

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**ABORDAGEM INOVADORA NO TRATAMENTO DA GLICOGENOSE TIPO IA:
UM ESTUDO BASEADO NO USO DO POLVILHO DOCE**

Vaneisse Cristina Lima Monteiro

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Ida Vanessa Doderlein Schwartz

Coorientadora: Dra. Soraia Poloni

Porto Alegre
Outubro de 2022

Vaneisse Cristina Lima Monteiro

Abordagem inovadora no tratamento da glicogenose tipo Ia: um estudo baseado no uso do polvilho doce

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Aprovada em: 07 de outubro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ida Vanessa Doederlein Schwartz – UFRGS (Orientadora)

Dra. Soraia Poloni – HCPA (Coorientadora)

Prof. Dr. Claiton Henrique Dotto Bau – UFRGS (Relator)

Profa. Dra. Thayne Woycinck Kowalski – UFRGS

Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva – UFPA

Profa. Dra. Roseani da Silva Andrade – UFPA

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

A presente Tese foi desenvolvida na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular do departamento de Genética, utilizando as dependências do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, mais especificamente o Serviço de Genética Médica, o Centro de Pesquisa Clínica e Laboratório de Pesquisa experimental - Laboratório BRAIN – *Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences*. As dependências do Laboratório de Compostos Bioativos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA-UFRGS) também foram utilizadas.

A execução desta tese teve apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), na modalidade bolsa de doutorado; do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e do Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE).

À minha mãe, com imensurável gratidão e amor, pois sem o seu incentivo, suporte emocional e financeiro, a jornada acadêmica atravessando o país não seria possível.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Durante esta jornada de estudos recebi apoio direto, indireto, presencial e remoto. Os agradecimentos são inúmeros.

Início pela minha família, em especial aos meus avós maternos, papai Pedro e mãe Nonata, pelo cuidado e amor enquanto meus pais trabalhavam, mantidos com o passar dos anos, mesmo a distância. À minha mãe por sonhar junto comigo e prover meios para realização. À tia Vanda e Vanessa por incentivar e apoiar. Ao Henrique e Isis pelo afeto, companhia e apoio emocional.

Sigo agradecendo geograficamente, aos amigos de norte a sul que tornam a jornada mais leve, especialmente à Carla, Clebinho, Fernanda, Jaqueline, José, Isis, Gisele, Bibiana, Bruna, Devora, Karina e aos colegas do grupo de pesquisa pela colaboração.

A professora Ida, Soraia e Carolina pelos ensinamentos, orientação, por me integrarem a esse excelente grupo de pesquisa.

Aos meus “pais” na ciência, Luiz e Roseani, pela iniciação nesse universo raro e participação na finalização desta etapa.

Ao PPGBM, em especial ao Elmo pela atenção e gentileza, desde a inscrição na seleção.

Sumário

1. Introdução	14
1.1. Características clínicas	16
1.2. Diagnóstico	17
1.3. Terapêutica	18
1.4. Amido, digestão e metabolização	21
2. Justificativa.....	24
3. Objetivos	25
3.1. Objetivo geral.....	25
3.2. Objetivos específicos	25
4. Hipóteses	26
Capítulo 1	27
5. Artigo 1: A triple-blinded crossover study to evaluate the short-term safety of sweet manioc starch for the treatment of glycogen storage disease type Ia.	27
5. Conclusão	38
6. Referências.....	39
ANEXOS	46

Lista de siglas e abreviaturas

AAV8	Vírus adeno-associado sorotipo 8
Acetil-CoA	Acetilcoenzima A
AMC	Amido de milho cru
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
DR	<i>Detection Ranges</i>
G6P	Glicose-6-fosfato
G6Pase	Glicose-6-fosfatase
G6PC	Gene que codifica a subunidade catalítica da enzima glicose-6-fosfatase
G6PT	Transportador de glicose-6-fosfato
Glicose-1-P	Glicose-1-fosfato
GSD	Glicogenoses
GSD Ia	Glicogenose tipo Ia
GSD Ib	Glicogenose tipo Ib
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i> ou lipoproteína de alta densidade
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance In Man</i>
PD	Polvilho doce
QR	<i>Quantification Ranges</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SMS	<i>Sweet manioc starch</i>
TIM-1	<i>Dynamic gastro-small intestine model</i>
UCCS	<i>Uncooked cornstarch</i>
UDP-glicose	Difosfato de uridina glicose
WMHM20	<i>Waxy Maize (Heat Modified) 20</i>

Lista de figuras

Figura 1- Ilustração do metabolismo hepático impactado pela falha da atividade da enzima G6Pase..... 16

Figura 2- Esquema representando a cadeia linear- amilose, e a cadeia ramificada- amilopectina. 22

Lista de quadros

Quadro 1- Classificação das glicogenoses hepáticas 14

Quadro 2- Caracterização da GSD Ia..... 20

Quadro 3- Novas perspectivas terapêuticas para GSD Ia 21

Quadro 4- Caracterização de amidos quanto a origem 22

Resumo

Introdução: a Glicogenose tipo Ia (GSD Ia), causada pela redução da atividade da glicose-6-fosfatase (G6Pase), é uma doença autossômica recessiva, de característica pan-étnica. As características clínicas variam de acordo com a idade, sendo a hipoglicemia em jejum a alteração metabólica primária, e as principais alterações metabólicas secundárias são hiperlactatemia ou acidose láctica, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia e hiperuricemia. Os indivíduos com GSD Ia são dependentes de fontes exógenas de glicose, sendo o amido de milho cru (AMC) a fonte mais utilizada desde 1982.

Objetivo geral: avaliar *in vivo* a proposta de um novo amido para utilização no tratamento da GSD Ia, o polvilho doce (PD) em comparação ao tratamento tradicional com AMC.

Métodologia: ensaio clínico randomizado, triplo-cego, fase I/II, cruzado, comparando o uso de AMC e PD. Critérios de inclusão: idade \geq 16 anos, diagnóstico genético de GSD Ia e estar em tratamento com AMC. Os participantes ficaram duas noites hospitalizados: uma usando AMC e uma usando PD (100g em 200mL de água). Após a ingestão do amido randomizado, amostras de sangue foram coletadas por cateter intravenoso periférico, a cada hora para análise das concentrações de glicose, lactato e insulina. Os procedimentos foram interrompidos após 10h de jejum ou na ocorrência hipoglicemia (<70 mg/dL).

Resultados: participaram do estudo 11 indivíduos, seis do sexo masculino, a média de idade foi de 21,6 anos ($\pm 4,3$). O tempo médio de duração de jejum foi de 8,18h ($\pm 1,99$) para o PD e 7,68h ($\pm 2,28$) para AMC. O PD manteve a normoglicemia por um período igual ou maior ao AMC em todos os casos. O aumento dos níveis de lactato ocorreu mesmo na ausência de hipoglicemia e não houve diferença estatística entre os dois produtos ($p=0,1763$). Também não houve diferença estatística entre os valores basais e finais de colesterol total, triglicerídeos, lipoproteína de alta densidade e ácido úrico em relação aos produtos utilizados no estudo. Nenhum paciente apresentou eventos adversos graves.

Conclusões: o ensaio clínico demonstrou maior duração da euglicemia e maior estabilidade dos níveis de glicose com o uso de PD, sugerindo que esse amido se apresenta como uma alternativa promissora para o tratamento de pacientes com GSD Ia.

Abstract

Background: Glycogen storage disease type Ia (GSD Ia), caused by reduced activity of glucose-6-phosphatase (G6Pase), is an autosomal recessive disease, with a pan-ethnic characteristic. Clinical features vary according to age. Fasting hypoglycemia is the primary metabolic alteration and the main secondary metabolic alterations are hyperlactatemia or lactic acidosis, hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia and hyperuricemia. People with GSD Ia are dependent on exogenous sources of glucose. Uncooked cornstarch (UCCS) is the most used source since 1982.

Aims: to evaluate *in vivo* the proposal of a new starch for the usage in the treatment of GDS Ia and compare the treatment with sweet manioc starch (SMS) to the traditional treatment with UCCS.

Method: randomized, triple-blind, phase I/II, crossover clinical trial comparing the use of UCCS and SMS. Inclusion criteria: age \geq 16 years, genetic diagnosis of GSD Ia, UCCS treatment user. Participants were hospitalized for two nights: one using UCCS and one using SMS (100g in 200mL of water). After the ingestion of randomized starch, blood samples were collected by peripheral intravenous catheter, every hour for analysis of glucose, lactate and insulin concentrations. The procedures were interrupted after 10 hours of fasting or in the event of hypoglycemia (<70 mg/dL).

Results: 11 individuals participated in the study, six were male, the mean age was 21.6 years (± 4.3). The mean duration of fasting was 8.18h (± 1.99) for SMS and 7.68h (± 2.28) for UCCS. The SMS maintained normoglycemia for a period equal to or longer than the AMC in all cases. The increase in lactate levels occurred even in the absence of hypoglycemia and there was no statistical difference between the two products ($p=0.1763$). There was also no statistical difference between baseline and final values of total cholesterol, triglycerides, high-density lipoprotein and uric acid related to the products used in the study. None of the patients had serious adverse events.

Conclusions: the clinical trial demonstrated a longer duration of euglycemia and a greater stability of glucose levels with the usage of SMS, suggesting that this starch presents itself as a promising alternative for the treatment of patients with GSD Ia.

Apresentação

O grupo de pesquisa de Avaliação de Tecnologias em Saúde para Genética Clínica - ATS Genética, coordenado pela Profa. Ida Vanessa Doederlein Schwartz, foi criado em 2008, e desde então possibilitou que mais de 20 estudantes de nutrição e nutricionistas tivessem a oportunidade de desenvolver atividades de pesquisa nos níveis de iniciação científica, mestrado, doutorado e pós-doutorado. O projeto “abordagens inovadoras no tratamento de glicogenoses hepáticas” iniciou em 2016, após as publicações de estudos *in vitro* avaliando a aplicação do polvilho doce no tratamento de glicogenoses hepáticas. A etapa seguinte foi o ensaio clínico utilizando esta nova proposta de tratamento e seus desdobramentos, que são o tema da presente tese.

A tese está dividida em cinco seções, sendo a primeira uma contextualização sobre o tema, com uma breve revisão narrativa sobre a glicogenose tipo Ia (GSD Ia) seu histórico, aspectos clínicos, epidemiológicos, diagnóstico, tratamento dietético, características bioquímicas do amido; seguindo com justificativa, hipóteses, os objetivos gerais e específicos.

A segunda seção ou capítulo 1, consiste em um ensaio clínico randomizado, triplo cego, cruzado, comparando o tratamento tradicional a uma alternativa inovadora, o polvilho doce (PD), intitulado: “*A triple-blinded crossover study to evaluate the short-term safety of sweet manioc starch for the treatment of glycogen storage disease type Ia*”, publicado em junho de 2021, pelo *Orphanet Journal Rare Diseases*.

O artigo “*Potential use of other starch sources in the treatment of Glycogen Storage Disease type Ia – an in vitro study*” que aborda os desdobramentos do ensaio clínico e caracteriza bioquimicamente de amidos de milho e mandioca, incluindo os produtos testados no ensaio clínico, é apresentado na terceira seção ou capítulo 2.

A quarta seção apresenta as conclusões por objetivos, considerações finais e perspectivas futuras. Por fim, na seção de anexos, estão a carta de aprovação ética do projeto nº 2016-0056, o termo de consentimento livre e esclarecido e outras produções científicas relevantes da autora da tese durante o período do doutorado.

1. Introdução

Os erros inatos do metabolismo compõem um grupo de doenças que pode ser definido como distúrbios genéticos causados pela interrupção de uma via metabólica (Saudubray; Garcia-Cazorla, 2018). No caso das glicogenoses (GSD), o defeito enzimático afeta o metabolismo do glicogênio, e conseqüentemente o metabolismo energético (Saudubray; Baumgartner; Walter, 2016).

Existem pelo menos oito tipos de GSD hepáticas descritas e cada tipo com um bloqueio metabólico distinto (Szymańska et al., 2020). O quadro 1 apresenta a classificação das GSD.

Quadro 1- Classificação das glicogenoses hepáticas

Tipo (MIM)	Enzima envolvida	Herança
0, forma hepática (240600)	Glicogênio sintase (hepática)	AR
Ia (232200)	Glicose-6-fosfatase	AR
Ib (232220)	Transportador de Glicose-6-fosfato	AR
IIIa e IIIb (232400)	Enzima desramificadora de glicogênio	AR
IV (232500)	Enzima ramificadora de glicogênio	AR
VI (232700)	Glicogênio fosforilase hepática	AR
IX α 1 e IX α 2 (306000)	Fosforilase quinase (subunidade alfa)	LX
IX β (261750)	Fosforilase quinase (subunidade beta)	AR
IX γ (613027)	Fosforilase quinase (subunidade gama)	AR
XI (227810)	Transportador de glicose-2	AR

AR- autossômica recessiva, LX- ligada ao X.

Fonte: Adaptado de Santos et al., 2017

A Glicogenose tipo Ia (GSD Ia) (OMIM# 232200) ou doença de von Gierke, foi descrita em 1929, como doença de armazenamento de glicogênio no fígado e rins, a “Hepato-nefromegalia glicogênica”, com base em uma autópsia do corpo de uma criança. Antes da caracterização feita de Edgar Von Gierke (1877-1945), o médico patologista que se tornou epônimo da doença, a GSD Ia era conhecida como infantilismo hepático; distúrbio de crescimento em crianças com grandes tumores hepáticos; hipertrofia cardíaca idiopática com aumento do fígado, ou ainda cirrose hepática infantil de etiologia incerta (Kaiser; Sziranyi; Gross, 2020).

O padrão de herança da GSD Ia é autossômico recessivo, pan-étnica, causada pela redução da atividade da enzima glicose-6-fosfatase (G6Pase) (Bhattacharya et al., 2015; Dahlberg et al., 2020; Kishnani et al., 2014). Esta subunidade catalítica do sistema G6Pase está localizada no retículo endoplasmático (Özen; Bayraktar, 2007), e catalisa a hidrólise de glicose-6-fosfato (G6P) em glicose e fosfato inorgânico, um passo importante na manutenção da homeostase da glicose (Santos et al., 2014a).

A falha na atividade da G6Pase resulta no fluxo anormal através da via glicolítica, levando ao aumento da produção de piruvato, que é convertido em lactato ou triglicerídeos, pela via acetil-CoA e ácidos graxos. A glicose-6-fosfato também pode ser convertida em ácido úrico, na via do ciclo das pentoses fosfato, bem como em glicogênio, na via glicose-1-fosfato, UDP-glicose e amilopectina (Sever et al., 2012). A Figura 1 ilustra o impacto da falha da enzima G6Pase no metabolismo hepático.

O gene responsável pela GSD Ia, *G6PC*, está localizado no cromossomo 17q21 (Onky et al., 2021), abrange 12,5kb, inclui 5 éxons e codifica uma proteína altamente hidrofóbica de 357 aminoácidos contendo 9 hélices transmembranas (Froissart et al., 2011). Suas variantes patogênicas mais frequentes observadas na coorte brasileira foram a p.Arg83Cys, presente em 39 alelos (18,5%), e p.Gln347*, em 14 alelos (6,6%), sendo a variante p.Arg83Cys uma das mais importantes encontradas em todo o mundo em pacientes com GSD Ia (Sperb-Ludwig et al., 2019).

A prevalência de GSD tipo I na população geral é de aproximadamente 1:100.000 nascidos vivos, entretanto a prevalência é maior na população judaica Ashkenazi, cerca de 1 em 20.000 nascimentos. A GSD Ia é o tipo mais prevalente, responsável por cerca de 80% dos casos (Bali et al., 2006; Chou; Kim; Cho, 2017; Ekstein et al., 2004; Garbade et al., 2021; Onky et al., 2021).

