

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA  
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA  
DIPARTIMENTO DI MEDICINA  
DIRETTORE: Prof. Roberto Vettor  
UOC MALATTIE DEL METABOLISMO  
RESPONSABILE: Prof. Angelo Avogaro

TESI DI LAUREA

MALATTIE METABOLICHE RARE: NUOVI MODELLI  
CELLULARI PER LO STUDIO DELLE COMPLICANZE  
D'ORGANO

RELATORE: Prof. Angelo Avogaro  
CORRELATORE: Dott. Nicola Vitturi

LAUREANDO: Federico Scannapieco

ANNO ACCADEMICO 2022-2023



# INDICE

<b>1. RIASSUNTO</b> .....	<b>5</b>
<b>2. ABSTRACT</b> .....	<b>7</b>
<b>3. INTRODUZIONE</b> .....	<b>9</b>
<b>3.1 MALATTIE METABOLICHE RARE</b> .....	<b>9</b>
<b>3.2 GLICOGENOSI TIPO 1a (GSD1a) (MALATTIA DI VON GIERKE)</b> .	<b>13</b>
3.2.1 Generalità.....	13
3.2.2 Metabolismo del glicogeno .....	14
3.2.2.1 Ruolo del glicogeno .....	14
3.2.2.2 Sintesi del Glicogeno .....	16
3.2.2.3 Glicogenolisi .....	16
3.2.3 Epidemiologia.....	17
3.2.4 Eziologia e fisiopatologia .....	17
3.2.5 Quadro clinico e profilo biochimico .....	20
3.2.6 Mutazioni e correlazioni genotipo/fenotipo .....	24
3.2.7 Diagnosi.....	25
3.2.7.2 Diagnosi differenziale .....	26
3.2.7.3 Diagnosi Prenatale .....	28
3.2.8 Gestione e trattamento .....	28
3.2.8.1 Trattamento dietetico.....	28
3.2.8.2 Integratori e farmaci.....	30
3.2.8.3 Terapia nelle emergenze.....	30
3.2.9 Outcome e follow-up.....	31
3.2.10 Prognosi .....	32
<b>3.3 AMBULATORIO DI MALATTIE METABOLICHE EREDITARIE PER L'ADULTO</b> .....	<b>33</b>
<b>3.4 MODELLI SPERIMENTALI DI MALATTIA</b> .....	<b>36</b>
3.4.1 Modelli utilizzati nella GSD1a .....	37

3.4.2 Anatomia delle cellule tubulari epiteliali renali.....	38
3.4.3 Fisiologia delle cellule tubulari epiteliali renali .....	39
3.4.4 Marcatori delle cellule tubulari epiteliali renali.....	39
<b>4. SCOPO DELLO STUDIO .....</b>	<b>41</b>
<b>5. MATERIALI E METODI .....</b>	<b>42</b>
5.1 PREPARAZIONE E COLTURA DELLE CELLULE EPITELIALI RENALI DERIVANTI DALLE URINE (URECs).....	42
5.2 ANALISI MORFOLOGICA DELLE URECs.....	43
5.3 IMMUNOFLUORESCENZA SULLE URECs.....	43
5.4 QUANTIFICAZIONE DEI ROS.....	43
5.5 ANALISI STATISTICA .....	44
5.6 APPROVAZIONE DELLO STUDIO.....	44
<b>6. RISULTATI .....</b>	<b>45</b>
6.1 CARATTERISTICHE DELLE URECs .....	45
6.2 ANALISI DEI ROS NELLE URECs DEI PAZIENTI CON GSD1a .....	50
<b>7. DISCUSSIONE.....</b>	<b>52</b>
<b>8. CONCLUSIONI .....</b>	<b>56</b>
<b>9. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>57</b>

## 1. RIASSUNTO

### Background

La glicogenosi tipo 1a, conosciuta anche come malattia di von Gierke, è una malattia metabolica ereditaria rara causata da una mutazione nel gene G6PC che provoca una deficienza dell'enzima glucosio-6-fosfatasi, essenziale per convertire il glicogeno in glucosio nel fegato. Il risultante accumulo di glicogeno nei tessuti porta a una serie di conseguenze, come epatomegalia, ipoglicemia, ritardo della crescita, acidosi lattica e nefropatia. Per quanto riguarda quest'ultima, i pazienti manifestano una malattia simile alla nefropatia diabetica che può evolvere in insufficienza renale. La maggior parte dei pazienti di età superiore ai 25 anni presentano microalbuminuria e oltre il 50% proteinuria.

