/____/____

Paciente: _____

Responsável legal: _____

Eu expliquei a _____ os objetivos e procedimentos necessários para esta pesquisa, e entreguei cópia deste termo de consentimento para o mesmo.

Data: ____/____/____

Pesquisador Nome: _____

Pesquisador Assinatura: _____

10.5 Apêndice 5 – Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes com menos de 18 anos – projeto 15-0218

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PACIENTES MENORES)

Caro responsável:

Seu filho(a) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário, do projeto: **“Metagenoma Microbiótico como fator modificador dos Erros Inatos do Metabolismo”**.

Os Erros Inatos do Metabolismo (EIM) são doenças genéticas, raras individualmente, mas frequentes como grupo. O sistema mais acometido nos EIM é o neurológico, além disso, a síndrome metabólica/obesidade tem sido cada vez mais relatada como uma das complicações associadas ao seu tratamento. Existe uma ampla diferença clínica e laboratorial associada aos EIM, inclusive no que diz respeito à resposta ao tratamento e a razão para esse achado não é, na maioria dos casos, compreendida. Por fim, o envolvimento do sistema imunológico, que é responsável por defender nosso corpo, não tem sido muito estudado entre os pacientes com EIM. Uma das substâncias que podem ser avaliadas do sistema imunológico são as citocinas (moléculas que são produzidas por células específicas do sistema imunológico e emitem sinais localmente entre células e, assim, tem um efeito em outras células). As citocinas podem ser indutoras da inflamação (pró-inflamatórias) ou combaterem a inflamação (antiinflamatórias). No que diz respeito ao sistema ósseo, também há muitas questões não compreendidas quando se trata de pacientes com EIM. Para auxiliar na compreensão do envolvimento do sistema ósseo nestes pacientes, existem algumas substâncias que podem ser avaliadas, conhecidas como marcadores de *turnover* ósseo (substâncias que demonstram como está a formação e desgaste do osso).

A sua participação é voluntária consistirá na coleta de amostras de fezes, coleta de amostra de sangue, exame de Densitometria Óssea (DXA) e Calorimetria Indireta, todos realizados apenas uma vez.

A coleta de fezes será realizada pelo próprio participante, com auxílio de familiares se necessário e ocorrerá em suas próprias residências. A coleta para este estudo será semelhante à

coleta de fezes feita para exames clínicos de rotina, utilizando um pote coletor. As fezes serão utilizadas para extrair o material genético (DNA) das bactérias presentes nas fezes, a fim de identificá-las. Também será realizada coleta de uma amostra de sangue por um profissional treinado, para análise dos níveis de citocinas.

O exame de DXA será realizado por um profissional treinado e seu filho(a) precisa seguir as seguintes recomendações para a realização deste exame: Ingerir no mínimo 8 copos de água (2 litros) no dia anterior à realização do exame ou, para as crianças, o recomendado é ingerir uma quantidade maior do que a de costume e informar o pesquisador no dia da consulta a quantidade de água ingerida; não fazer ginástica ou exercícios vigorosos no dia anterior ao exame; evitar ingerir 24h (1 dia) antes do exame álcool, chá, café, refrigerantes, chocolates e bebidas energéticas que contenham cafeína; retirar jóias, relógio ou outros objetos metálicos no dia da realização do exame; estar em jejum de 12h. Essas orientações serão lembradas um dia antes da consulta de seu filho(a), a qual iremos agendar.

Também será realizada calorimetria indireta, para avaliar o gasto energético basal, ou seja, quanta energia é necessária para o corpo manter as funções vitais. Para a realização deste exame será necessário seu filho(a) permaneça deitado por aproximadamente 20 minutos com o equipamento.

A pesquisa também prevê coleta de informações clínicas que podem durar até 20 minutos e os participantes ou responsáveis terão liberdade para não responder algum item caso não se sintam à vontade.