Assim como para a maioria das doenças raras, não são conhecidos dados acerca da frequência das GSD no Brasil, e sua incidência pode estar subestimada pela falta de acesso aos métodos diagnósticos adequados e à suspeita clínica. No entanto, sugere-se que os tipos mais frequentes em nosso país sejam os tipos I e

III (dados não publicados obtidos com base no levantamento de pacientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e da Universidade Estadual de Campinas).

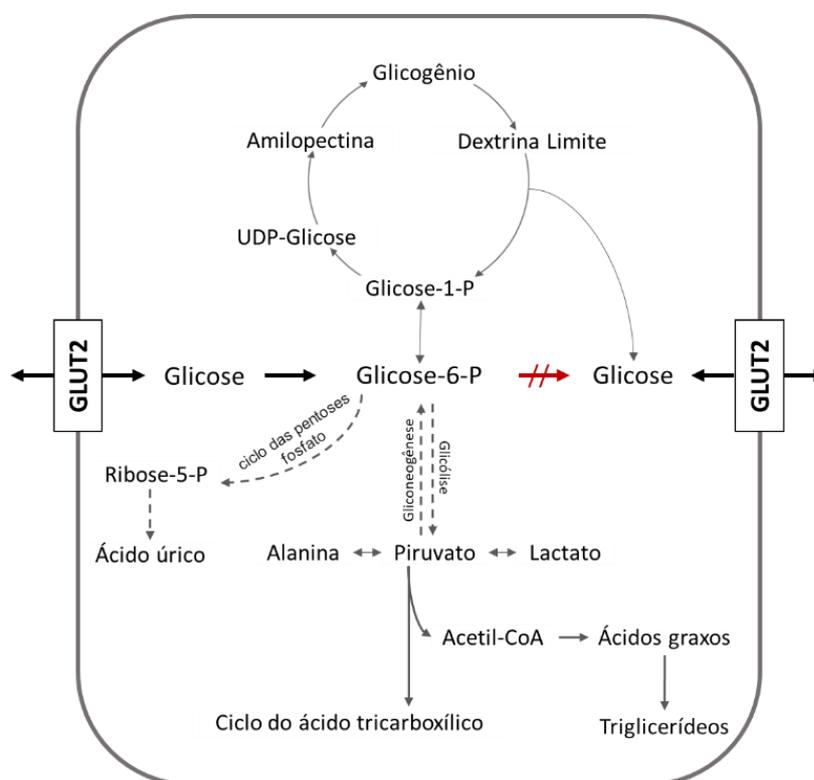


Figura 1- Ilustração do metabolismo hepático impactado pela falha da atividade da enzima G6Pase.

A glicose-6-fosfato acumulada e é desviada para outras vias resultando em hiperuricemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hiperalaninemia, hiperlactatemia, hipoglicemia e acúmulo de glicogênio.

Fonte: Adaptado de Sever et al., 2012.

1.1. Características clínicas

Os sintomas de apresentação da GSD la variam de acordo com a idade do paciente (Kishnani et al., 2014), e a hipoglicemia em jejum é a alteração metabólica primária na GSD la (Kaiser et al., 2019), cujos principais sintomas são tremores, irritabilidade, hiperventilação, cianose, apnéia, convulsões, palidez, sudorese, edema/disfunção cerebral, coma e morte (Özen; Bayraktar, 2007).

Outros distúrbios bioquímicos típicos como hiperlactatemia ou acidose láctica, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia e hiperuricemia, são dependentes da qualidade do tratamento dietético e do controle metabólico (Kaiser et al., 2019).

Assim como complicações a longo prazo como adenomas hepáticos, adenomas hepáticos com potencial para transformação maligna, doença renal

crônica, baixa densidade óssea, osteoporose, puberdade tardia, gota, hipertensão pulmonar, ovários policísticos, pancreatite e alterações na função cerebral (Bali et al., 2006; Kaiser et al., 2019).

Os sintomas iniciais são decorrentes de hipoglicemia e podem ocorrer logo após o nascimento, e os episódios não respondem à administração de glucagon (Özen; Bayraktar, 2007). Porém o mais comum é que bebês não tratados apresentem os sinais e sintomas por volta dos três a quatro meses de idade (Bali et al., 2006).

As crianças afetadas geralmente apresentam “fácies de boneca”, extremidades relativamente finas, baixa estatura e abdômen protuberante, evidências de raquitismo e anemia (Bali et al., 2006; Özen; Bayraktar, 2007). Podem estar presentes, xantoma e diarreia intermitente de causa desconhecida que parece piorar com a idade (Bali et al., 2006). A causa desta diarreia é desconhecida (Özen; Bayraktar, 2007).

A função plaquetária prejudicada pode levar a uma tendência ao sangramento com epistaxe frequente, particularmente naqueles com controle metabólico insuficiente (Bali et al., 2006; Özen; Bayraktar, 2007). Durante as doenças infecciosas, os sintomas de hipoglicemia grave são mais frequentes devido à diminuição do apetite e aumento da demanda energética (Özen; Bayraktar, 2007).

1.2. Diagnóstico

A suspeita diagnóstica ocorre partir das características clínicas e achados laboratoriais, principalmente em crianças com hipoglicemia (com ou sem convulsões) que apresentam acidemia láctica, hiperuricemia e hipertrigliceridemia, e em alguns casos, com a realização de testes funcionais para um diagnóstico diferenciado de hipoglicemia, que evidenciam ausência de resposta glicêmica após aplicação de glucagon e piora da hiperlactatemia (Marion; Paljevic, 2020; Santos et al., 2014).

No passado, o diagnóstico de GSD I e sua diferenciação em Ia e Ib era confirmado pelo ensaio da atividade enzimática em hepatócitos intactos (frescos) e rompidos. Na GSD IB, ausência de atividade em células intactas e atividade normal

em células rompidas. Enquanto na GSD Ia a atividade está ausente em ambas as preparações (Saudubray; Baumgartner; Walter, 2016).

Atualmente, o diagnóstico de GSD Ia é estabelecido em um probando pela identificação de variantes patogênicas bialélicas em *G6PC* (Bali et al., 2006), evitando assim a necessidade de biópsia hepática, que é indicada caso o teste genético molecular seja inconclusivo. A análise da atividade enzimática hepática está disponível para a atividade catalítica da glicose-6-fosfatase (Bali et al., 2006; Saudubray; Baumgartner; Walter, 2016).

Se uma biópsia hepática for realizada, a histologia mostra excesso de armazenamento de glicogênio citoplasmático com grandes vacúolos lipídicos, mas sem fibrose. O diagnóstico pré-natal pode ser realizado por análise de variantes patogênicas (Saudubray; Baumgartner; Walter, 2016).

1.3. Terapêutica

A base do tratamento na GSD Ia é dietético, cujo principal objetivo é manter a normoglicemia (Özen; Bayraktar, 2007) e fornecer nutrição adequada para promover crescimento e desenvolvimento (Bali et al., 2006). Ou seja, o objetivo do tratamento é corrigir as alterações metabólicas para prevenir ou manejar as possíveis complicações clínicas da doença (Saudubray; Baumgartner; Walter, 2016).

Para atingir esse objetivo algumas estratégias são recomendadas como a ingestão de refeições pequenas e frequentes, com carboidratos complexos, também é recomendado o monitoramento da glicemia para auxiliar o ajuste dos horários de alimentação para atender às necessidades individuais (Bali et al., 2006).

Pessoas com GSD Ia são dependentes de fontes suplementares exógenas de glicose (Zhang; Shi; Chen, 2015). Uma alternativa comum é a utilização do amido de milho cru (AMC), que por ser um polissacarídeo, apresenta degradação lenta, assim mantendo normoglicemia (Wolfsdorf; Weinstein, 2003).

O início da terapia com AMC não seria indicado para menores de 6 meses de vida, pois estes não produzem amilase pancreática suficiente para digerir o amido (Ross et al., 2020), e até os 2 anos os níveis dessa enzima digestiva não

seriam suficientes (Kishnani et al., 2014; Reis et al., 1999), apesar da literatura sugerir que o uso do amido poderia induzir sua atividade (Reis et al., 1999).

Por este motivo, é recomendada a introdução gradual do AMC para lactentes de 6 a 12 meses (Hijazi et al., 2019; Kishnani et al., 2014). Um método de introdução sugerido para crianças de 8 meses a 1 ano, foi 0,5g/kg, três vezes ao dia com progressão para 2g/kg, adicionado à fórmula infantil (Goldberg; Slonim, 1993).

As recomendações de doses para as diferentes faixas etárias são 1 a 1,6/kg, para crianças pequenas, a cada 3 a 4h; para crianças maiores, adolescentes e adultos: 1,7 – 2,5g/kg, a cada 4 a 6h. Deve-se considerar peso ideal para o cálculo de dose (Hijazi et al., 2019; Kishnani et al., 2014).

A diluição recomendada é que a cada grama de AMC, deve-se adicionar o dobro do volume em mL de água em temperatura ambiente (1:2) (Chen et al., 1993; Chen, 1991; Heller; Worona; Consuelo, 2008; HOU; Wang, 2003), este volume pode ser ajustado conforme a tolerância individual (Kishnani et al., 2014). A mistura deve ser consumida imediatamente e para garantir a ingestão do total prescrito, influenciando o conteúdo adsorvido, deve-se adicionar água novamente ao recipiente (Ross et al., 2020).

A distribuição calórica da dieta deve ser 60 a 65% de carboidratos, dentre eles, 30 a 45% sob a forma de AMC; lipídeos: 20 a 25%, e proteínas: 10 a 15%. A restrição dietética de sacarose, frutose e lactose é recomendada com o objetivo de prevenir o aumento progressivo o glicogênio hepático, o que amplia a lista de alimentos que não são permitidos na dieta das pessoas com GSD Ia (Kishnani et al., 2014; Rake. PJ et al., 2002).

Outra estratégia para suprir a necessidade de aporte exógeno de glicose é a infusão contínua noturna, principalmente para lactentes de 0 a 8 meses (Reis et al., 1999; Shah; O'Dell, 2013). O objetivo primário é a correção ou prevenção da hipoglicemia noturna, com possíveis vantagens adicionais como não depender da palatabilidade, nem ter a necessidade de acordar durante a noite (Derks et al., 2013; Reis et al., 1999). Porém, esta alternativa terapêutica envolve riscos que podem levar a desfechos potencialmente graves, como obstrução da sonda, vazamento da dieta, deslocamento ou migração da sonda de nutrição enteral, falha

no funcionamento da bomba infusora e interrupção no fornecimento de energia elétrica (Steunenberget al., 2018).

O tratamento médico das comorbidades quando o controle metabólico não é alcançado apenas com a prescrição dietética, consiste na prevenção da gota quando os níveis sanguíneos de ácido úrico não são normalizados (alopurinol), medicações hipolipemiantes, prevenção de cálculos renais ou nefrocalcinose (citrato), tratamento da microalbuminúria (inibidores da enzima conversora de angiotensina), transplante renal e hepático, cirurgias ou outras intervenções e procedimentos médicos (Bali et al., 2006).

O quadro 2 apresenta de forma resumida as características genéticas, bioquímicas, clínicas e estratégia de tratamento da GDS Ia.

Quadro 2- Caracterização da GSD Ia

	Descrição
Gene	<i>G6PC</i>
Localização	17q21
Herança	Autossômica recessiva
Enzima	Glicose-6-fosfatase (G6Pase)
Alterações clínicas e bioquímicas	Primária: Hipoglicemia em jejum Secundárias: - Hiperlactatemia ou acidose láctica - Hipertrigliceridemia - Hipercolesterolemia - Hiperuricemia Complicações a longo prazo: Hepatomegalia, adenomas hepáticos, alterações renais e ósseas, puberdade tardia, gota, hipertensão pulmonar, ovários policísticos, obesidade, pancreatite e alterações na função cerebral
Tratamento	Objetivo: corrigir as alterações metabólicas; prevenir e/ou manejar complicações. Estratégias: refeições frequentes, inclusão de carboidratos complexos como fonte exógena de glicose (Amido de milho cru), monitoramento da glicemia, restrição de açúcares (frutose, galactose, sacarose e lactose)

Fonte: Kishnani et al., 2014; Santos et al., 2017

Perspectivas futuras para o tratamento da GSD Ia incluem a transferência de genes mediada por vírus adeno-associado sorotipo 8 (NCT05139316, fase III), os pacientes que receberam a dose endovenosa única (NCT03517085, fase I/II), estão em acompanhamento a longo prazo para avaliar a segurança e a eficácia (NCT03970278). Estudos de novas terapias que também estão em andamento são a infusão de RNA mensageiro (NCT05095727, fase I), e a utilização da trieptanoína (NCT03665636, fase I).

O quadro 2 apresenta a descrição das terapias em estudo para o tratamento da GSD Ia, incluindo o polvilho doce (NCT03871673, fase I/I).

Quadro 3- Novas perspectivas terapêuticas para GSD Ia

Identificação	Intervenção	Fase	Desfecho primário	Desfecho secundário
NCT03871673	Polvilho doce	I/II	Tempo em normoglicêmica	Níveis de lactato e insulina
NCT05095727	mRNA-3745	I	Eventos Adversos e Eventos Adversos Graves	Hipoglicemia (8h de jejum); Biomarcadores metabólicos
NCT03665636	UX007 - Triheptanoína	I	Manutenção da normoglicemia	Estabilização da dose de AMC; Prevenção da esteatose hepática
NCT05139316	DTX401- (AAV8)	III	Alteração percentual da ingestão diária de AMC	Mudança no tempo em normoglicemia

AAV8- vírus adeno-associado sorotipo 8; AMC- amido de milho cru.

Fonte: *ClinicalTrials.gov*

1.4. Amido, digestão e metabolização

A maioria das células vegetais possui a capacidade de sintetizar e armazenar amido, especialmente os amiloplastos de tecidos de armazenamento de raízes, tubérculos e sementes (Abt; Zeeman, 2020). O amido é um homopolissacarídeo, insolúvel em água à temperatura ambiente, constituído de monômeros de glicose, dispostos em dois tipos de cadeias longas: a) Amilose, cadeia não ramificada de resíduos de D-glicose conectados por ligações $\alpha 1 \rightarrow 4$; b) Amilopectina, cadeia altamente ramificada, nos resíduos de glicose sucessivos nas cadeias de amilopectina as ligações também são $\alpha 1 \rightarrow 4$ e nos pontos de ramificação são $\alpha 1 \rightarrow 6$ (Apriyanto; Compart; Fettke, 2022; Nelson; Cox, 2014). A Figura 2 apresenta um esquema didático da estrutura das cadeias de amido.

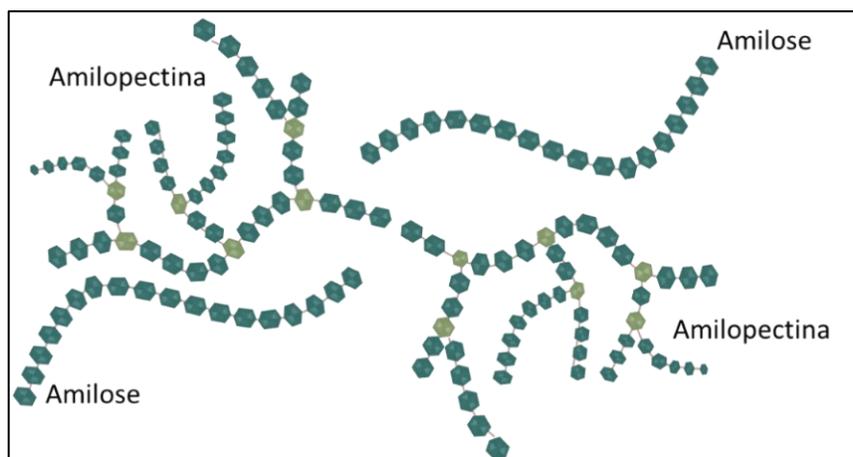


Figura 2- Esquema representando a cadeia linear- amilose, e a cadeia ramificada- amilopectina.