Nei modelli animali con delezione specifica per il rene di G6Pase, è stata osservata una nefropatia ad insorgenza precoce con un incremento dei livelli di stress ossidativo dovuto all'attivazione dei sistemi dell'angiotensina II e del TGF- $\beta$ 1.

Per quanto riguarda le metodiche basate sull'uso di colture cellulari primarie umane, in letteratura è stato descritto l'utilizzo di colture di cellule epiteliali renali URECs umane per lo studio dell'interessamento renale in alcune patologie, come ad esempio le malattie renali cistiche ereditarie, l'aciduria propionica, l'aciduria metilmalonica e la malattia di Fabry.

Al contrario ad oggi, non risulta che tale metodica sia stata ancora utilizzata per lo studio dell'interessamento renale nella GSD1a, che rappresenta l'oggetto della presente tesi.

### Scopo dello Studio

Scopo dello studio è mettere a punto una metodica basata sulla coltura in vitro di cellule epiteliali derivate dall'urina (URECs) di pazienti con GSD1a, per valutare se conservano le loro caratteristiche biologiche e possono essere utilizzate come modello per lo studio dei fenotipi renali e metabolici di questa condizione genetica.

## **Materiali e Metodi**

Gli studi sono stati condotti su cellule estratte da campioni di urina di tre soggetti con GSD1a e tre soggetti sani e coltivate in vitro. Le URECs sono state caratterizzate dopo il quarto passaggio tramite microscopia elettronica a trasmissione e immunofluorescenza. E' stata inoltre misurata con immunofluorescenza la produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), a diverse concentrazioni di glucosio.

## **Risultati**

Al quarto passaggio, le URECs provenienti dai pazienti affetti da GSD1a continuavano a presentare un massivo accumulo di glicogeno. Sia le cellule GSD1a sia quelle di controllo presentavano le tipiche strutture ciliate dell'epitelio tubulare renale, nonché l'espressione di marcatori specifici delle cellule epiteliali, come l'E-caderina, e delle cellule tubulari renali, come l'acquaporina 1 e 2. Le URECs di entrambi i gruppi adattavano i loro livelli di ROS in risposta alle variazioni delle concentrazioni di glucosio: in particolare, le cellule GSD1a erano caratterizzate da una risposta maggiore rispetto alle cellule ottenute dai controlli a tutte le concentrazioni di glucosio, in particolare in presenza di basse concentrazioni. Questa situazione riproduce fedelmente in vitro il disordine metabolico tipico dei pazienti con GSD1a.

## **Conclusioni**

Questo studio rappresenta la prima dimostrazione che le URECs, ottenute da pazienti con GSD1a e coltivate in vitro, mantengono le proprie caratteristiche morfologiche e funzionali e potrebbero rappresentare un modello sperimentale promettente per studiare le complicanze renali della GSD1a e in particolare i meccanismi molecolari che portano al danno renale.

## **2. ABSTRACT**

### **Background**

The type 1a glycogen storage disease, also known as von Gierke's disease, is a rare inherited metabolic disorder caused by a mutation in the G6PC gene which leads to a deficiency in the enzyme glucose-6-phosphatase, vital for converting glycogen to glucose in the liver. The resulting accumulation of glycogen in tissues results in various consequences, such as hepatomegaly, hypoglycemia, growth delay, lactic acidosis, and nephropathy. As for the latter, patients display a condition similar to diabetic nephropathy that can progress to renal failure. Most patients over the age of 25 present microalbuminuria and more than 50% have proteinuria. In animal models with a kidney-specific deletion of G6Pase, early-onset nephropathy has been observed with an increase in oxidative stress levels due to the activation of angiotensin II and TGF- $\beta$ 1 systems. Regarding methodologies based on the use of primary human cell cultures, literature has described the use of human URECs renal epithelial cell cultures for studying renal involvement in some conditions, such as inherited cystic kidney diseases, propionic aciduria, methylmalonic aciduria, and Fabry's disease. Conversely, to date, it seems that this methodology has not yet been used for the study of renal involvement in GSD1a, which is the subject of this thesis.

### **Aim of the study**

The aim of the study is to develop a methodology based on the *in vitro* culture of epithelial cells derived from the urine (URECs) of patients with GSD1a, to assess whether they retain their biological characteristics and can be used as a model for studying the renal and metabolic phenotypes of this genetic condition.