O participante ou responsável não precisa pagar nenhum tipo de taxa para participar da pesquisa. Os participantes voluntários da pesquisa não receberão qualquer forma de pagamento pela participação na pesquisa. É garantido o direito de recusar participar do projeto, além do direito de retirar o consentimento para a pesquisa em qualquer momento e de solicitar que todos os dados e amostra sejam apagados e destruídos, sem causar qualquer prejuízo à assistência e aos tratamentos que estiverem sendo, ou vierem a ser, dispensados ao seu filho(a) e à sua família no Hospital.

A identidade do participante não será revelada. Esta é uma pesquisa sigilosa e garantido o anonimato dos participantes do projeto, isto significa que somente os pesquisadores responsáveis pela pesquisa terão acesso à identidade dos participantes e comprometem-se a não divulgá-las sem

o consentimento destes. Os resultados da pesquisa serão divulgados em revistas científicas que circulam entre os profissionais que tenham interesse nessa área e sua identidade, assim como a de sua família, não será divulgada nestas publicações.

Os riscos e desconfortos causados pela coleta de fezes são desconforto no momento da coleta. O desconforto associado a esta coleta será minimizado pelo fato de ser realizada na própria residência. Os riscos e desconfortos causados pela coleta de sangue são semelhantes aos riscos envolvidos na coleta de sangue para exames laboratoriais de rotina (manchas roxas e dor no local da coleta). O desconforto e os riscos associados a estas avaliações serão minimizados pela realização da coleta por profissional treinado. Possível desconforto para responder as perguntas do questionário é o gasto de tempo (cerca de 20 minutos) para responder ao questionário. Você tem direito de interromper a participação de seu filho(a) a qualquer momento.

Cabe salientar que esse estudo talvez não traga benefícios para seu filho (a), mas pode contribuir para um melhor entendimento desta doença e a melhorar, futuramente, o acompanhamento e tratamento dos pacientes com Erros Inatos do Metabolismo.

Em relação aos procedimentos do estudo, você declara que autorizou ao(s) seguinte(s) procedimento (s) (marcar com um X):

- coleta de amostra de fezes para análise de DNA de bactérias
- coleta de 9mL de sangue para análise de citocinas e marcadores de *turnover* ósseo.
- realização de densitometria óssea
- realização de calorimetria indireta
- preenchimento de questionário

Se você permitir, o material coletado que restar após a realização dos exames previstos neste estudo, serão armazenados por cinco anos e poderão ser utilizados, neste período, em estudos aprovados eticamente pelos órgãos ou comissões responsáveis. Em relação ao armazenamento e utilização de algum material (sangue e fezes) que tenha restado após a realização dos exames previstos neste estudo, você declara que autorizou:

- que este material poderá ser armazenado por cinco anos e poderá vir a ser utilizado em estudos futuros aprovados eticamente pelos órgãos ou comissões responsáveis, desde que você

revise e assine o termo de consentimento de tais estudos futuros. Após cinco anos, este material será obrigatoriamente descartado.

() que este material não poderá ser armazenado por cinco anos e não poderá vir a ser utilizado em estudos futuros aprovados eticamente pelos órgãos ou comissões responsáveis. O material coletado deverá ser utilizado somente neste estudo, e o material que sobrar não deverá ser armazenado, sendo obrigatoriamente descartado.

A pesquisadora responsável pelo desenvolvimento do projeto é a profa Ida Vanessa D. Schwartz do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A pesquisadora responsável coloca-se a disposição para esclarecer qualquer dúvida referente ao projeto, assim como para fornecer aos participantes acesso às suas informações pessoais do projeto. Em caso de necessidade pode ser feito contato com a Dra. Ida Vanessa D. Schwartz, pesquisadora responsável no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo fone (51) 3359-8011 ou pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, que aprovou esse projeto, através do telefone (51) 3359 8304. O horário de atendimento para os contatos acima é de segunda à sexta feira, das 8h às 17h.