Fonte: Autoria própria

A amilose é encontrada na lamela amorfa do grânulo de amido, enquanto amilopectina é responsável pela lamela cristalina do grânulo, e seus pontos de ramificação fazem parte da lamela amorfa. Essas estruturas conferem ao amido a característica semicristalina, que é determinante na digestibilidade (Bello-Perez et al., 2020).

Os amidos são classificados de acordo com a relação amilose/amilopectina, os amidos com 25 a 30% de amilose e 70 a 75% de amilopectina são geralmente denominados como amidos “normais” (Bello-Perez et al., 2020). Além da Classificação, essa relação determina as propriedades físico-químicas como temperatura de gelatinização, retrogradação, solubilidade e poder de intumescimento (Gismondi et al., 2019). O quadro 2 apresenta a caracterização do amido de milho e da mandioca quanto a forma do grânulo e teor de amilose.

Quadro 4- Caracterização de amidos quanto a origem

Origem	Milho	Mandioca
Fonte	Grão	Tubérculo
Forma do grânulo	Circular, poligonal	Circular, irregulares
Teor de amilose (%)	25-28%	17%
Temperatura de gelatinização (°c)	62 – 80	52 – 65

Fonte: Adaptado de Apriyanto et al., 2022.

Outros fatores que influenciam na digestibilidade desse biopolímero são: estrutura dos grânulos, principalmente a forma e distribuição dos componentes, tamanho e porosidade (Zhang; Venkatachalam; Hamaker, 2006); relação amilose e amilopectina; distribuição e comprimento da cadeia de amilopectina (Bello-Perez et al., 2020).

A digestão do amido corre pela ação das α -amilases: a) α -amilase salivar que hidrolisa as ligações α 1-4 entre os resíduos de glicose. b) α -amilase pancreática, hidrolisa o produto da reação anterior em dissacarídeos (maltose), trissacarídeos (maltotriose), oligossacarídeos ou dextrinas limites (quatro a nove unidades glicosil e contêm uma ou mais ramificações com ligações α -1-6) (Smith; Marks; Lieberman, 2007).

Os produtos das reações anteriores são convertidos em monossacarídeos pelas glicosidases localizadas na superfície da membrana em “borda em escova” das células epiteliais intestinais, e os monossacarídeos produzidos são absorvidos pelas células epiteliais intestinais e uma fração resistente à digestão, segue pelo intestino e pode sofrer a ação da microbiota, no cólon, formando gases e ácidos graxos de cadeia curta (Smith; Marks; Lieberman, 2007).

Depois de sua captação para o interior da célula, a glicose pode ser utilizada imediatamente para liberar energia ou pode ser armazenada sob a forma de glicogênio, principalmente no fígado e os músculos (Cozzolino; Cominetti, 2013).

A glicose é um dos substratos circulantes altamente regulados e sua homeostase é alcançada por meio da delicada interação entre os hormônios pancreáticos e viscerais, entre eles a insulina que diminui a glicemia, aumentando a síntese de glicogênio, suprime a gliconeogênese e aumenta a captação de glicose pelos músculos e pelo tecido adiposo; enquanto outros hormônios como cortisol, hormônio do crescimento, epinefrina e norepinefrina aumentam a glicemia por meio de rotas como glicogenólise, gliconeogênese e oxidação de ácidos graxos (Cozzolino; Cominetti, 2013).

2. Justificativa

A dieta é uma das estratégias de controle metabólico na GSD Ia, com ênfase na administração de AMC, uma estratégia secundária seria a restrição da ingestão de açúcares, como a galactose, frutose e sacarose (Santos et al., 2019).

Amidos são moléculas poliméricas, denominadas de polissacarídeos, cuja quebra enzimática leva à liberação lenta no organismo de mono, di e oligossacarídeos (Prestegard; Liu; Widmalm, 2015). Desta forma, pode-se atingir o objetivo terapêutico das glicogenoses: manutenção dos níveis normais de glicemia e prevenção das alterações metabólicas secundárias (Kishnani et al., 2014; Wolfsdorf; Weinstein, 2003).

Apesar da utilização do AMC no tratamento das GSD ser bem-sucedida, há relatos sobre o alto índice glicêmico após a ingestão e intolerância ao tratamento tradicional (Bhattacharya et al., 2015; Bracken; Gray; Turner, 2014; Thornhill et al., 2017).

A busca por amidos que possam representar uma alternativa terapêutica visa atender não apenas demandas sociais, com a possibilidade de produtos mais acessíveis regionalmente como também uma alternativa para pacientes que não toleram o AMC (Nalin et al., 2015a). Entre as fontes alternativas de amido está a mandioca, que é uma das mais tradicionais culturas agrícolas brasileiras, sendo cultivada em praticamente todo o território nacional e presente no hábito alimentar desde o período pré-colonial (Aplevicz; Demiate, 2007).

A maior parte da produção de mandioca é destinada para o consumo direto ou processada na forma de farinha e fécula. A fécula de mandioca pode ser denominada como polvilho doce ou azedo, cuja diferença no processamento é a etapa de fermentação natural da polpa por cerca de 30 a 40 dias. A fermentação confere odor e sabor característicos ao polvilho azedo (Carvalho *et al.*, 1996; Gomes *et al.*, 2010).

Diferentes tipos de amidos foram analisados quanto à eficácia na manutenção da normoglicemia, entre eles a tapioca, araruta, amidos de batata,

arroz e trigo, com o AMC demonstrando a sua eficácia frente a outras fontes de amidos (Sidbury; Chen; Roe, 1986).

No entanto, em 2015, uma análise *in vitro* desenvolvida pelo grupo ATS Genética evidenciou o potencial de utilização do PD no tratamento das GSD quando comparou diferentes marcas de amido de milho, amido de milho modificado, polvilho azedo e farinha de mandioca quanto às frações glicose rapidamente disponível, amido resistente, glicose lentamente disponível e glicose total em um modelo dinâmico de digestão mimetizando estômago e intestino delgado (Nalin et al., 2015b).

Tais resultados motivaram a avaliação da eficácia *in vivo* do PD no tratamento da GSD Ia, que é um dos subtipos mais frequente (Ellingwood; Cheng, 2018) e potencialmente grave do ponto de vista glicêmico, uma vez que o defeito enzimático prejudica tanto a glicogenólise quanto a gliconeogênese (ROSS *et al.*, 2020).

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar *in vivo* o PD como uma nova proposta para tratamento da GSD Ia e caracterizar bioquimicamente o PD e AMC.

3.2. Objetivos específicos

- a. Avaliar a eficácia e segurança da administração de PD em pacientes com GSD Ia;
- b. Comparar a resposta glicêmica e marcadores de metabólitos secundários (lactato, insulina, triglicerídeos, ácido úrico, colesterol total e HDL-colesterol), associados ao uso da terapia tradicional (AMC) e da nova terapia proposta (PD) em pacientes com GSD Ia;
- c. Analisar o teor de umidade, proteínas, lipídeos, açúcares, amilose e amilopectina de amostras de PD disponíveis comercialmente e uma amostra

liofilizada, e amostras de AMC (duas de fabricação nacional e uma importada)

4. Hipóteses

- a. A administração de PD, como fonte exógena de glicose, para pacientes com GSD Ia é segura e eficaz;
- b. A resposta glicêmica à administração de PD é tão eficaz quanto o tratamento tradicional (AMC);
- c. O PD apresenta mais amilopectina que o AMC;
- d. As fontes de amido – PD e AMC – apresentam açúcares em sua composição.

Capítulo 1

Artigo 1: A triple-blinded crossover study to evaluate the short-term safety of sweet manioc starch for the treatment of glycogen storage disease type Ia.

Monteiro VCL, de Oliveira BM, Dos Santos BB, Sperb-Ludwig F, Refosco LF, Nalin T, Derks TGJ, Moura de Souza CF, Schwartz IVD. A triple-blinded crossover study to evaluate the short-term safety of sweet manioc starch for the treatment of glycogen storage disease type Ia. *Orphanet J Rare Dis.* 2021 Jun 3;16(1):254. doi: 10.1186/s13023-021-01877-3. PMID: 34082801; PMCID: PMC8173866.

RESEARCH

Open Access



A triple-blinded crossover study to evaluate the short-term safety of sweet manioc starch for the treatment of glycogen storage disease type 1a

Vaneisse C. L. Monteiro¹, Bibiana M. de Oliveira¹, Bruna B. dos Santos¹, Fernanda Sperb-Ludwig^{1,2}, Lilia F. Refosco⁵, Tatiele Nalin³, Terry G. J. Derks⁴, Carolina F. Moura de Souza⁵ and Ida V. D. Schwartz^{1,2,5,6,7*} 

Abstract

Background: Glycogen storage disease type 1a (GSD 1a) is characterized by severe fasting hypoglycemia. The clinical management includes the administration of uncooked cornstarch (UCCS). Although such a diet approach is effective in achieving euglycemia, its impact on the quality of life of patients should be considered. In vitro analyses suggest a longer release of glucose when using sweet manioc starch (SMS).

Methods: We compared the efficacy and safety of the administration of SMS and UCCS during a short-fasting challenge in patients with GSD 1a in a randomized, triple-blind, phase I/II, cross-over study. GSD 1a patients aged ≥ 16 years and treated with UCCS were enrolled. Participants were hospitalized for two consecutive nights, receiving UCCS or SMS in each night. After the administration of the starches, glucose, lactate and insulin levels were measured in 1-h interval throughout the hospitalization period. The procedures were interrupted after 10 h of fasting or in a hypoglycemic episode (< 3.88 mmol/L).

Results: Eleven individuals (mean age: 21.6 ± 4.3 years; all presenting body mass index > 25 kg/m²) participated in the study. The average fasting period was 8.2 ± 2.0 h for SMS and 7.7 ± 2.3 h for UCCS ($p = 0.04$). SMS maintained euglycemia for a greater period over UCCS. Increased lactate concentrations were detected even in absence of hypoglycemia, not being influenced by the different starches investigated ($p = 0.17$). No significant difference was found in total cholesterol, HDL, triglycerides and uric acid levels in both arms. None of the patients showed severe adverse events.

Conclusions: SMS appears to be non-inferior to UCCS in the maintenance of euglycemia, thus emerging as a promising alternative to the treatment of GSD 1a.

Keywords: Inborn errors of metabolism, Hepatic glycogen storage disease, Treatment strategies, Cornstarch, Sweet manioc starch, Dietary treatment

Background

Glycogen Storage Diseases comprise distinct genetic disorders caused by alterations in the synthesis or degradation of glycogen [1]. Glycogen storage disease type 1a (GSD 1a), typically known as Von Gierke disease (OMIM #232200), is an autosomal recessive metabolic disorder

*Correspondence: ischwartz@hcpa.edu.br

¹ Post-Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Ramiro Barcelos St, 2350, Porto Alegre, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2021. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

caused by deficiency of the enzyme glucose-6-phosphatase (G6Pase) [2], encoded by the *G6PC* gene located in the chromosome 17q21.31 [3]. G6Pase is anchored in the endoplasmic reticulum lumen, being highly expressed in the liver, kidney and small intestine [4, 5]. The estimated prevalence of GSD Ia is about 1 in 100,000 live births [6].

GSD Ia results in dramatic metabolic alterations, especially in fasting periods. Due to the deficient endogenous glucose production, patients showed severe hypoglycemia, hypertriglyceridemia, hyperlipidemia and increased production of lactic and uric acids [6]. The clinical management is based on dietary treatment to maintain euglycemia (blood glucose > 4 mmol/L or 70 mg/dL) and prevent secondary metabolic disorders [7].

Dietary treatment strategies intend to provide a continuous source of glucose by nocturnal intragastric infusion of glucose or regular administration of uncooked cornstarch (UCCS) [8]. Other potential strategies involve medium-chain triacylglycerol supplementation [8] and gene therapy [9]. In this regard, UCCS is a polysaccharide with slow degradation and glucose release, therefore constituting an interesting option to maintain euglycemia. The recommended UCCS dosage depends on age, weight and period of the day. As reference the dosage consists of 1.6 to 2.5 g *per* kilogram of body weight every 3–4 h for younger children, and every 4–6 h for older children, adolescents, and adults [1, 8]. Although UCCS therapy has shown successful results, there is no optimal protocol that can broadly attend to all the treatment requirements for patients with GSD Ia. In addition, even though UCCS is supposed to be palatable, practical, to prevent excessive weight gain and maintain normal appetite with scarce adverse effects [10], the overtreatment can induce hyperinsulinemia and obesity [8].

Sweet manioc starch (SMS) is a culinary product extracted from cassava (*Manihot esculenta*). As this root is an important staple food crop in many developing (tropical, intertropical, and sub-Saharan) countries, starch is one of its major components (58.9% of the dry matter), being constituted by approximately 80% of amylopectin [11].

Nalin et al. [12, 13] evaluated the digestion of distinct starches brands from Brazil, United States of America and the Netherlands, including modified starch (Glycosade®, Vitaflo Ltda) and SMS (Fritz and Frida®) in a dynamic gastro-small intestine model (TIM-1). These authors showed that a slower glucose release was obtained from SMS compared to other starches. Moreover, their results also indicated that the digested amount of SMS was reduced compared to the other analyzed starches. Subsequently, the authors [12] have also evaluated the amylose/amylopectin ratio in same starch

samples. Interestingly, SMS displayed slightly higher amounts of amylopectin.

Hypothetically, the slower glucose release induced by the digestion of SMS and its widespread availability at a relative low cost could constitute an interesting tool in the arsenal to prevent GSD Ia-induced hypoglycemia during fasting periods. In the light of the demand to develop new therapeutic technologies for GSD management [14], the present study aimed to assess the efficacy and safety of SMS administration in patients with GSD Ia.

Results

Eleven GSD Ia participants (M: 6, F: 5) were enrolled in the study (mean age: 21.6 ± 4.3 years). All participants exhibited body mass index > 25 kg/m² (mean: 28.2 ± 3.6 kg/m²). The clinical profile of the participants is summarized in Table 1. At baseline, four patients (A, C, G, and K) presented high lactate (> 2.2 mmol/L); six patients, high uric acid; and 10 patients, high triglycerides levels.

Participants consumed an average amount of UCCS of 408.6 ± 86.5 g/day or 0.9 ± 0.2 g/kg/dose before the study. For this trial, all participants were given 100 g (1.3 ± 0.2 g/kg/dose) of carbohydrate starch, either SMS or UCCS.

Efficacy

Fasting time had a mean duration of 7.9 ± 1.8 h (SMS: 8.2 ± 2.0 , UCCS: 7.7 ± 2.3 , $p = 0.04$) (Fig. 1). The nadir time in euglycemia occurred in a 16-year-old male participant (Participant G), who remained in euglycemia during only 4 h after receiving any of the starches (SMS and UCCS). Four participants (B, D, E, I) remained in euglycemia during all the monitoring period (10 h) irrespective from the starch received. One participant fasted for 10 h after receiving SMS but not UCCS (Participant A). Under use of SMS, two patients (H and J) presented somnolence and fatigue, respectively, and had their tests interrupted at 7 h after the starch loading.