### **Materials and Methods**

The studies were conducted on cells extracted from urine samples of three individuals with GSD1a and three healthy subjects, and cultured *in vitro*. The

URECs were characterized after the fourth passage using transmission electron microscopy and immunofluorescence. Additionally, the production of reactive oxygen species (ROS) was measured using immunofluorescence at various glucose concentrations

## **Results**

By the fourth passage, the URECs from patients with GSD1a continued to exhibit substantial glycogen accumulation. Both the GSD1a and control cells displayed the characteristic ciliary structures of the renal tubular epithelium, as well as the expression of specific markers for epithelial cells, such as E-cadherin, and renal tubular cells, like aquaporin 1 and 2. URECs from both groups adjusted their ROS levels in response to changes in glucose concentrations: notably, the GSD1a cells exhibited a heightened response compared to control cells across all glucose concentrations, particularly in the presence of low levels. This in vitro situation accurately replicates the metabolic disorder typically seen in patients with GSD1a.

## **Conclusions**

This study represents the first demonstration that URECs, obtained from patients with GSD1a and cultured in vitro, retain their morphological and functional characteristics and could serve as a promising experimental model to study the renal complications of GSD1a, and specifically the molecular mechanisms leading to kidney damage



## 3. INTRODUZIONE

### 3.1 MALATTIE METABOLICHE RARE

Le malattie metaboliche rare, dovute ad errori ereditari del metabolismo (IEM), prese singolarmente, sono rare, ma nell'insieme sono numerose. L'applicazione della spettrometria di massa tandem (MS tandem) allo screening neonatale e alla diagnosi prenatale consente la diagnosi presintomatica, alla nascita, di alcuni di questi IEM. Tuttavia, per la maggior parte degli IEM, i test di screening neonatale sono troppo lenti, costosi o inaffidabili e, di conseguenza, entra in gioco un metodo di screening clinico semplice, utilizzato prima di avviare le indagini biochimiche o molecolari avanzate. La diagnosi clinica di IEM si basa sui seguenti presupposti:

- Considerare che, poiché la maggior parte degli IEM presenta un'eredità recessiva (alcuni hanno un'eredità dominante, legata all'X o materna), la maggior parte dei casi individuali può apparire in maniera sporadica.
- Ricordare che gli IEM possono presentarsi a qualsiasi età, dalla vita fetale alla vecchiaia.
- Considerare gli IEM in parallelo ad altre condizioni più comuni.
- Essere consapevoli che i sintomi che persistono e rimangono inesplicati dopo adeguate indagini e trattamento iniziale per i disturbi più comuni, possono essere dovuti a un IEM.
- Sospettare che qualsiasi morte neonatale possa essere dovuta a un IEM, in particolare quelle attribuite a una sepsi, e andare ad esaminare attentamente i risultati dell'autopsia. Inoltre, la sepsi può scatenare uno scompenso acuto in pazienti con IEM sottostante.
- Non confondere un sintomo o una sindrome con l'eziologia vera e propria: la causa sottostante potrebbe essere un IEM ancora da definire.
- In corso di emergenza, considerare per primi gli IEM più suscettibili al trattamento.
- Rivolgersi a centri specializzati.

Fino a poco tempo fa gli IEM erano considerati una specialità pediatrica, in quanto si pensava che iniziassero a manifestarsi esclusivamente durante il periodo neonatale o comunque nell'infanzia; inoltre, le forme più gravi non consentivano il raggiungimento dell'età adulta. Nella realtà dei fatti, escluse le forme neonatali gravi, la maggior parte degli IEM possono presentarsi in forme lievi, con i primi segni clinici che iniziano nel periodo dell'adolescenza o addirittura molto tardi nell'età adulta. Il concetto di "IEM a esordio adulto" ha raggiunto solo di recente la comunità medica che si occupa dell'età adulta. Poiché queste forme a esordio tardivo sono spesso misconosciute, la loro esatta prevalenza è sconosciuta.

Il metabolismo coinvolge migliaia di proteine, per lo più enzimi, recettori e trasportatori, i cui deficit causano IEM che possono interessare molecole piccole o complesse. Indipendentemente dalle loro dimensioni, i metaboliti coinvolti negli IEM possono comportarsi come molecole di segnalazione, componenti strutturali e "combustibili", e molti di questi hanno più di un ruolo. Secondo Morava et al. [1], la classificazione di un disturbo come IEM richiede solo che "la compromissione di specifici enzimi o vie biochimiche sia intrinseca al patomeccanismo".

Tipicamente, la compromissione di uno specifico enzima porta ad accumulo del metabolita a monte, che ad elevate concentrazioni può avere effetti negativi, e a carenza del metabolita a valle [figura 1].