Caso você autorize seu filho(a) a participar deve assinar este documento em duas vias, sendo que uma ficará com você e a outra via ficará com a pesquisadora responsável.

Data: ___/___/_____

Paciente: _____

Responsável legal: _____

Eu expliquei a _____ os objetivos e procedimentos necessários para esta pesquisa, e entreguei cópia deste termo de consentimento para o mesmo.

Data: ___/___/_____

Pesquisador Nome: _____


Pesquisador Assinatura: _____

10.6 Apêndice 6 – Resumo publicado nos anais do *Journal of Inborn Errors of Metabolism and Screening* - 2019


Journal of
**INBORN ERRORS
of METABOLISM
and SCREENING**

Editor-in-Chief: Roberto Giugliani

— — — — —

 Latin American Society of
Inborn Errors of Metabolism
and Neonatal Screening

SPECIAL SUPPLEMENT WITH THE ABSTRACTS

 **IGSD2019**

5th International GSD Conference
BarraShoppingSul
Porto Alegre/RS - Brazil

14 -16 November 2019

2566 - BONE MINERAL DENSITY AND BONE TURNOVER MARKERS IN PATIENTS WITH HEPATIC GLYCOGEN STORAGE DISEASES

Jésica Tamara Jacoby (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil), **Bruna Bento dos Santos** (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil), **Tatiele Nalin** (Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil), **Lilia Farret Refosco** (Hospital das Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil), **Carolina Fischinger Souza** (Hospital das Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil), **Poli Mara Spritzer** (Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil), **Soraia Poloni** (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil), **Roberta Hack Mendes** (University College Dublin, Ireland), **Ida Vanessa Doederlein Schwartz** (Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil)

INTRODUCTION: Reduced bone mineral density (BMD) has been described in patients with hepatic Glycogen Storage Disease (GSDs). Although its mechanisms are not well understood, these patients are at risk of developing osteoporosis. Fractures are directly linked to osteoporosis/osteopenia, but currently there is no clear evidence that fractures are more frequent in GSD patients. Bone turnover markers are a series of biomarkers released during bone remodeling that respond rapidly to changes in

bone physiology, and have been employed to estimate fracture risk and monitoring the adherence and response to therapy in patients with osteoporosis. **Aim:** To evaluate bone turnover markers in patients with GSDs on treatment and to verify their association with BMD. **METHODS:** 25 patients with GSDs on uncooked cornstarch treatment at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil, were recruited and agreed to participate of the study. In the same date, bone mineral density was assessed by dual X-ray absorptiometry (DXA) and blood samples were collected to assess bone turnover markers in plasma. Carboxy-terminal collagen crosslinks (CTX), Procollagen type 1 amino-terminal propeptide (P1NP) and Osteocalcin (OC) were measured through an electrochemiluminescence assay. Two patients were not able to perform DXA and had only clinical and biochemical measurements available. **RESULTS:** Out of the 25 patients, 19 (76%) had type I GSD, 14 type Ia and 5 Ib, 3 (12%) type III and 3 (12%) type IX. Mean age was 15 ± 7.9 years, and 52% of patients were female. Median BMD Z-score for lumbar spine was -0.60 (range= -2.3 to +1.1) and for whole body was -0.20 (range: -2.1 to +1.6). Regarding bone turnover markers, 32% of patients had all three markers increased. P1NP was inversely correlated with whole-body BMD Z-score ($r = -0.593$; $p = 0.03$). Patients with GSDs type III and IX had higher CTX (mean= 1.83 ± 0.4) than patients with type I (mean= 1.37 ± 0.5) ($p = 0.026$). All patients ($n = 3$) that had lumbar spine BMD Z-scores lower than -2 had all bone turnover markers increased. One patient (4% of the sample) had history of a non-pathological fracture. He presented normal BMD and increased bone turnover markers, and was on calcium supplementation for about 3 years. **CONCLUSIONS:** Our results showed that bone turnover markers were increased in a great number of GSDs patients and were associated with reduced BMD, suggesting a role for these biomarkers in monitoring bone disease in hepatic GSDs.