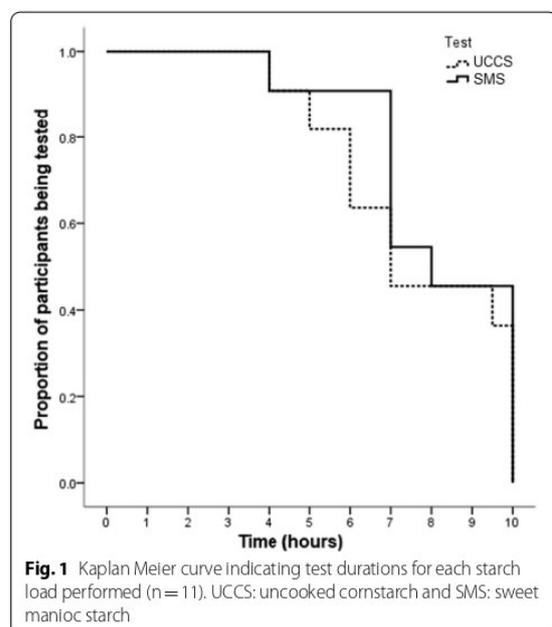
The SMS maintained euglycemia for a longer period (ANOVA, $p = 0.04$) and no carry-over effect was observed. In comparison to SMS, which had a more stable glycemic profile in the first 6 h after the load, the UCCS induced medians greater than 6.0 mmol/L in times T1 and T2, with the identification of glycemic peaks (Fig. 2A). All participants displayed similar lactate concentrations throughout the study evaluation (ANOVA, $p = 0.17$) and no carry-over effect was observed. An increase in lactate concentration was found even in the absence of hypoglycemia (Fig. 2B).

A carry-over effect was observed exclusively for the insulin levels regardless of the starch ($p = 0.03$).

Table 1 Genetic and biochemical profile of the GSD Ia patients enrolled in study (n = 11, baseline)

ID	Genotype	Gender (M/F)	Age (years)	Comorbidities	Body weight (Kg)	Height (cm)	BMI (kg/m ²)	Starch-dosage 4/4 h (cm)	Glucose (mmol/L)	Lactic acid (mmol/L)	Insulin (UJ/mL)	Uric acid (mg/dL)	TC(mg/dL)	HDL (mg/dL)	TG(mg/dL)
A	c.[247C>T];[820G>A]	F	24	Adenomas, nephrolithiasis	72.1	160	28.2	45	5.3	2.55	29.1	7.7	324	25	1997
B	c.[113A>T];[1039C>T]	F	16	-	76.8	163	28.9	47	4.0	1.69	4.7	6.2	198	44	307
C	c.[247C>T];[247C>T]	F	27	Hepatomegaly, hepatic hypervascular nodule	64.2	149	28.9	60	5.6	2.48	8.9	6.8	217	36	384
D	c.[113A>T];[1039C>T]	F	16	-	71.9	166	26.1	61	6.1	1.74	30.8	7.8	156	23	344
E	c.[247C>T];[247C>T]	M	23	Nephrolithiasis, hepatic steatosis	78.6	164	29.2	65	6.2	1.79	34.0	6.9	170	22	383
F	c.[247C>T];[809G>T]	F	21	Adenomas	59.0	153	25.2	68	5.3	1.38	16.7	6.5	144	35	122
G	c.[247C>T];[247C>T]	M	16	Nephrolithiasis	82.0	169	28.7	73	4.1	3.10	5.7	8.2	196	21	484
H	c.[189G>C];[1039C>T]	M	20	-	78.0	176	25.2	77	5.6	1.65	22.3	8.5	246	39	746
I	c.[1039C>T];[1039C>T]	M	22	-	109.5	170	37.9	78	5.9	1.93	20.3	7.8	244	34	448
J	c.[113A>T];[323C>T]	M	27	-	72.0	167	25.8	85	5.1	2.10	14.9	6.8	338	37	608
K	c.[247C>T];[563-3C>G]	M	26	Mild auditive loss	75.2	170	26.0	90	5.7	3.51	43.2	10.0	242	30	553

M: male, F: female. Reference values: glucose (> 3.8 mmol/L); lactate (0.5–2.2 mmol/L); insulin (1.4–14 μU/mL); total cholesterol (TC; < 200 mg/dL); HDL cholesterol (> 35 mg/dL); triglycerides (TG; < 150 mg/dL) and uric acid (3.4–7 mg/dL). In bold, abnormal values



Biochemical data of the participants (total cholesterol, HDL, triglycerides, and uric acid levels) are summarized in Table 2. No significant difference was found in these values when comparing both starches.

Safety

None of the participants displayed serious adverse events. Mild hypoglycemia-related fatigue was reported in 3/11 participants when treated with UCCS and two under SMS. Two anxiety episodes were also reported in 2 participants treated with UCCS, which were clinically managed without need for medication. One participant displayed anxiety and tachycardia symptoms and stopped the daily protocol because of low levels of capillary blood glucose.

Eight participants (A, C, D, E, G, H, and K) presented high lactate levels (≥ 5 mmol/L) during the protocol. Among these patients, five presented lactate elevation exclusively under SMS, one exclusively under UCCS and two under both starches' ingestion.

No gastrointestinal symptoms were reported and none of the participants discontinued the trial.

Discussion

This randomized, triple-blinded pilot study revealed that SMS maintained blood glucose concentrations within the normal range for a longer period than the UCCS.

The advent of UCCS treatment brought many benefits to hepatic GSD patients. However, similar to all alternative dietary treatment for GSDs, adverse effects were also reported, including interrupted sleep for treatment, anxiety, exhaustion, risk of delayed administration [14] and food intolerance [15].

The negative impact of conservative treatment with UCCS has been causing concerns among health care professionals, patients and their families. This became clear with the publication of the consensus on research priorities for hepatic GSD, where one of the 11 cited items was "How can existing cornstarch preparations be modified or alternative treatments be implemented that are easier to administer and/or keep blood sugar levels more stable for patients with liver GSD?" [16]. To avoid these adverse effects, a modified experimental starch was proposed (the modified cornstarch, WMHM20) [10]. The authors concluded that the use of WMHM20 resulted in a longer duration of euglycemia and better short-term metabolic control. Subsequent studies proved its efficacy and safety [17, 18].

New products for assisting the nutritional management of hepatic GSDs have been consistently investigated. In 1986, Sidbury et al. [19] compared the effects of different raw starches, including arrowroot and tapioca, typical roots from South America. The authors have reported distinct patterns of starches absorption. In fact, both arrowroot and tapioca were less hydrolyzed than UCCS. However, UCCS was more efficient in maintaining euglycemia in patients with GSD Ia.

An in vitro study using a dynamic model of the gastrointestinal tract-1 (TIM-1) have demonstrated that the use of SMS resulted in a less rapidly available glucose in the glycemic index method and a higher resistant starch value. In addition, SMS led to a slower glucose release and minimal possible amount of indigestible material compared to UCCS. After 3 h of starches administration, only 55.5% the amount of SMS was digested while nearly 70% of UCCS was already digested [13]. The amylose/amylopectin ratio was also determined, reflecting the starch influence on the rate and the extent digestion. SMS presented a higher amount of amylopectin than UCCS, but not in sufficient amounts to fully explain the difference in digestibility [12].

In the present study, the SMS presented a more stable glycemic profile in the first 6 h and the intervention maintained glycemia within the recommended treatment interval described in guidelines. In patients with GSD, the amount and the quality of the ingested carbohydrates demand to be controlled in order to avoid hypoglycemia during fasting and increased levels of lactate, triglycerides and hepatomegaly. According to experts, the management of GSD should include small and frequent

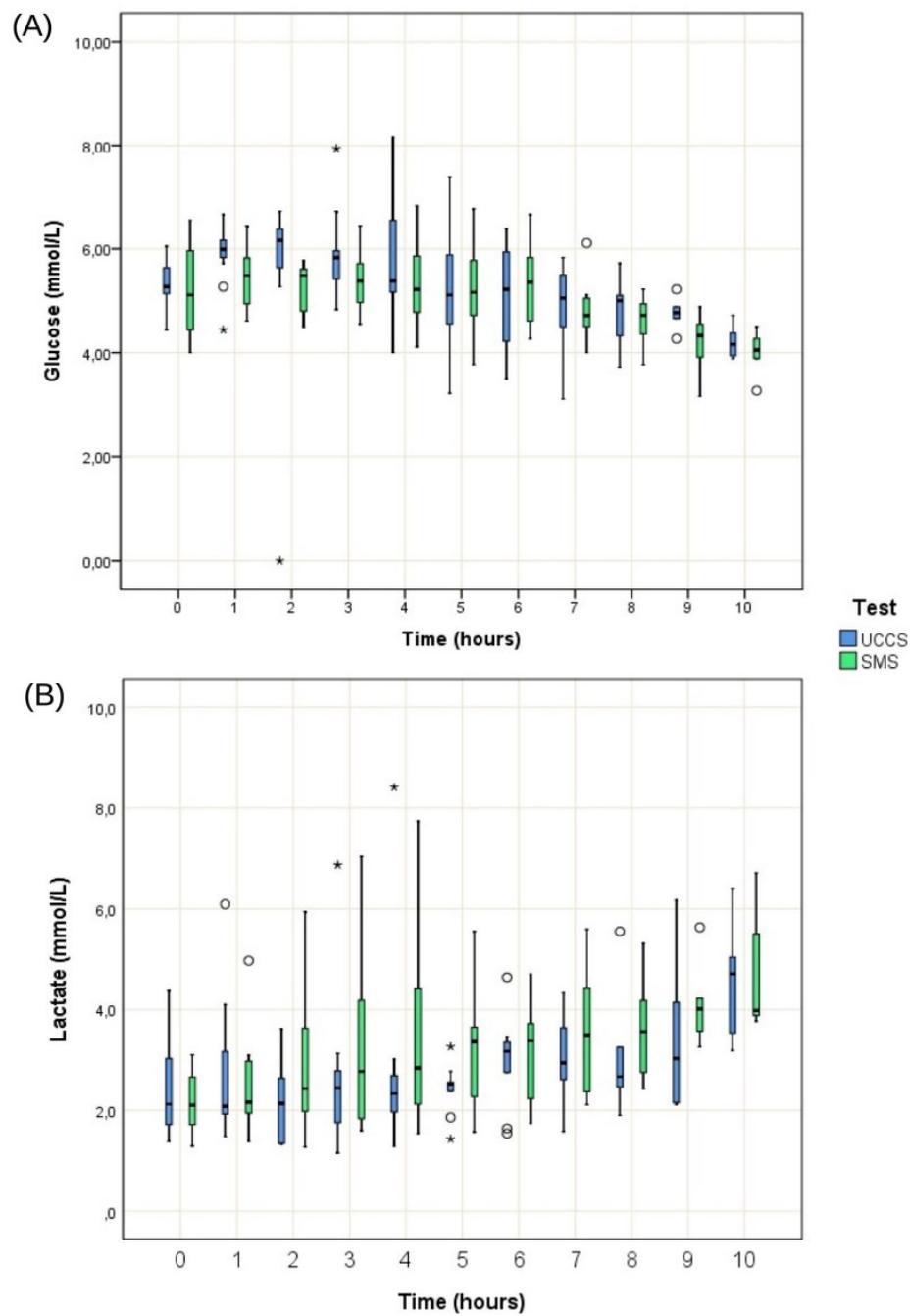


Fig. 2 Blood concentrations of glucose and lactic acid after UCCS or SMS throughout the study period. **A** Glucose level for each starch load performed (n = 11), normal range: > 3.88 mmol/L; **B** Lactic acid levels for each starch load performed (n = 11), normal range: 0.5 to 2.2 mmol/L. UCCS (uncooked cornstarch load) or SMS (sweet manioc starch)

Table 2 Baseline and final levels of total cholesterol and fractions, triglycerides and uric acid (n = 11)

	Baseline (Mean ± SD)		Final (Mean ± SD)		Treatment effect (p)
	Before UCCS	Before SMS	After UCCS	After SMS	
TC (mg/dL)	221.7 ± 64.0	219.2 ± 50.0	234.9 ± 135.2	209.5 ± 55.8	0.77
TG (mg/dL)	589.8 ± 505.0	503.6 ± 243.6	456.6 ± 272.9	457.1 ± 216.3	0.14
HDL (mg/dL)	32.0 ± 8.6	31.2 ± 7.0	31.2 ± 9.1	31.1 ± 9.1	0.62
UA (mg/dL)	7.8 ± 1.0	7.3 ± 1.1	8.4 ± 1.3	8.1 ± 1.2	0.98

UCCS: uncooked cornstarch; SMS: sweet manioc starch; SD: standard deviation; TC: total cholesterol (<200 mg/dL); TG: triglycerides (<150 mg/dL); HDL: high density lipoprotein (>35 mg/dL); UA: uric acid (3.4–7 mg/dL)

meals, favoring the complex carbohydrates over the simple carbohydrates [8]. This recommendation is based on the biochemical and nutritional properties of carbohydrates, which can critically determine the rate and extent of digestion and absorption in the small intestine. The greater is the release of glucose in the small intestine, the higher is the glucose blood bioavailability which favors the formation of glycogen. In general, granular starches with higher amylose content are more resistant to digestion, while greater amounts of amylopectin tend to be more easily digested. Other extrinsic aspects may also influence the starches digestion, such as its natural source, the granular structure, the degree of isolation as well as its processing and refinement [20].

Cassava starch consists of 80% amylopectin and 17–20% amylose [11]. Proportional amounts were found by Nalin et al. [11] in three Brazilian batch production. Additionally, SMS is constituted by approximately 170 g/kg of sucrose, trace amounts of fructose [10], with simple carbohydrates representing only 1 to 3% of the product [21]. Further analyses regarding the detailed composition of the studied starches are warranted.

The increased amylose/amylopectin ratio in SMS is associated with slow release of glucose and the maintenance of a prolonged euglycemia, thus constituting a promising alternative in the treatment of glycogen storage disorders, especially in Brazil, where access to slow-release starch is restricted to some patients. However, we also found an increased concentration of lactate irrespective from the starch, likely associated with the duration of fasting. Additional studies are necessary to identify possible starch components involved in hyperlactatemia.

The increased plasma lactate levels (>2.2 mmol/L) verified in all patients even during euglycemia period deserves further investigation. As G6Pase also catalyzes one important step in gluconeogenesis [4] and this metabolic pathway is underactivated during euglycemia, the increased lactate levels may not be related

to the gluconeogenesis. Hypothetically, such increased lactate concentrations could be directly associated with the metabolism of fructose or other sugars. The preparation of SMS using different cassava species, processing techniques of a mixture of brands could be employed in future trials. It also should be highlighted that four participants presented with high lactate levels and ten participants have displayed hypertriglyceridemia at the baseline evaluation, suggesting a previous poor metabolic control.

The main limitations of the present study are its short-term duration and that the evaluated dosages of the starches were distinct from that used in the pre-trial period.

Conclusions

This study demonstrated a longer duration of euglycemia and greater stability of glucose levels in GSD Ia patients who underwent a short-term intervention with SMS, suggesting that this starch is a promising alternative in the treatment of this condition. Additional studies are warranted to understand the long-term effects of the administration of SMS and to identify possible starch components involved in hyperlactatemia.

Methods

Study design

This was a randomized, triple-blinded, phase I/II crossover study designed to evaluate the safety and efficacy of SMS in comparison to UCCS in preventing the hypoglycemia associated with GSD Ia. Participants were randomly assigned to groups receiving distinct starches. The principal investigators, the participants and the statistician were blind to the type of starch received. Only the researcher responsible for randomization and the study dietitian who dispensed study starches were not blinded to the type of starch administered. The study protocol included a hospitalization for two consecutive days and

nights. At the time of hospital admission, anamnesis and physical examination (including weight and height assessment) were performed. All participants remained under their usual dietary treatment for GSD Ia during the day 1. The same dinner meal was served at 6 pm for all participants. At 10 pm, distinct randomized starches were orally administered. Patients remained with a permanent peripheral saline catheter, without any continuous infusion and without mobility restrictions.