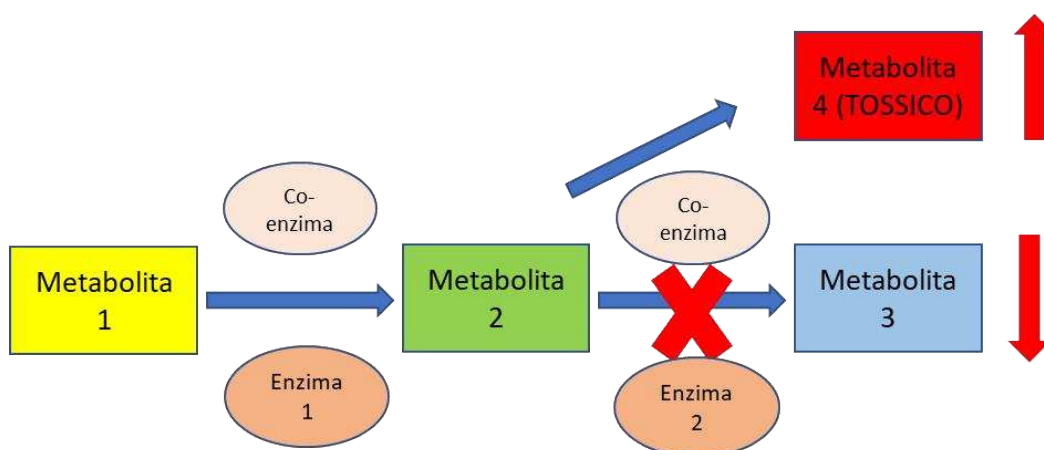


Figura 1. Schema del meccanismo alla base delle malattie metaboliche ereditarie

Il DNA testing (test basati sull'analisi del DNA) ha recentemente rivoluzionato l'approccio diagnostico delle IEM [2]. Utilizzando questa definizione estesa e questo nuovo approccio diagnostico, la più recente classificazione internazionale degli IEM comprende attualmente più di 1.400 disordini, suddivisi in 23 gruppi [3]. Tuttavia, da un punto di vista clinico, tutte le IEM possono essere poste in una classificazione semplificata che unisce elementi di diagnostica clinica e un approccio fisiopatologico, basata su tre grandi gruppi [4].

Primo gruppo -> Disordini delle piccole molecole (small molecules)

Quasi tutti questi IEM sono caratterizzati dalla presenza di marker metabolici nel plasma e nelle urine (piccole molecole diffusibili e idrosolubili) che possono essere facilmente e rapidamente misurati in emergenza tramite cromatografia (aminoacidi, acidi organici, acilcarnitine, ecc.), o utilizzando metodi più specifici (metalli o metaboliti del galattosio).

Esistono due sottocategorie di disordini da small molecules, definite a seconda che il fenotipo derivi principalmente da un accumulo acuto o progressivo di composti tossici a monte del blocco metabolico o da una carenza in cui i sintomi sono principalmente dovuti alla sintesi difettosa di composti a valle del blocco o al trasporto difettoso di una molecola essenziale attraverso le membrane. Il sottogruppo "carenza" condivide molte caratteristiche con i difetti del gruppo 2 dei disordini delle molecole complesse.

Secondo gruppo -> Disordini delle molecole complesse

Questo gruppo comprende le malattie che colpiscono il metabolismo di molecole complesse, che non sono né solubili in acqua né diffusibili. Le principali categorie chimiche di tali molecole complesse sono il glicogeno, gli sfingolipidi (SPL), i trigliceridi (TG), i fosfolipidi (PL), gli acidi grassi complessi a catena lunga (LCFA), il colesterolo e gli acidi biliari, i glicosaminoglicani (GAG), gli oligosaccaridi (OLS), le glicoproteine, i glicolipidi e gli acidi nucleici. Questi complessi processi metabolici di sintesi e riciclo avvengono all'interno dei vari organelli (mitocondri, lisosomi, perossisomi, reticolo endoplasmatico e apparato di Golgi) e la maggior parte delle vie coinvolge più organelli e richiede dei trasportatori.

Appartengono a questa categoria anche i disordini congeniti della glicosilazione (CDG) e i disordini del traffico, dell'elaborazione e del controllo della qualità. I sintomi clinici sono permanenti, molto spesso progressivi, indipendenti da eventi intercorrenti e non correlati all'assunzione di cibo. La maggior parte di questi disturbi non si presenta con crisi acute.

Come per i disordini delle small molecules, anche nei disturbi da molecole complesse esistono due sottocategorie, definite a seconda che il fenotipo derivi principalmente da un accumulo o da una carenza.