10.7 Apêndice 7 - STROBE Statement – Checklist para estudos observacionais

Tabela. Itens essenciais que devem ser descritos em estudos observacionais, segundo a declaração Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE). 2007

Item	Nº	Recomendação	Pág. Nº
Título e Resumo	1	Indique o desenho do estudo no título ou no resumo, com termo comumente utilizado	4
		Disponibilize no resumo um sumário informativo e equilibrado do que foi feito e do que foi encontrado	4
Introdução			
Contexto/ Justificativa	2	Detalhe o referencial teórico e as razões para executar a pesquisa.	15
Objetivos	3	Descreva os objetivos específicos, incluindo quaisquer hipóteses pré-existentes.	37
Métodos			
Desenho do estudo	4	Apresente, no início do artigo, os elementos-chave relativos ao desenho do estudo.	4
Contexto (<i>setting</i>)	5	Descreva o contexto, locais e datas relevantes, incluindo os períodos de recrutamento, exposição, acompanhamento (follow-up) e coleta de dados.	51
Participantes	6	Estudos de Coorte: Apresente os critérios de elegibilidade, fontes e métodos de seleção dos participantes. Descreva os métodos de acompanhamento.	-
		Estudos de Caso-Controle: Apresente os critérios de elegibilidade, as fontes e o critério-diagnóstico para identificação dos casos e os métodos de seleção dos controles. Descreva a justificativa para a eleição dos casos e controles	-
		Estudo Seccional: Apresente os critérios de elegibilidade, as fontes e os métodos de seleção dos participantes	51
		Estudos de Coorte: Para os estudos pareados, apresente os critérios de pareamento e o número de expostos e não expostos	-

		Estudos de Caso-Controle: Para os estudos pareados, apresente os critérios de pareamento e o número de controles para cada caso	-
Variáveis	7	Defina claramente todos os desfechos, exposições, preditores, confundidores em potencial e modificadores de efeito. Quando necessário apresente os critérios diagnósticos.	52
Fontes de dados/ Mensuração	8	Para cada variável de interesse, forneça a fonte dos dados e os detalhes dos métodos utilizados na avaliação (mensuração). Quando existir mais de um grupo, descreva a comparabilidade dos métodos de avaliação.	28
Viés	9	Especifique todas as medidas adotadas para evitar potenciais fontes de viés.	51 e 52
Tamanho do estudo	10	Explique como se determinou o tamanho amostral.	27
Variáveis quantitativas	11	Explique como foram tratadas as variáveis quantitativas na análise. Se aplicável, descreva as categorizações que foram adotadas e porque.	51
Métodos estatísticos	12	Descreva todos os métodos estatísticos, incluindo aqueles usados para controle de confundimento. Descreva todos os métodos utilizados para examinar subgrupos e interações. Explique como foram tratados os dados faltantes (“missing data”) Estudos de Coorte: Se aplicável, explique como as perdas de acompanhamento foram tratadas. Estudos de Caso-Controle: Se aplicável, explique como o pareamento dos casos e controles foi tratado. Estudos Seccionais: Se aplicável, descreva os métodos utilizados para considerar a estratégia de amostragem. Descreva qualquer análise de sensibilidade.	53