Peripheral blood samples were collected at 10 pm (basal evaluation) to determine glucose, lactate, insulin, triglycerides, total cholesterol and HDL fraction and uric acid levels. Subsequently, the participants ingested 100 g of starch (UCCS or SMS) diluted in 200 mL of drinkable water. Blood samples were collected in a 1 h-interval following starch administration and the vital signs were checked. No additional food or beverages (water excepted) ingestion were allowed.

The fasting was interrupted at 8 am. The participants were allowed to follow their usual dietary treatment until 10 pm. After a standardized meal for dinner with an average of 50 g of carbohydrates, the participants received the switched starch, and the same evaluations were performed on the second night. The only modification was the type of starch administered (Fig. 3).

In case of hypoglycemia (blood glucose less than 3.88 mmol/L or 70 mg/dL) or symptoms of hypoglycemia, the fasting was discontinued immediately, and the participant received 10 g of glucose closely with the meal.

Participants

To be eligible, participants should have clinical and genetic diagnosis of GSD Ia, be ≥ 16 years old, and be under UCCS therapy. All participants were seen at the Metabolic Disorders Clinics of Hospital das Clínicas in Porto Alegre, Brazil. Demographic data and clinical variables were retrieved from participants' medical records.

Participants received an anonymous reference number and were randomly assigned to receive SMS or UCCS in the first night of the study (Fig. 3). The starches were manufactured in accordance with the Brazilian standardized techniques for food quality and inspection. Physicians and dietitians planned a safe fasting for each participant before starting the trials.

Tested products

Both starch samples were produced in Brazil (SMS from Fritz & Frida[®] and UCCS from Maizena[®]), similarly to the previous study of Nalin et al. [12]. All starch doses were administered as 100 g of raw powder diluted in 200 mL of water at room temperature as preconized

for dietary treatment in GSD Ia. The high dose of starch (100 g) was determined in accordance with previous literature [18]. During the experimental procedures, both starches were stored in identical containers numbered in accordance with the randomization sequences by the study dietitian. The starches nutrition information is provided in Table 3.

Randomization

Randomization was performed using an online software (www.randomization.com) by a researcher who was unaware of obtained clinical records. Blind data were maintained to all study personnel until the conclusion of statistical analysis, except for the study dietitian who prepared the starches doses for the participants. The researcher responsible for randomization and the study dietitian who dispensed study starches were not present in the tests and had no contact with the enrolled participants.

Biochemical blood evaluation

Blood analysis was performed as follow: glucose (hexokinase colorimetric assay); lactate (colorimetric assay, normal range values (NRV): 0.5–2.2 mmol/L), insulin (chemiluminescent microparticle immunoassay, NRV: 1.4–14 μ UI/mL), total cholesterol (enzymatic colorimetric assay, NRV: <200 mg/dL), HDL cholesterol (homogeneous enzymatic colorimetric method, NRV: >35 mg/dL), triglycerides (enzymatic colorimetric method, NRV: <150 mg/dL) and uric acid (enzymatic colorimetric assay, NRV: 3.4–7 mg/dL). All analyses were performed by using a Cobas c702 analyzer and commercial kits. Insulin evaluation was performed using a Ci4100 analyzer. The plasma was frozen for 15 min after collection and then used in insulin evaluation.

Study outcomes

The maintenance of euglycemia (blood glucose ≥ 3.88 mmol/L) was the primary endpoint of the study. The impact of dietary treatment on plasma lactate was considered a secondary endpoint.

Statistical analysis

Categorical variables were represented as frequencies and percentages and continuous variables were presented as means and/or medians, standard deviation, and percentiles. The main data were analyzed as proposed by Altman (1991), which investigated period effects, treatment-by-period interactions, and treatment effects. The level of significance was established at 5% ($p < 0.05$). Analysis of variance (ANOVA) was used to compare the

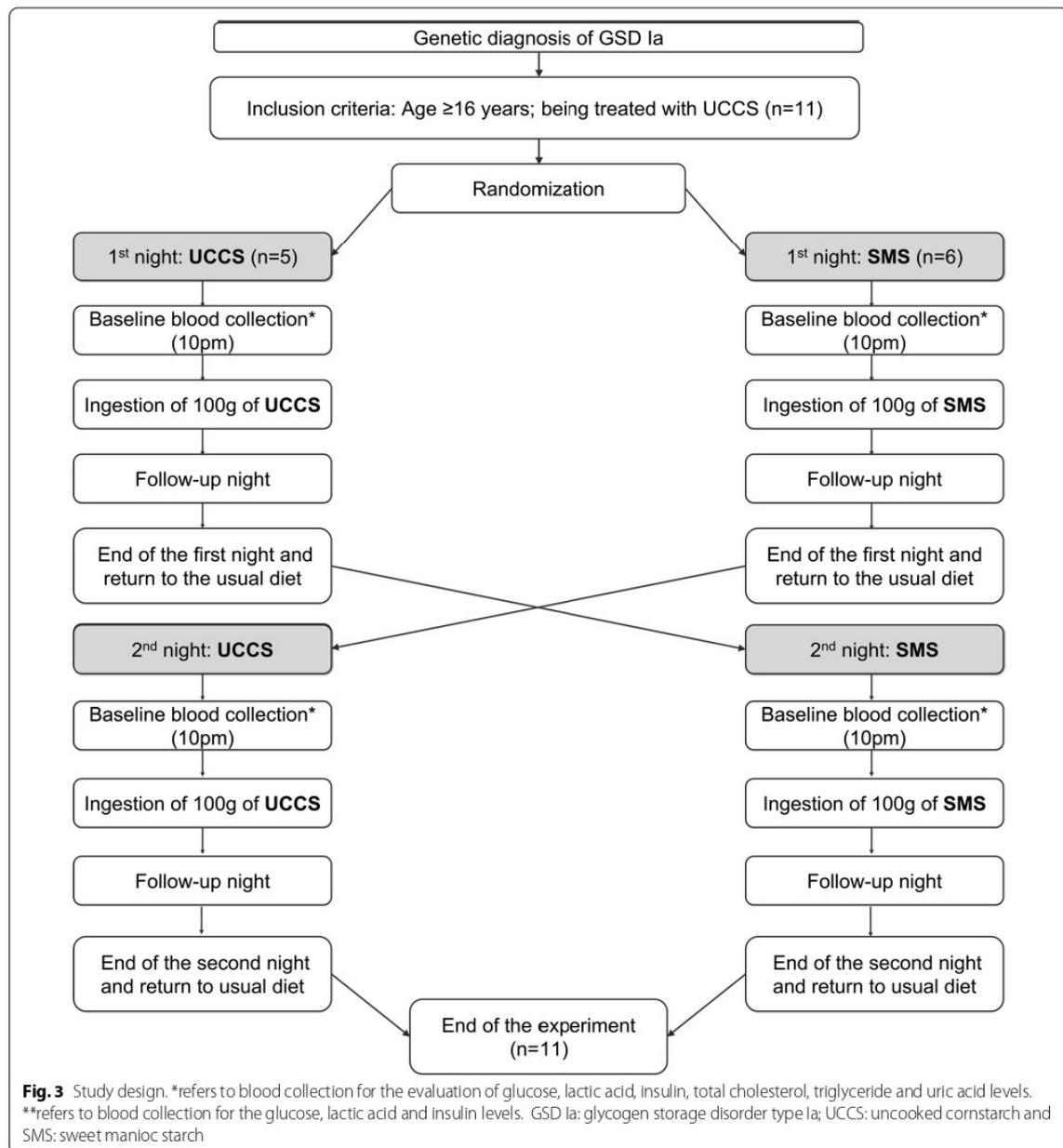


Table 3 Starch nutrition facts

Nutrition Facts	UCCS	SMS
Portion (g)	20	20
Energy (kcal)	70	70
Protein (g)	0	0
Fat (g)	0	0
Carbohydrate (g)	17	17
Fiber (g)	0	0

UCCS uncooked comstarch, SMS sweet manioc starch. Information provided by food brand owners in label data

results and data were analyzed using the software SPSS v.18 and Stata V.

Ethical aspects

The study was approved by the Ethics Board of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil (protocol #52645116500005327). The study design is registered in ClinicalTrials.gov (NCT03871673). All participants and their legal representatives read and signed the informed consent form before being enrolled in this study. This is an investigator-funded study.

Abbreviations

GSD Ia: Glycogen storage disease type 1a; UCCS: Uncooked cornstarch; SMS: Sweet manioc starch; G6Pase: Glucose-6-phosphatase enzyme; OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man; TIM-1: Dynamic gastro-small intestine model; ANOVA: Analysis of variance; HDL: High density lipoprotein; WMHM20: Waxy Maize (Heat Modified) 20; NRV: Normal range values.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre for sponsoring the present study. We would like to thank Vania N Hirakata for the statistics analysis, the nurses Caroline Campos and Anna Terra and the nurse team from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Special thanks to Franciele Trapp, Tássia Tonon, Devora Randon, Rafael Tresbach and Miguel Krigsner. We also thank Camilla Hissamura who assisted in translating this manuscript from Portuguese to English. A very special thanks to all enrolled participants and their families.

Authors' contributions

IVDS was the principal investigator of the study. TN, TGJD, CFMS and IVDS designed the study. FSL performed the genetic analyses. BBS and TN participated in the randomization process. LFR performed the nutritional evaluations and diet prescriptions. VCLM, BMO, TN, CFMS and IVDS performed clinical data collection. BMO and CFMS performed clinical evaluations. VCLM, BMO and BBS performed data analyses. VCLM, BMO and BBS drafted the manuscript. TGJD, CFMS, IVDS critically revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This study was financially supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and FIPE/HCPA (Hospital de Clínicas de Porto Alegre Research and Event Incentive Fund). The authors are entirely responsible for the study design, data analyses and the scientific content of the manuscript.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the HCPA Research Ethics Committee (protocol #52645116500005327) and ClinicalTrials.gov (NCT03871673). All participants or their legal guardians signed an informed consent form.

Consent for publication

"Not applicable".

Competing interests

TN is currently an employee of Ultragenyx Farmacéutica Brasil LTDA and hold stock in Ultragenyx Pharmaceutical Inc. All other authors declare no conflicts of interest.

Author details

¹Post-Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Ramiro Barcelos St., 2350, Porto Alegre, Brazil. ²Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences Laboratory (B.R.A.I.N), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos St, 2350, Porto Alegre, Brazil. ³Ultragenyx Brasil Farmacéutica Ltda, Presidente Juscelino Kubitschek Avenue, São Paulo, SP 04543-011, Brazil. ⁴Section of Metabolic Diseases, Beatrix Children's Hospital, University Medical Center of Groningen, University of Groningen, PO Box 30001, 9700 RB Groningen, The Netherlands. ⁵Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil. ⁶Department of Genetics, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, Brazil. ⁷NUCLIMED, Center for Clinical Research, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos St, 2350, Porto Alegre, Brazil.

Received: 10 February 2021 Accepted: 21 May 2021

Published online: 03 June 2021

References

- Wolfsdorf JI, Weinstein DA. Glycogen storage diseases. *Rev Endocr Metab Disord*. 2003;4(1):95–102. <https://doi.org/10.1023/a:1021831621210>.
- Koerber DD, Kishnani PS, Chen YT. Glycogen storage disease types I and II: treatment updates. *J Inher Metab Dis*. 2007;30(2):159–64. <https://doi.org/10.1007/s10545-007-0519-9>.
- Brody LC, Abel KJ, Castilla LH, et al. Construction of a transcription map surrounding the BRCA1 locus of human chromosome 17. *Genomics*. 1995;25(1):238–47. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(95\)80131-5](https://doi.org/10.1016/0888-7543(95)80131-5).
- Grinshpun A, Condiotti R, Waddington SN, et al. Neonatal gene therapy of glycogen storage disease type Ia using a feline immunodeficiency virus-based vector. *Mol Ther*. 2010;18(9):1592–8. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.119>.
- Froissart R, Piraud M, Boudjemline AM, et al. Glucose-6-phosphatase deficiency. *Orphanet J Rare Dis*. 2011;6:27. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-6-27>.
- Bali DS, Chen YT, Austin S, Goldstein JL. Glycogen Storage Disease Type I. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al, eds. *GeneReviews*®. University of Washington, Seattle. Copyright © 1993–2020, University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.; 1993.
- Laforêt P, Weinstein D, Smit P. Inborn metabolic diseases: diagnosis and treatment In: Saudubray J, van den Berghe G, Walter J, eds. 2012:115–139:chap The glycogen storage diseases and related disorders.
- Kishnani PS, Austin SL, Abdenur JE, 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):e1. <https://doi.org/10.1038/gim.2014.128>.
- NCT0397027. Long-term follow-up to evaluate the safety and efficacy of adeno associated virus (AAV) serotype 8 (AAV8)-mediated gene transfer of glucose-6-phosphatase (G6Pase) in adults with glycogen storage

- disease type Ia (GSDIa). NCT0397027. Accessed Apr 7, 2021. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT03970278>
10. Bhattacharya K, Orton RC, Qi X, et al. A novel starch for the treatment of glycogen storage diseases. *J Inherit Metab Dis*. 2007;30(3):350–7. <https://doi.org/10.1007/s10545-007-0479-0>.
 11. Li S, Cui Y, Zhou Y, Luo Z, Liu J, Zhao M. The industrial applications of cassava: current status, opportunities and prospects. *J Sci Food Agric*. 2017;97(8):2282–90. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8287>.
 12. Nalin T, Sperb-Ludwig F, Venema K, Derks TG, Schwartz IV. Determination of amylose/amylopectin ratio of starches. *J Inherit Metab Dis*. 2015;38(5):985–6. <https://doi.org/10.1007/s10545-015-9850-8>.
 13. Nalin T, Venema K, Weinstein DA, et al. In vitro digestion of starches in a dynamic gastrointestinal model: an innovative study to optimize dietary management of patients with hepatic glycogen storage diseases. *J Inherit Metab Dis*. 2015;38(3):529–36. <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9763-y>.
 14. Rousseau-Nepton I, Huot C, Laforte D, et al. Sleep and quality of life of patients with glycogen storage disease on standard and modified uncooked cornstarch. *Mol Genet Metab*. 2018;123(3):326–30. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2017.09.003>.
 15. Thornhill C, Saavedra H, Tatevian N, et al. A Case of eosinophilic gastroenteritis in a Patient with glycogen storage disease type 1a. *Open J Clin Med Case Rep*. 2017;3(12):1–2.
 16. Peeks F, Boonstra WF, de Baere L, et al. Research priorities for liver glycogen storage disease: an international priority setting partnership with the James Lind Alliance. *J Inherit Metab Dis*. 2020;43(2):279–89. <https://doi.org/10.1002/jimd.12178>.
 17. Bhattacharya K, Mundy H, Lilburn MF, Champion MP, Morley DW, Maillot F. A pilot longitudinal study of the use of waxy maize heat modified starch in the treatment of adults with glycogen storage disease type I: a randomized double-blind cross-over study. *Orphanet J Rare Dis*. 2015;10:18. <https://doi.org/10.1186/s13023-015-0229-6>.
 18. Correia CE, Bhattacharya K, Lee PJ, et al. Use of modified cornstarch therapy to extend fasting in glycogen storage disease types Ia and Ib. *Am J Clin Nutr*. 2008;88(5):1272–6. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.26352>.
 19. Sidbury JB, Chen YT, Roe CR. The role of raw starches in the treatment of type I glycogenosis. *Arch Intern Med*. 1986;146(2):370–3.
 20. Anderson GH, Cho CE, Akhavan T, Mollard RC, Luhovyy BL, Finocchiaro ET. Relation between estimates of cornstarch digestibility by the Englyst in vitro method and glycemic response, subjective appetite, and short-term food intake in young men. *Am J Clin Nutr*. 2010;91(4):932–9. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.28443>.
 21. Series FFaN. Maize in human nutrition. Accessed October, 2020. <http://www.fao.org/3/t0395e/t0395e00.htm>

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



5. Conclusão

Objetivo específico 1- *Avaliar a eficácia e segurança da administração de PD em pacientes com GSD Ia*: A eficácia da administração do PD foi observada com a maior duração da euglicemia e maior estabilidade dos níveis de glicose. A segurança foi demonstrada pela ausência de eventos adversos graves, necessidade de interrupção ou desistência durante o ensaio clínico, e apesar do quadro hiperlactatemia severa ($\geq 5\text{mmol/L}$) apresentado na vigência de ambos os testes.