Terzo gruppo -> disturbi che coinvolgono il metabolismo energetico

Si tratta di IEM con sintomi dovuti, almeno in parte, a un deficit della produzione o nell'utilizzo di energia all'interno di fegato, miocardio, muscolo, cervello e altri tessuti. I sintomi più comuni includono ipoglicemia, acidosi lattica, epatomegalia, grave ipotonia generalizzata, miopatia, cardiopatia, mancato sviluppo, insufficienza cardiaca, collasso circolatorio, morte improvvisa e inaspettata nell'infanzia e coinvolgimento cerebrale. Questi disturbi presentano uno spettro clinico sovrapponibile e le manifestazioni derivano talvolta dall'accumulo di composti tossici e da un deficit nella produzione di energia o da segnalazioni anomale.

I disturbi del gruppo 3 possono essere suddivisi in ulteriori 3 sottocategorie: difetti dei trasportatori di molecole energetiche, citoplasmatici e mitocondriali. La diagnosi risulta difficile e si basa su test funzionali, analisi enzimatiche che richiedono biopsie o colture cellulari, e sempre più spesso su analisi molecolari. Le malattie mitocondriali sono il gruppo più comune di IEM e sono tra le forme più comuni di disturbi neurologici ereditari.

## 3.2 GLICOGENOSI TIPO 1a (GSD1a) (MALATTIA DI VON GIERKE)

### 3.2.1 Generalità

Le glicogenosi sono un insieme di patologie ereditarie caratterizzate da un difetto di funzione di uno degli enzimi implicati nel metabolismo del glicogeno, che causa un anomalo accumulo del glicogeno non utilizzato in tessuti diversi.

A seconda di quale proteina è alterata, si hanno vari tipi di glicogenosi. Sono contraddistinte da un numero romano o dal nome di chi le ha descritte.

Classificazione delle glicogenosi:

Numero	Enzima carente	Gene	Eponimo
0a	Glicogeno sintasi epatica	GYS2	
0b	Glicogeno sintasi muscolare	GYS1	
Ia	Glucosio-6-fosfatasi- $\alpha$	GSPC1	von Gierke
Ib	Glucosio-6-fosfatasi traslocasi	SLC37A4	
II	$\alpha$ -1,4-glicosidasi acida	GAA	Pompe
III	Enzima deramificante il glicogeno	AGL	Cori
IV	Enzima ramificante il glicogeno	GBE1	Andersen
V	Fosforilasi muscolare	PYGM	McArdle
VI	Fosforilasi epatica	PYGL	Hers
VII	Fosfofruttochinasi muscolare	PFKM	Tarui
IXa	Fosforilasi chinasi (diverse subunità)	PHKA2	
IXb		PHKB	
IXc		PHKG2	
IXd		PHKA1	
X	Fosfoglicerato mutasi muscolare	PGAM2	
XI	Glucotrasportatore 2	SLC2A2	Fanconi-Bickel
XII	Aldolasi A	ALDOA	
XIII	$\beta$ -enolasi	ENO3	
XIV	Fosfoglucomutasi	PGM1	
XV	Carenza di glicogenina nel muscolo (enzima sconosciuto)	GYG1	

Tabella I. Classificazione delle glicogenosi

Le glicogenosi di tipo 1 (GSD1) sono causate da un difetto del sistema dell'enzima glucosio-6-fosfatasi (G6Pase), che ha un ruolo chiave nell'omeostasi del glucosio, in quanto necessario per l'idrolisi del glucosio-6-fosfato (G6P) in glucosio e fosfato inorganico (Pi).

Vengono riconosciuti due principali sottotipi di glicogenosi tipo 1:

- la GSD tipo 1a (GSD1a) causata da un difetto nell'unità catalitica G6Pase-alfa (o G6PC);
- la GSD tipo 1b (GSD1b) causata da un difetto nel traslocatore del glucosio-6-fosfato (o G6PT).

L'esistenza di altri tipi di glicogenosi tipo 1 (tipo 1c e tipo 1d) non è stata ancora confermata.