Resultados

Participantes	13 ^a	<p>Descreva o número de participantes em cada etapa do estudo (ex: número de participantes potencialmente elegíveis, examinados de acordo com critérios de elegibilidade, elegíveis de fato, incluídos no estudo, que terminaram o acompanhamento e efetivamente analisados)</p> <p>Descreva as razões para as perdas em cada etapa.</p> <p>Avalie a pertinência de apresentar um diagrama de fluxo</p>	51
Dados descritivos	14 ^a	<p>Descreva as características dos participantes (ex: demográficas, clínicas e sociais) e as informações sobre exposições e confundidores em potencial.</p> <p>Indique o número de participantes com dados faltantes para cada variável de interesse.</p> <p>Estudos de Coorte: Apresente o período de acompanhamento (ex: média e tempo total)</p>	53
Desfecho	15 ^a	<p>Estudos de Coorte: Descreva o número de eventos-desfecho ou as medidas-resumo ao longo do tempo</p> <p>Estudos de Caso-Controle: Descreva o número de indivíduos em cada categoria de exposição ou apresente medidas-resumo de exposição.</p> <p>Estudos Seccionais: Descreva o número de eventos-desfecho ou apresente as medidas-resumo.</p>	54
Resultados principais	16	<p>Descreva as estimativas não ajustadas e, se aplicável, as estimativas ajustadas por variáveis confundidoras, assim como sua precisão (ex: intervalos de confiança). Deixe claro quais foram os confundidores utilizados no ajuste e porque foram incluídos.</p> <p>Quando variáveis contínuas forem categorizadas, informe os pontos de corte utilizados.</p> <p>Se pertinente, considere transformar as estimativas de risco relativo em termos de risco absoluto, para um período de tempo relevante.</p>	52
Outras análises	17	Descreva outras análises que tenham sido realizadas. Ex: análises de subgrupos, interação, sensibilidade.	-

Discussão

Resultados principais	18	Resuma os principais achados relacionando-os aos objetivos do estudo.	56
Limitações	19	Apresente as limitações do estudo, levando em consideração fontes potenciais de viés ou imprecisão. Discuta a magnitude e direção de vieses em potencial.	60
Interpretação	20	Apresente uma interpretação cautelosa dos resultados, considerando os objetivos, as limitações, a multiplicidade das análises, os resultados de estudos semelhantes e outras evidências relevantes.	56
Generalização	21	Discuta a generalização (validade externa) dos resultados.	57
Outras Informações			
Financiamento	22	Especifique a fonte de financiamento do estudo e o papel dos financiadores. Se aplicável, apresente tais informações para o estudo original no qual o artigo é baseado.	60

10.8 Apêndice 8 – Finalista melhor pôster da 40ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

03/12/2020

Gmail - Poster 2519 - Finalista no Voto Popular



Jésica Jacoby <nutricionistajesica@gmail.com>

Poster 2519 - Finalista no Voto Popular

4 mensagens

Ursula da Silveira Matte <umatte@hcpa.edu.br>

12 de novembro de 2020 20:11

Para: nutricionistajesica@gmail.com, "Bruna Bento (aluna Ida)" <bruna.bdsantos@hotmail.com>, Tatielle - Slat <tatinalin@gmail.com>, Karina Colonetti - aluna Ida <karinacolonettti@hotmail.com>, Lilia Farret Refosco Lrefosco <lrefosco@hcpa.edu.br>, Carolina Fischinger Moura De Souza Cfsouza <cfsouza@hcpa.edu.br>, spritzer@ufrgs.br, Soraia Poloni - aluna Sandra <soraiaipoloni@yahoo.com.br>, Ida Schwartz <idadschwartz@gmail.com>, Ida Vanessa Doederlein Schwartz ischwartz <ischwartz@hcpa.edu.br>, betamendeshack@gmail.com

Prezados, informo que o pôster 2519, de sua autoria, está concorrendo a Melhor Pôster da 40ª Semana Científica. Convidamos uma das autoras a participar da cerimônia de premiação amanhã pela manhã, às 9:00. O link para ingresso na sala virtual, onde será anunciado o nome do vencedor será enviado a autora cadastradora do trabalho. Caso ela não possa comparecer, solicitamos que indique o representante do grupo.

Parabéns a todas!

Profa. Ursula da Silveira Matte
Professora Departamento de Genética, UFRGS
Laboratório Células Tecidos e Genes, CPE
Assessora

Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
Fone: (51) 3359-8838