Objetivo específico 2- *Comparar a resposta glicêmica e marcadores de metabólitos secundários (lactato, insulina, triglicerídeos, ácido úrico, colesterol total e HDL-colesterol), associados ao uso da terapia tradicional (AMC) e da nova terapia proposta (PD) em pacientes com GSD Ia*: Quanto a resposta glicêmica, após a administração do PD os valores se mantiveram em níveis desejáveis (>70 e $<100\text{mg/dL}$) por mais tempo com o PD, sem apresentar picos glicêmicos, demonstrando sua superioridade ou no mínimo sua equivalência ao tratamento tradicional. Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis séricos dos metabólitos secundários na vigência de ambas as intervenções.

Objetivo específico 3- *Analisar o teor de umidade, proteínas, lipídeos, açúcares, amilose e amilopectina de amostras de PD e AMC*: Os amidos analisados apresentavam apenas traços de proteínas e lipídios, conforme o esperado. Açúcares foram detectados e quantificados nos produtos utilizados no ensaio clínico, confirmando a hipótese prévia. O teor de amilopectina das amostras de PD são maiores que das AMC.

6. Referências

ABT, Melanie R.; ZEEMAN, Samuel C. Evolutionary innovations in starch metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, [s. l.], v. 55, p. 109–117, 2020.

APLEVICZ, Krischina Singer; DEMIATE, Ivo Mottin. Caracterização de amidos de mandioca nativos e modificados e utilização em produtos panificados. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 478–484, 2007. Disponível em: Acesso em: 15 ago. 2022.

APRIYANTO, Ardha; COMPART, Julia; FETTKE, Joerg. A review of starch, a unique biopolymer - Structure, metabolism and in planta modifications. **Plant science**, [s. l.], v. 318, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35351303/>. Acesso em: 28 maio 2022.

BALI, D S *et al.* Glycogen Storage Disease Type I. In: **Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2022.**, [s. l.], 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1312/>.

BELLO-PEREZ, Luis A. *et al.* Starch digestibility: past, present, and future. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s. l.], v. 100, n. 14, p. 5009–5016, 2020.

BHATTACHARYA, Kaustuv *et al.* A pilot longitudinal study of the use of waxy maize heat modified starch in the treatment of adults with glycogen storage disease type I: A randomized double-blind cross-over study. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2015.

BRACKEN, Richard M.; GRAY, Benjamin J.; TURNER, Daniel. Comparison of the metabolic responses to ingestion of hydrothermally processed high-amylopectin content maize, uncooked maize starch or dextrose in healthy individuals. **The British journal of nutrition**, [s. l.], v. 111, n. 7, p. 1231–1238, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24229467/>. Acesso em: 26 jul. 2022.

CARVALHO, Eliana Pinheiro de *et al.* Polvilho Azedo: aspectos físicos, químicos e microbiológicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 129–137, 1996.

CHEN, Yuan-Tsong. **Pediatric Nephrology Type I glycogen storage disease: kidney involvement, pathogenesis and its treatment** *Pediatr Nephrol.* [S. l.: s. n.], 1991.

CHEN, Y.-T *et al.* **Type I glycogen storage disease: Nine years of management with cornstarch** *European Journal of Pediatrics.* [S. l.]: Springer-Verlag, 1993.

CHOU, Janice Y.; KIM, Goo Young; CHO, Jun Ho. **Recent development and gene therapy for glycogen storage disease type Ia.** [S. l.]: KeAi Communications Co., 2017.

COLONETTI, Karina *et al.* Hepatic glycogen storage diseases are associated to microbial dysbiosis. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 14, n. 4, 2019. Disponível em: Acesso em: 11 ago. 2022.

COZZOLINO, Silvia Maria Franciscato; COMINETTI, Cristiane. **Bases bioquímicas e fisiológicas da nutrição: nas diferentes fases da vida, na saúde e na doença.** Barueri, SP: [s. n.], 2013.

DAHLBERG, Kathryn R. *et al.* Cornstarch requirements of the adult glycogen storage disease Ia population: A retrospective review. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, [s. l.], v. 43, n. 2, p. 269–278, 2020.

DERKS, Terry G.J. *et al.* **Dietary treatment of glycogen storage disease type Ia: Uncooked cornstarch and/or continuous nocturnal gastric drip-feeding?** [S. l.: s. n.], 2013.

DOS SANTOS, Bruna B. *et al.* Body composition in patients with hepatic glycogen storage diseases. **Nutrition**, [s. l.], v. 103–104, p. 111763, 2022. Disponível em: Acesso em: 11 ago. 2022.

EKSTEIN, Josef *et al.* Mutation frequencies for glycogen storage disease IA in the Ashkenazi Jewish population. **American Journal of Medical Genetics**, [s. l.], v. 129, n. 2, p. 162–164, 2004.

ELLINGWOOD, Sara S.; CHENG, Alan. Biochemical and clinical aspects of glycogen storage diseases. **The Journal of endocrinology**, [s. l.], v. 238, n. 3, p. R131–R141, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29875163/>. Acesso em: 13 ago. 2022.

FROISSART, Roseline *et al.* **Glucose-6-phosphatase deficiency**. [S. l.: s. n.], 2011.

GARBADE, Sven F. *et al.* Impact of glycogen storage disease type I on adult daily life: a survey. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, [s. l.], v. 16, n. 1, 2021.

GISMONDI, Angelo *et al.* Starch granules: a data collection of 40 food species. **Plant Biosystems**, [s. l.], v. 153, n. 2, p. 273–279, 2019.

GOLDBERG, Teresia; SLONIM, Alfred E. Nutrition therapy for hepatic glycogen storage diseases. **JAm Diet Assoc**, [s. l.], v. 93, n. 12, p. 1423–1430, 1993.

GOMES, Anida Maria Moraes *et al.* ANNEALING OF UNFERMENTED (POLVILHO DOCE) AND FERMENTED (POLVILHO AZEDO) CASSAVA STARCHES. **B.CEPPA**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 223–232, 2010.

HELLER, Solange; WORONA, Liliana; CONSUELO, Alejandra. Nutritional Therapy for Glycogen Storage Diseases. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, [s. l.], v. 47, n. Suppl. 1, 2008. Disponível em: <http://journals.lww.com/jpgn>.

HIJAZI, Ghada *et al.* Use of waxy maize heat modified starch in the treatment of children between 2 and 5 years with glycogen storage disease type I: A retrospective study. **Molecular Genetics and Metabolism Reports**, [s. l.], v. 21, 2019.

HOU, J W; WANG, T R. A 20-Year Follow-Up of a Male Patient with Type Ia Glycogen Storage Disease. **Chang Gung medical journal**, [s. l.], v. 26, n. 4, p.

283–287, 2003. Disponível em: <http://cgmj.cgu.edu.tw/2604/260407.pdf>. Acesso em: 4 jan. 2021.

JACOBY, Jérica Tamara *et al.* Bone Mineral Density in Patients with Hepatic Glycogen Storage Diseases. **Nutrients** **2021**, Vol. **13**, Page **2987**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 2987, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/13/9/2987/htm>. Acesso em: 11 ago. 2022.

KAISER, Nathalie *et al.* Glycemic control and complications in glycogen storage disease type I: Results from the Swiss registry. **Molecular Genetics and Metabolism**, [s. l.], v. 126, n. 4, p. 355–361, 2019.

KAISER, Stephanie; SZIRANYI, Janina; GROSS, Dominik. Edgar von Gierke (1877-1945) – Eponym of “von Gierke disease” and double victim of National Socialism. **Pathology Research and Practice**, [s. l.], v. 216, n. 4, 2020.

KISHNANI, Priya S. *et al.* Diagnosis and management of glycogen storage disease type I: A practice guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics. **Genetics in Medicine**, [s. l.], v. 16, n. 11, p. 1–29, 2014.

MARION, R W; PALJEVIC, E. The Glycogen Storage Disorders. **Pediatrics In Review**, [s. l.], v. 41, n. 1, 2020.

NALIN, Tatiéle *et al.* Determination of amylose/amylopectin ratio of starches. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, [s. l.], v. 38, p. 985–986, 2015a.

NALIN, Tatiéle *et al.* In vitro digestion of starches in a dynamic gastrointestinal model: an innovative study to optimize dietary management of patients with hepatic glycogen storage diseases. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, [s. l.], v. 38, n. 3, p. 529–536, 2015b. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1007/s10545-014-9763-y>. Acesso em: 26 jul. 2022.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

ONKY, Yogik *et al.* **Glycogen Storage Disease Type Ia Screening Using Dried Blood Spots on Filter Paper: Application of COP-PCR for Detection of**

the c.648G>T G6PC Gene Mutation Kobe J. Med. Sci. [S. l.: s. n.], 2021. Disponível em: <http://www.hgmd.cf.ac.uk>. .

ÖZEN, Hasan; BAYRAKTAR, Yusuf. Glycogen storage diseases: New perspectives Professor, Series Editor. **World J Gastroenterol**, [s. l.], v. 13, n. 18, p. 2541–2553, 2007. Disponível em: www.wjgnet.com<http://www.wjgnet.com/1007-9327/13/2541.asp>.

PRESTEGARD, James H.; LIU, Jian; WIDMALM, Göran. Oligosaccharides and Polysaccharides. **Essentials of Glycobiology**, [s. l.], 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28876840/>. Acesso em: 26 jul. 2022.

RAKE. PJ *et al.* Guidelines for management of glycogen storage disease type I - European Study on Glycogen Storage Disease Type I (ESGSD I). **European Journal of Pediatrics**, [s. l.], v. 161, n. 0, p. S112–S119, 2002.

REIS, Cristina V S *et al.* **Glycogenosis type I** *Jornal de Pediatria*. [S. l.: s. n.], 1999.

ROSS, Katalin M. *et al.* **Dietary Management of the Glycogen Storage Diseases: Evolution of Treatment and Ongoing Controversies**. [S. l.]: Oxford University Press, 2020.

SANTOS, Berenice L. *et al.* Glycogen storage disease type I: Clinical and laboratory profile. **Jornal de Pediatria**, [s. l.], v. 90, n. 6, p. 572–579, 2014.

SANTOS, Bruna B. dos *et al.* Nutritional Status and Body Composition in Patients With Hepatic Glycogen Storage Diseases Treated With Uncooked Cornstarch—A Controlled Study. **Journal of Inborn Errors of Metabolism and Screening**, [s. l.], v. 5, p. 1–7, 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/jiems/a/Q5CYzPtmVbkGTVb3kSkJh3d/abstract/?lang=en>. Acesso em: 8 ago. 2022.

SAUDUBRAY, JM; BAUMGARTNER, M; WALTER, J. **Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment**. 6th. ed. Berlin: Springer , 2016.

SAUDUBRAY, Jean Marie; GARCIA-CAZORLA, Àngels. **Inborn Errors of Metabolism Overview: Pathophysiology, Manifestations, Evaluation, and Management**. [S. l.]: W.B. Saunders, 2018.

SEVER, Sakine *et al.* Glycogen storage disease type Ia: Linkage of glucose, glycogen, lactic acid, triglyceride, and uric acid metabolism. **Journal of Clinical Lipidology**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 596–600, 2012.

SHAH, K. K.; O'DELL, S. D. Effect of dietary interventions in the maintenance of normoglycaemia in glycogen storage disease type 1a: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 329–339, 2013.

SIDBURY, James B.; CHEN, Yuan Tsong; ROE, Charles R. The Role of Raw Starches in the Treatment of Type I Glycogenosis. **Archives of Internal Medicine**, [s. l.], v. 146, n. 2, p. 370–373, 1986. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jamainternalmedicine/fullarticle/606612>. Acesso em: 26 jul. 2022.

SMITH, Colleen; MARKS, Allan D; LIEBERMAN, Michael. **Bioquímica Médica Básica de Marks**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

SPERB-LUDWIG, Fernanda *et al.* Glycogen storage diseases: Twenty-seven new variants in a cohort of 125 patients. **Molecular Genetics and Genomic Medicine**, [s. l.], v. 7, n. 11, 2019.

STEUNENBERG, Thomas A.H. *et al.* Safety issues associated with dietary management in patients with hepatic glycogen storage disease. **Molecular Genetics and Metabolism**, [s. l.], v. 125, n. 1–2, p. 79–85, 2018.

SZYMAŃSKA, Edyta *et al.* Over 20-Year Follow-up of Patients with Hepatic Glycogen Storage Diseases: Single-Center Experience. **Diagnostics**, [s. l.], v. 10, n. 5, 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC7277974/>. Acesso em: 18 set. 2022.

THORNHILL, Chad *et al.* A Case of eosinophilic gastroenteritis in a Patient with glycogen storage disease type 1a. **Open J Clin Med Case Rep**, [s. l.], v. 3, n. 12:1272, 2017. Disponível em: Acesso em: 26 jul. 2022.

WOLFSDORF, Joseph I; WEINSTEIN, David A. **Glycogen Storage Diseases** *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*. [S. l.]: Kluwer Academic Publishers, 2003.

ZHANG, Jinping; SHI, Wenjing; CHEN, Chao. Neonatal glycogen storage disease Ia. **Pediatrics and Neonatology**, [s. l.], v. 56, n. 1, p. 66–67, 2015.

ZHANG, Genyi; VENKATACHALAM, Mahesh; HAMAKER, Bruce R. Structural basis for the slow digestion property of native cereal starches. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 7, n. 11, p. 3259–3266, 2006.

ANEXOS

ANEXO 1- CARTA DE APROVAÇÃO ÉTICA DO PROJETO Nº 2016-0056



**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: 160056

Data da Versão do Projeto: 01/02/2016

Pesquisadores:

IDA VANESSA DOEDERLEIN SCHWARTZ

BRUNA BENTO DOS SANTOS

FILIPPO PINTO VAIRO

CAROLINA FISCHINGER MOURA DE SOUZA

TATIELE NALIN

Título: Abordagem inovadora no tratamento das Glicogenoses Hepáticas: um estudo baseado no uso de Polvilho Doce Cru

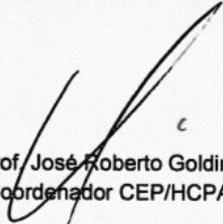
Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

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, 27 de julho de 2016.


Prof. José Roberto Goldim
Coordenador CEP/HCPA

ANEXO 2– TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: Abordagem inovadora no tratamento das Glicogenoses Hepáticas:
um estudo baseado no uso de Polvilho Doce Cru

Pesquisador Responsável: Prof. Dra. Ida Vanessa Doederlein Schwartz.
Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Rua
Ramiro Barcelos, 2350. Porto Alegre-RS. Telefone (51) 3359.8011.