### **3.2.2 Metabolismo del glicogeno**

#### **3.2.2.1 Ruolo del glicogeno**

Il glucosio è una molecola fondamentale per la produzione di energia ed è indispensabile per il funzionamento di diversi tessuti, in particolare per il sistema nervoso centrale. Vista l'importanza dell'omeostasi del glucosio nel prevenire la carenza energetica cerebrale, l'evoluzione ha garantito che i meccanismi per il mantenimento di una concentrazione adeguata di glucosio nel sangue siano finemente regolati. Nella fase immediatamente successiva al pasto, i carboidrati assorbiti dall'intestino vengono scomposti e rilasciati in circolazione. Successivamente, i sensori del glucosio presenti nelle cellule beta del pancreas innescano il rilascio di insulina in risposta all'aumento della glicemia. L'insulina, a sua volta, aumenta l'assorbimento di glucosio da parte delle cellule (in particolare cellule muscolari), dove può essere catabolizzato attraverso il metabolismo aerobico e anaerobico per produrre ATP (*Figura 2*) o essere immagazzinato sotto forma di glicogeno principalmente nel fegato, ma anche nel muscolo. Il glicogeno è un polisaccaride costituito da catene rettilinee di molecole di glucosio con numerosi punti di ramificazione e un peso molecolare compreso tra 1 e 20 milioni grammi/mole. Al centro di ogni macromolecola di glicogeno si trova una proteina nota come glicogenina. La glicogenina 1 è espressa ubiquitariamente, mentre la

glicogenina 2 è espressa principalmente a livello del fegato. La glicogenina 1 funziona da primer per la sintesi di una molecola di glicogeno ex novo mentre il ruolo della glicogenina 2 non è chiaro, poiché una delezione relativamente comune sul cromosoma X che include il suo gene GYG2 sembra non causare alcun fenotipo peculiare [5]. Dopo un pasto, il glicogeno può rappresentare fino al 8% del peso del fegato mentre nel muscolo rappresenta approssimativamente il 2% del peso. Quantità molto più piccole sono presenti anche nei reni, nelle cellule gliali del sistema nervoso e nei leucociti. Solo il glicogeno del fegato è disponibile per il rilascio di glucosio nella circolazione mentre nel muscolo viene utilizzato esclusivamente come fonte di energia.