Prezado participante (ou responsável),

Gostaríamos de convidá-lo para participar de um estudo sobre a avaliação da eficácia e segurança da utilização do polvilho doce cru no tratamento de pacientes com Glicogenoses hepáticas.

A Glicogenose Hepática é uma doença hereditária causada por falta de uma enzima do fígado, dependendo do tipo de Glicogenose, diferentes enzimas estão faltando. Quando não temos uma dessas enzimas, e temos então Glicogenose, nas situações em que ficamos em jejum, não conseguimos manter o açúcar do sangue normal. O açúcar baixo no sangue pode provocar diversos sintomas, tais como: tremores, suor frio, cansaço, sonolência, convulsão. O tratamento da Glicogenose é a alimentação frequente com alimentos que mantem os níveis de açúcar no sangue elevados por mais tempo, como o amido de milho cru.

Neste estudo serão utilizados polvilho doce da marca Fritz & Frida® e o amido de milho da marca Maizena®, ambos de origem brasileira, os quais foram analisados no estudo anterior da equipe no modelo gastrointestinal artificial. Nesse estudo o uso do polvilho doce apresentou resultados promissores. Os mesmos serão fornecidos da forma crua, da mesma forma que o amido de milho é utilizado

atualmente no seu tratamento. Frisa-se que este estudo é de iniciativa do pesquisador, e que, até o momento, não possui apoio das indústrias envolvidas na produção do polvilho doce ou da Maizena®.

As doses administradas aos pacientes serão de 100g de amido diluídos em 200mL de água em temperatura ambiente.

Para realização do estudo, os pacientes permanecerão duas noites consecutivas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre no Centro de Pesquisa Clínica (CPC). Os pacientes permanecerão em sua dieta normal até a administração dos amidos às 22 horas.

Antes da realização dos testes, todos os pacientes receberão um jantar padronizado. Para realização do teste, às 22h será realizada coleta de sangue para determinação de glicose, lactato, insulina, triglicerídeos, colesterol total e HDL e ácido úrico, após isso o paciente irá ingerir 100 g de amido (amido de milho ou polvilho doce, determinado por randomização prévia) diluído em 200mL de água. Em sequência, glicose, lactato e insulina serão mensurados a cada hora até o momento que o paciente apresentar valor de glicose sérica inferior a 70mg/dL ou após o paciente permanecer 10h em jejum. Após, o paciente retornará a sua dieta usual até o próximo teste às 22 horas.

Os mesmos procedimentos serão realizados na segunda noite, a única mudança será o amido utilizado, sendo que se o paciente ingeriu amido de milho cru na primeira noite, na noite seguinte o mesmo irá ingerir o polvilho doce, e vice-versa.

Se o paciente apresentar hipoglicemia durante o estudo, o mesmo será interrompido e serão fornecidos 10 gramas de glicose, juntamente com um lanche. O café da manhã será consumido às 8 horas e então o paciente entrará no seu regime de dieta normal até o próximo teste às 22 horas, no caso de ser a primeira noite, ou seguirá sua dieta usual ao final da segunda noite.

Para a segurança dos pacientes os sinais vitais como frequência cardíaca, frequência respiratória e temperatura axilar, serão monitorados antes da ingestão do amido e, no mínimo, a cada hora. A monitorização de glicose será

realizada, juntamente ao leito, através de glicosímetro (a cada hora). O monitoramento será realizado até no máximo 10 horas, contudo os seguintes achados irão resultar em uma parada antecipada do experimento: Glicose plasmática abaixo de 70 mg/dL e sintomas de hipoglicemia como tremores e sudorese.

Uma vez que nenhum dos critérios acima seja observado, o café da manhã será servido, não passando das 8 horas da manhã. A partir daí o paciente retornará a sua dieta usual, com refeições e uso de amido de milho cru, na dosagem prescrita, até o horário marcado para a próxima dose do amido em estudo ou para retorno à dieta usual ao final da segunda noite.

Durante as duas noites de experimento um profissional da enfermagem ficará acompanhando o paciente e, além disso, um médico ficará à disposição para ser contatado a qualquer momento.

Além disso, serão coletadas também amostras de sangue e urina no início de no final de cada uma das noites do estudo, para verificar se o paciente apresenta dano tecidual. Assim será possível avaliar se pacientes com Glicogenose apresentam lesões nas células do corpo.

RISCOS E BENEFÍCIOS

Os riscos relacionados à participação são de dor no local da punção venosa, desconforto relacionado à troca da dieta habitual, desconforto pela mudança na rotina de sono e possível hipoglicemia, esta se ocorrer será revertida pela administração de glicose.

Os benefícios relacionados a este estudo são de aprimoramento do conhecimento acerca do melhor e mais eficaz tratamento para os pacientes com Glicogenose Hepática.

DÚVIDAS

Se você tiver alguma dúvida em relação à pesquisa, deve contatar a Dra. Ida Vanessa Doederlein Schwartz, telefone (51) 3359 8011, no Serviço de Genética Médica do HCPA. Além disso, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, através do telefone (51) 3359 7640 localizado no segundo andar do HCPA, cujo horário de funcionamento é das 8h às 17h de segunda à sexta-feira.

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 ser interrompida a qualquer momento por você mesmo(a). Em qualquer caso, você não será penalizado e não haverá a necessidade de justificar a sua decisão. A concordância ou a não concordância em participar não irá alterar o tratamento já estabelecido para você ou para o seu familiar.

CONFIDENCIALIDADE DAS INFORMAÇÕES

As informações dessa pesquisa serão mantidas em sigilo, sendo apenas utilizadas de forma científica, e sem identificação de seu nome quando publicados os resultados. 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. Declara ter sido esclarecido que não receberá nenhuma remuneração financeira e que também não terá nenhum custos por participar do estudo. 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, que uma delas ficou em seu poder.

Data: ___/___/_____

Nome do participante: _____

Assinatura do participante: _____

Nome do responsável (se aplicável): _____

Assinatura do responsável (se aplicável): _____

Data: ___/___/_____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____

ANEXO 3– COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO “POTENTIAL USE OF OTHER STARCH SOURCES IN THE TREATMENT OF GLYCOGEN STORAGE DISEASE TYPE Ia – AN *IN VITRO* STUDY” NO PERIÓDICO ORPHANET JOURNAL OF RARE DISEASES

Orphanet Journal of Rare Diseases
POTENTIAL USE OF OTHER STARCH SOURCES IN THE TREATMENT OF
GLYCOGEN STORAGE DISEASE TYPE Ia – AN IN VITRO STUDY
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	OJRD-D-22-00601	
Full Title:	POTENTIAL USE OF OTHER STARCH SOURCES IN THE TREATMENT OF GLYCOGEN STORAGE DISEASE TYPE Ia – AN IN VITRO STUDY	
Article Type:	Research	
Section/Category:	Inherited metabolic diseases	
Funding Information:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior	MSc. Vaneisse C L Monteiro
	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico	MSc. Vaneisse C L Monteiro
	Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre	MSc. Vaneisse C L Monteiro
Abstract:	<p>Background: Glycogen storage disease type Ia (GSD-Ia) is the most common hepatic GSD. Its treatment mainly consists of a diet with high intake of slow digestion carbohydrates such as raw starch and restriction of simple sugars, what enables the maintenance of euglycemia and prevents secondary metabolic disorders. Starch is a glucose polymer formed by amylose and amylopectin that can be obtained from distinct sources. Although uncooked cornstarch (UCCS) has been successfully used in the treatment of GSD-Ia, it can lead to hyperglycemia and weight gain. <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> tests indicated that the sweet manioc starch (SMS) can be potentially used in the treatment of GSD-Ia. Results: This study biochemically characterized five brands of SMS (samples A to E) and three brands of UCCS (samples F to H) regarding moisture, sugar content and the rate of amylose and amylopectin. The moisture analysis revealed a variation from 10.3% to 12.8% in the SMS samples, while the moisture content of UCCS ranged from 7.3 to 11.1%. Quantifiable sugar was detected in 3/5 samples of SMS and 1/3 sample of UCCS. Notably, this UCCS brand is widely employed in the GSD-Ia treatment in Brazil. The products B and E had higher values of amylopectin and undetectable levels of sugars. Additionally, a clinical trial is warranted to compare the samples F and G and determine the impact of sugar trace in the same dietary source of starch. Conclusions: Collectively, the results demonstrated possible therapeutic alternatives for GSD-Ia in addition to traditional UCCS.</p>	
Corresponding Author:	Ida Schwartz, PhD; MD UFRGS BRAZIL	
Corresponding Author E-Mail:	idadschwartz@gmail.com	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	UFRGS	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Vaneisse C L Monteiro	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Vaneisse C L Monteiro Karina Colonetti Carlos Henrique Pagno Helena O. S. Schmidt Fernanda Sperb-Ludwig	
	Bibiana M Oliveira Sorala Poloni Alessandro O Rios Carolina F Moura de Souza Ida Schwartz, PhD; MD	

ANEXO 4— ARTIGO PUBLICADO COMO COAUTORA DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO NO PERIÓDICO JOURNAL OF INBORN ERRORS OF METABOLISM & SCREENING (JIEMS)

Original Article

Brazilian Food Reference Guide for Phenylalanine Content: A Study Based on the Perception of PKU Patients and Health Providers

Journal of Inborn Errors
of Metabolism & Screening
2022, Volume 10: e20220002
DOI: <https://doi.org/10.1590/2326-4594-JIEMS-2022-0002>

Bruna B. dos Santos¹ , Bibiana M. de Oliveira¹ ,
Vaneisse C. Lima Monteiro¹ , Soraia Poloni², Tassia Tonon²
and Ida V. D. Schwartz^{1, 2, 3, 4} 

Abstract

The mainstay of management of phenylketonuria (PKU) is restriction of dietary phenylalanine (Phe) intake. The present study sought to assess the perception and understanding of health care providers and lay users (patients/family members/caregivers) regarding the national reference database for checking the Phe content of foods, provided by the Brazilian Health Regulatory Agency (Anvisa), whose data are presented in the Table of Phenylalanine Content of Foods (TCFA-Anvisa) and recently in the Phenylalanine Content of Foods Dashboard (PCCFA-Anvisa); and to identify factors which interfere with the usability of these resources. Two online questionnaires, one for providers (n=33) and another for lay users (n=194), were used to collect sociodemographic information, knowledge about dietary management of PKU, sources of information about the Phe content of foods, and perception and understanding of the Anvisa tools. TCFA-Anvisa and PCCFA-Anvisa were not used as main sources of information by either group. Among the participants who had used these tools (15 providers; 35 lay users), most considered the PCCFA-Anvisa to be superior or partially superior to the TCFA-Anvisa. The main limitations reported were related to layout and limited variety of foods. We suggest that the limitations identified in this study be considered for future improvement of these resources.

Keywords

Inborn Errors of Metabolism, Phenylketonurias, Dietary Therapy.

Introduction

Phenylketonuria (PKU) is an inborn error of metabolism characterized by deficient activity of phenylalanine hydroxylase, the enzyme which catalyzes conversion of phenylalanine (Phe) into tyrosine (Tyr). As a result of this metabolic defect, plasma Phe rises to toxic levels. Intake of this amino acid must thus be restricted by patients [1].

The prevalence of PKU varies across populations. It is influenced by genetic factors and by the effectiveness of neonatal screening programs [2]. Its overall prevalence is estimated at 1:10,000 live births worldwide [3]. In Brazil, according to data from the Brazilian Society of Neonatal Screening survey conducted in 18 states, the prevalence was 1:15,839 in 2001 and 1:24,780 in 2002 [4].

Patients who adhere to a Phe-restricted diet since shortly after birth achieve normal intellectual and neurological

development, while those diagnosed late and/or who do not adhere to treatment are subject to severe neurological conditions, including microcephaly, cognitive impairment, and epilepsy [5].

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Genética Médica, Porto Alegre, RS, Brazil.

³Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Genética, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁴Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Centro de Pesquisa Clínica, Núcleo de Investigação Clínica em Medicamentos, Porto Alegre, RS, Brazil.

Received January 29, 2022. Accepted for publication June 20, 2022.

Corresponding Author:

Bruna Bento dos Santos, E-mail: bruna.bdsantos@hotmail.com



This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 License (<http://www.creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) which permits any use, reproduction and distribution of the work without further permission provided the original work is attributed as specified on the Scielo and Open Access pages (<http://www.scielo.br/jiems>).

ANEXO 5– APRESENTAÇÃO ORAL PREMIADA COMO TERCEIRO LUGAR NA CATEGORIA ERROS INATOS DO METABOLISMO, NO VII CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRIAGEM NEONATAL E ERROS INATOS DO METABOLISMO



VIII
CONGRESSO DA
SBTEIM
SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRIAGEM
NEONATAL E ERROS INATOS DE METABOLISMO
3 E 4 DE JUNHO DE 2022 - ONLINE

Trabalho Científico

CERTIFICADO

SÍNDROME DA DEFICIÊNCIA DO TRANSPORTADOR DE GLICOSE TIPO 1 (GLUT1): UMA SÉRIE DE CASOS DE UM SERVIÇO DE GENÉTICA MÉDICA NO BRASIL

Autores: LÍVIA MARIA FERREIRA SOBRINHO, THIAGO OLIVEIRA SILVA, LILIA FARRET REFOSCO, SORAIA POLON, VANEISSE MONTEIRO, FABIANO OLIVEIRA POSWAR, CAROLINA FISCHINGER MOURA DE SOUZA, IDA VANESSA DOEDERLEIN SCHWARTZ

Recebendo o **Prêmio CLOVIS WANNMACHER** com o Terceiro Lugar na categoria de melhores trabalhos apresentados na área de Erros Inatos do Metabolismo no VIII CONGRESSO DA SBTEIM - Triagem Neonatal no Século XXI: Ampliar, Abranger, Cuidar, realizado totalmente ONLINE nos dias 03 e 04 de junho de 2022

Patrocínio da Premiação: **CHROMSYSTEMS**
DIAGNOSTICS BY NPLC & LC-MS/MS
Contribuição exclusiva para Brasil, México, Argentina




TANIA SANCHEZ BACHEGA
Presidente do Congresso


CAROLINA FISCHINGER MOURA DE SOUZA
Presidente da Comissão Científica Erros Inatos de Metabolismo


CRISTIANE KOPACEK
Presidente da Comissão Científica Triagem Neonatal

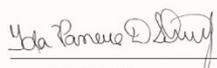
ANEXO 6– PARTICIPAÇÃO COMO PALESTRANTE NO I SIMPÓSIO DE DIETA CETOGENICA EM DOENÇAS GENÉTICAS

I SIMPÓSIO DE
dieta cetogênica
EM DOENÇAS GENÉTICAS

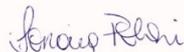
CERTIFICADO

Certificamos que Vaneisse Monteiro ministrou a palestra com título "DESAFIOS DA DIETA CETOGENICA POR VIA ORAL" no evento I Simpósio de Dieta Cetogênica em Doenças Genéticas realizado dia 11/12/2021, de forma online.

Porto Alegre, 20/12/2021



Ida V. D. Schwartz
Chefe do Serviço de Genética
Médica do HCPA



Soraia Poloni
Coordenadora do Evento



Lilia Farret Refosco
Coordenadora do Evento

Organização:



Nutrição
Metabólica

Apoios:



DANONE
KetoCal®

ANEXO 7- PARTICIPAÇÃO COMO PALESTRANTE NO EVENTO ONLINE MPS DAY

#MPS
day 2021

CERTIFICADO

A Liga Acadêmica de Doenças Raras confere o certificado a

Vaneisse Cristina Lima Monteiro

por sua apresentação na palestra intitulada "Atendimento Multidisciplinar nas Mucopolissacaridoses" no evento online **MPS Day 2021**, transmitido pela plataforma digital Youtube.

Belém, 14 de maio de 2021



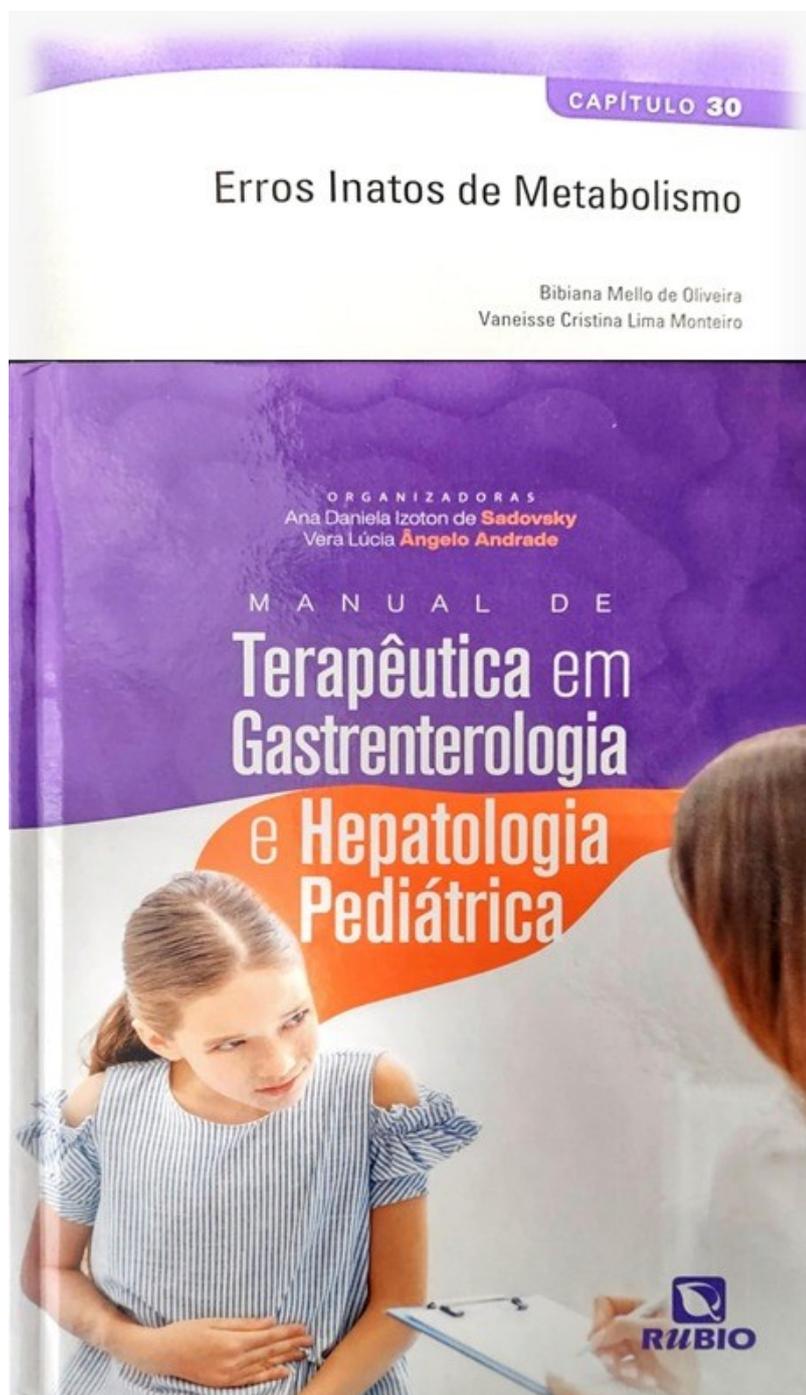
Palmira Steffany Rodrigues Costa
Presidente da Liga Acadêmica de Doenças Raras



Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva
Chefe do Lab. Erros Inatos do
Metabolismo (ICB/UFPA)



ANEXO 8- CAPÍTULO DE LIVRO PUBLICADO COAUTORA DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO PELA EDITORA RUBIO



ANEXO 9– ARTIGO PUBLICADO COMO COAUTORA DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO NO PERIÓDICO HUMAN AND MEDICAL GENETICS



Genetics and Molecular Biology, 44, 4, e20210149 (2021)
Copyright © Sociedade Brasileira de Genética.
DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2021-0149>

Review Article
Human and Medical Genetics

NDUFV1 mutations in complex I deficiency: Case reports and review of symptoms

Vanessa Zanette¹, Daniel do Valle², Bruno Augusto Telles², Alan J. Robinson³, Vaneisse Monteiro², Mara Lucia S. F. Santos², Ricardo Lehtonen R. Souza¹ and Cristiane Benincá^{1,3}

¹Universidade Federal do Paraná, Departamento de Genética, Laboratório de Polimorfismos e Ligação, Curitiba, PR, Brazil.

²Hospital Pequeno Príncipe, Divisão de Neuropediatria, Curitiba, PR, Brazil.

³University of Cambridge, Medical Research Council, Mitochondrial Biology Unit, Cambridge, United Kingdom.

Abstract

Mitochondrial complex I (CI) deficiency is the most common oxidative phosphorylation disorder described. It shows a wide range of phenotypes with poor correlation within genotypes. Herein we expand the clinics and genetics of CI deficiency in the Brazilian population by reporting three patients with pathogenic (c.640G>A, c.1268C>T, c.1207dupG) and likely pathogenic (c.766C>T) variants in the *NDUFV1* gene. We show the mutation c.766C>T associated with a childhood onset phenotype of hypotonia, muscle weakness, psychomotor regression, lethargy, dysphagia, and strabismus. Additionally, this mutation was found to be associated with headaches and exercise intolerance in adulthood. We also review reported pathogenic variants in *NDUFV1* highlighting the wide phenotypic heterogeneity in CI deficiency.

Keywords: Leigh Syndrome, mitochondrial diseases, metabolic acidosis, encephalomyopathies.

Received: May 19, 2021; Accepted: August 18, 2021.

Introduction

Dysfunctions in complex I (NADH ubiquinone dehydrogenase) (CI) represents a third of all early-onset mitochondrial disorders and are genetically and clinically diverse (Hirst, 2013). They are caused by mutations in mitochondrial and nuclear genes, with clinical phenotypes ranging from severe lactic acidosis and death in infants to muscle weakness in adults. Five clinical groups were associated with CI deficiency: Leigh syndrome, progressive leukoencephalopathy, neonatal cardiomyopathy, severe infantile lactic acidosis, and a miscellaneous group of unspecified encephalomyopathies (Fassone and Rahman, 2012). Correlations between genotype and phenotype in mitochondrial diseases are not fully understood and need further exploration (Baertling *et al.*, 2018)

CI is a protein complex composed of 44 different subunits, seven of which are encoded by mitochondrial DNA (mtDNA) and the remaining by nuclear DNA (nDNA) (Hirst, 2013). CI catalyzes the oxidation of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) in the mitochondrial matrix, supplying electrons to complex III via reduction of coenzyme Q. The electron flux through CI sustains the translocation of four protons across the inner mitochondrial membrane, thus contributing to the mitochondrial electrochemical potential. CI is also an important source of reactive oxygen species (ROS) in

mitochondria, which causes cellular oxidative stress (Murphy, 2009). CI is subdivided into three modules: the electron input (N) module, the electron output (Q) module, and the proton translocations (P) module. The N module is composed of subunits encoded by the genes *NDUFV1*, *NDUFV2*, and *NDUFS1* (Brandt, 2006). The *NDUFV1* gene (NG_013353.1) is located on chromosome 11 and encodes the NADH-ubiquinone oxidoreductase flavoprotein (NM_007103.4), a hydrophilic polypeptide of 51 kDa, which oxidizes NADH and is a major site of ROS production (Hirst, 2013; Varghese *et al.*, 2015)

In this report, we presented three patients with mutations in the *NDUFV1* gene. The first patient is a compound heterozygous for a missense mutation c.640G>A (p.Glu214Lys) and a frameshift mutation c.1207dupG (p.Asp403Gly*fs), the second is homozygous for a missense mutation c.1268C>T (p.Thr423Met), and the third, combining the c.1268C>T (p.Thr423Met) and a likely pathogenic variant c.766C>T (p.Arg256Cys).

Methods

This work received the approval of the ethical standards committee of the Federal University of Paraná (CAAE: 84773818.2.0000.0102).

Total DNA was extracted from blood using the DNeasy Kit (Qiagen, Hilden, DE). Whole Exome Sequencing (WES) was carried out using Illumina® 2000 HiSeq with Agilent SureSelect Human All Exon V7 for the first two cases, and Nextera® Exome Capture to third, the GRCh37 reference genome and a GATK-based pipeline was used to call, filter and annotate variants (Van der Auwera *et al.*, 2013). After

Send correspondence to Vanessa Zanette. Universidade Federal do Paraná, Departamento de Genética, Laboratório de Polimorfismos e Ligação, Av. Cel. Francisco H. dos Santos 100, 81530-000, Curitiba, PR, Brazil. E-mail: vanessa.bioinfo@gmail.com.

ARTICLE OPEN ACCESS

Neurodevelopmental regression, severe generalized dystonia, and metabolic acidosis caused by *POLR3A* mutations

Vanessa Zanette, PhD, Aurelio Reyes, PhD, Mark Johnson, PhD, Daniel do Valle, MD, Alan J. Robinson, PhD, Vaneisse Monteiro, MD, Bruno Augusto Telles, MD, Ricardo L.R. Souza, PhD, Mara L.S.F. Santos, MD, Cristiane Benincá, PhD, and Massimo Zeviani, MD, PhD

Correspondence
Dr. Benincá
CBeninca@mednet.ucla.edu
or Dr. Zeviani
massimo.zeviani@unipd.it

Neurol Genet 2020;6:e521. doi:10.1212/NXG.0000000000000521

Abstract

Objective

To expand the clinical phenotype of *POLR3A* mutations by assessing the functional consequences of a missense and a splicing acceptor mutation.

Methods

We performed whole-exome sequencing for identification of likely pathogenic mutations in a 9-year-old female patient with severe generalized dystonia, metabolic acidosis, leukocytosis, hypotonia, and dysphagia. Brain MRI showed basal ganglia atrophy and presence of lactate and lipid peaks by [¹H]-magnetic resonance spectroscopy. Expression levels of Pol III target genes were measured by quantitative real-time (qRT)-PCR to study the pathogenicity of the biallelic mutations in patient fibroblasts.

Results

The patient is a compound heterozygous for a novel missense c.3721G>A (p.Val1241Met) and the splicing region c.1771-6C>G mutation in *POLR3A*, the gene coding for the catalytic subunit of RNA polymerase III (Pol III). Aberrant splicing was observed for the c.1771-6C>G mutation. Decreased RNA expression levels of Pol III targets (HNRNPH2, ubiquitin B, lactotransferrin, and HSP90AA1) were observed in patient fibroblasts with rescue to normal levels by overexpression of the wild-type protein but not by the p.Val1241Met variant.

Conclusions

Mutations in the *POLR3A* gene cause *POLR3A*-related hypomyelinating leukodystrophy with or without oligodontia or hypogonadotropic hypogonadism (HLD7, OMIM: 607694) and neonatal progeroid syndrome (OMIM: 264090), both with high phenotypic variability. We demonstrated the pathogenicity of c.1771-6C>G and c.3721G>A mutations causing an early-onset disorder. The phenotype of our patient expands the clinical presentation of *POLR3A*-related mutations and suggests a new classification that we propose designating as Neurodevelopmental Disorder with Regression, Abnormal Movements, and Increased Lactate.

From the Medical Research Council—Mitochondrial Biology Unit (A.R., M.J., A.J.R., C.B., M.Z.), University of Cambridge, United Kingdom; Department of Genetics (V.Z., R.L.R.S., C.B.), Federal University of Paraná—UFPR; and Neuropediatric Division (V.M., M.L.S.F.S., D.V., B.A.T.), Hospital Pequeno Príncipe, Curitiba, Brazil.

The Article Processing Charge was funded by Medical Research Council of UK.

Go to [Neurology.org/NG](https://www.neurology.org/NG) for full disclosures. Funding information is provided at the end of the article.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 4.0 (CC BY), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ANEXO 11- APRESENTAÇÃO DA LIVE “PESQUISAS BRASILEIRAS NA ÁREA DAS GLICOGENOSES HEPÁTICAS”, TRANSMITIDA PELO YOUTUBE DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE GLICOGENOSE



LIVE
YouTube
Acesse: www.youtube.com/abglico

ABGLICO
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA
DE GLICOGENOSE

15/8
Sábado às 17h

Dra. Bibiana Mello de Oliveira
Médica Geneticista

Dra. Bruna Bento
Nutricionista

Dra. Karina Colonetti
Biotecnologista

Dra. Vaneisse Monteiro
Nutricionista

“ Pesquisas brasileiras na área das glicogenoses hepáticas ”

APOIO

img Innovative Medicines Group
Pioneering the Treatment of Rare Diseases

ANEXO 12– APRESENTAÇÃO DA LIVE “FENIL NO COTIDIANO: ONDE BUSCAR INFORMAÇÕES”, TRANSMITIDA PELO YOUTUBE DA ASSOCIAÇÃO MÃES METABÓLICAS

LIVE 26/05/2020
TERÇA-FEIRA 19:30hs

MOM
mães metabólicas
ASSOCIAÇÃO

Bruna Bento dos Santos

Vaneisse Lima Monteiro

NUTRICIONISTAS E DOUTORANDAS EM
GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR PELA UFRGS

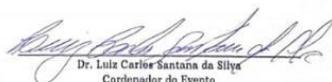
FENIL NO COTIDIANO
ONDE BUSCAR INFORMAÇÕES

ANEXO 13- PARTICIPAÇÃO COMO PALESTRANTE NO I CURSO DE MANEJO DIETÉTICO EM DOENÇAS GENÉTICAS METABÓLICAS

CERTIFICADO

I CURSO DE MANEJO DIETÉTICO
EM DOENÇAS GENÉTICAS
METABÓLICAS

Certificamos que Vaneisse Cristina Lima Monteiro ministrou a palestra intitulada "ATUAÇÃO DO NUTRICIONISTA NAS DOENÇAS DE DEPÓSITO LISSÔMICO: MUCOPOLISSACARIDOSES" no dia 13 de Dezembro de 2019 no I Curso de Manejo Dietético em Doenças Genéticas Metabólica realizado pelo Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo da Universidade Federal do Pará (LEIM/UFPA).



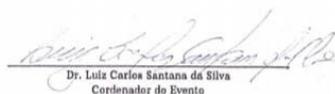
Dr. Luiz Carlos Santana da Silva
Cordenador do Evento



CERTIFICADO

I CURSO DE MANEJO DIETÉTICO
EM DOENÇAS GENÉTICAS
METABÓLICAS

Certificamos que Vaneisse Cristina Lima Monteiro ministrou a palestra intitulada "MANEJO DIETÉTICO EM PACIENTES COM AMINOACIDOPATIAS" no dia 13 de Dezembro de 2019 no I Curso de Manejo Dietético em Doenças Genéticas Metabólica realizado pelo Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo da Universidade Federal do Pará (LEIM/UFPA).



Dr. Luiz Carlos Santana da Silva
Cordenador do Evento



ANEXO 14- PARTICIPAÇÃO EM COMISSÃO ORGANIZADORA NA 5ª
CONFERÊNCIA INTERNACIONAL GSD (IGSD2019)