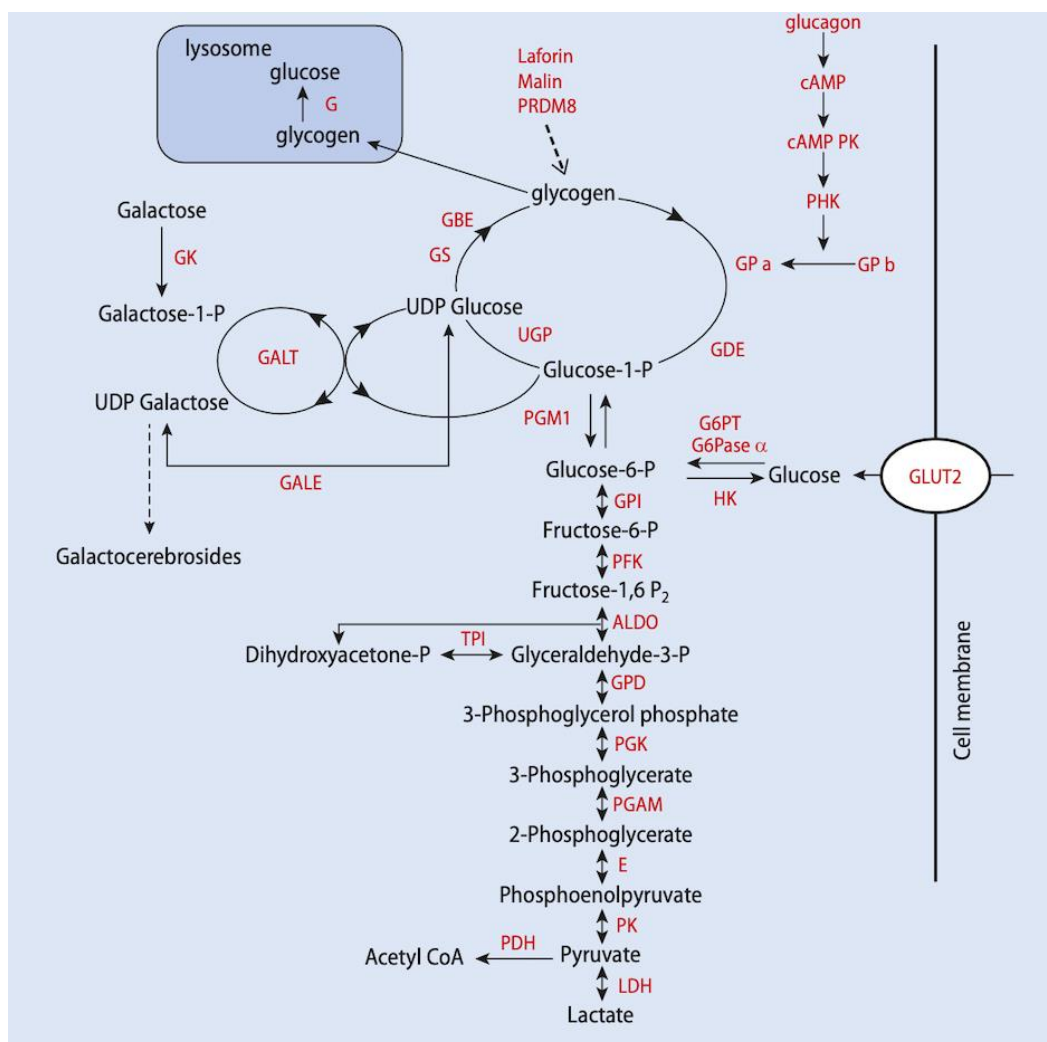


Figura 2. Metabolismo del glicogeno, glucosio e galattosio [6].

ALDO: aldolasi A, PK cAMP: proteina chinasi ciclica AMP, E: enolasi, G:  $\alpha$ -1,4-glicosidasi lisosomiale, G6Pase- $\alpha$ : glucosio 6-fosfatasi- $\alpha$ , G6PT: trasportatore del

*glucosio-6-fosfato, GALE: galattosio epimerasi, GALT: galattosio 1-fosfato uridil transferasi, GBE: ramificatore del glicogeno, GDE: debranching del glicogeno, GK: galattochinasi, GLUT2: famiglia di trasportatori di soluti 2, GP: glicogeno fosforilasi, GPD: gliceraldeide fosfato deidrogenasi, GPI: isomerasi del glucosio fosfato, GS: glicogeno sintasi, LDH: lattato deidrogenasi, PDH: piruvato deidrogenasi, PFK: fosfofruttochinasi muscolare, PGK: fosfoglicerato chinasi, PGAM: fosfoglicerato mutasi, PGM1: fosfoglucomutasi, PHK: chinasi fosforilasi, PK: piruvato chinasi, TPI: trisiofosfato isomerasi, UGP: pirifosforilasi del UDP-glucosio/galattosio.*

### **3.2.2.2 Sintesi del Glicogeno**

La sintesi del glicogeno è un processo che richiede energia. Il primo passo coinvolge l'autoglicosilazione della glicogenina il che catalizza il trasferimento del glucosio dell'UDP-G a un residuo di serina o tirosina con un legame 1,4. L'ulteriore allungamento della catena richiede l'intervento dell'enzima glicogeno sintasi per il legame alfa 1,4 e dell'enzima glicosil (1->6)-transferasi per i punti di ramificazione alfa 1,6. La macromolecola finale, che può essere composta da fino a 30.000 molecole di glucosio, forma una particella  $\beta$  che può essere collegata insieme ad altre particelle  $\beta$  per formare particelle  $\alpha$  di dimensioni maggiori, che appaiono come granuli nel citoplasma.

### **3.2.2.3 Glicogenolisi**

Nello stato post-assorbimento, con concentrazioni decrescenti di glucosio, si osserva una diminuzione del rapporto insulina/glucagone, l'attivazione dell'adenilato ciclasi e un aumento del cAMP. I cambiamenti iniziali del cAMP provocano un effetto a cascata che stimola la glicogenolisi. L'amplificazione di questo processo stimolatorio mediante diversi enzimi (protein-chinasi dipendente dal cAMP, chinasi della glicogeno-fosforilasi e glicogeno -fosforilasi) consente il rilascio rapido di grandi quantità di glucosio dal glicogeno epatico. Oltre al glucagone, anche gli ormoni "da stress" (adrenalina, cortisolo e ormone della

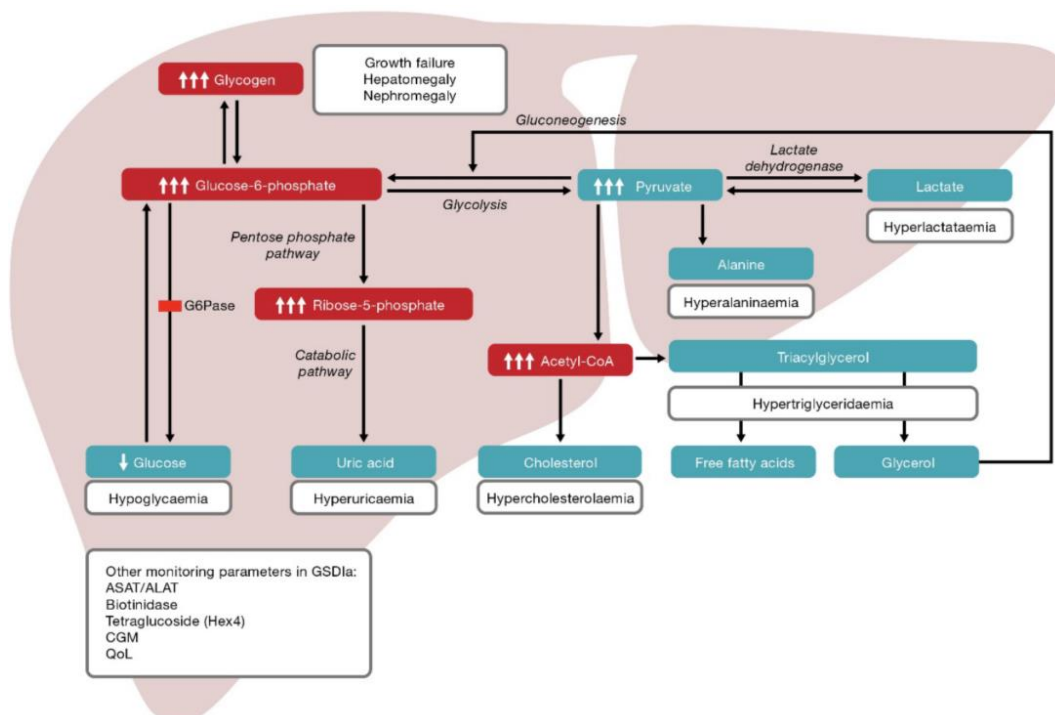


crescita) inibiscono la glicogenesi e stimolano la glicogenolisi. L'effetto dell'ormone della crescita sulla glicogenolisi è limitato al muscolo. La tiroxina non ha un effetto diretto sul metabolismo del glicogeno, ma aumenta l'attività simpatica.

### 3.2.3 Epidemiologia

Si stima che la GSD1 abbia un'incidenza annuale di circa 1 su 100.000 nascite, rappresentando approssimativamente il 30% delle GSD epatiche, con la GSD1a come tipo più frequente (circa l'80% dei pazienti sono affetti da GSD1) [7]. La GSD1a è particolarmente comune nella popolazione ebraica ashkenazita, nella quale la frequenza dei portatori dell'allele p.R83C è stata trovata essere del 1,4%, con una prevalenza cinque volte più alta rispetto alla popolazione caucasica generale. [8]

### 3.2.4 Eziologia e fisiopatologia



- *Figura 3 [9]. Conseguenze del difetto dell'enzima G6Pase. Acetyl-CoA—acetil-coenzima A; ASAT—aspartato transaminasi; ALAT—alanina transaminasi; CGM—monitoraggio continuo della glicemia; G6Pase—glucosio-6-fosfatasi; QoL—qualità della vita*

La GSD1a è causata da un difetto nell'unità catalitica G6Pase-alfa (o G6PC). Questo difetto porta ad una serie di conseguenze (*figura 3*):

- Ipoglicemia a digiuno: è causata dal blocco dell'ultimo passaggio della glicogenolisi e della gluconeogenesi. Si è visto, tuttavia, che alcuni pazienti con GSD1b presentano una tolleranza insolita al digiuno [10].
- Iperlattacidemia e accumulo di glicogeno: sono dovuti all'eccesso di G6P che non può essere metabolizzato in glucosio. Galattosio, fruttosio e glicerolo non riescono a correggere l'ipoglicemia e contribuiranno all'iperlattacidemia.
- Iperlipidemia: è il risultato sia di una maggiore sintesi derivante dall'eccesso di acetil-coenzima A e conseguente eccesso di malonil-coenzima A (primo passaggio della sintesi degli acidi grassi), sia di una diminuita clearance lipidica sierica, anche se i meccanismi sia dell'iperlipidemia che della steatosi epatica non sono ancora completamente compresi [11]. L'accumulo di lipidi nel fegato contribuisce significativamente all'epatomegalia. Un aumento di malonil-coenzima A inibisce la carnitina palmitoiltransferasi I, riducendo la produzione di chetoni e aumentando l'acidosi dicarbossilica.
- Iperuricemia [7, 12]: è causata sia da una ridotta clearance renale (il lattato compete con l'acido urico), sia da un aumento della sintesi (la ridotta concentrazione di fosfato intraepatico stimola la via di degradazione dei nucleotidi adeninici).
- Adenomi epatici: i meccanismi alla base dello sviluppo degli adenomi epatici non sono ancora completamente chiariti. Tuttavia, Zucman Rossi et al [13] hanno proposto una nuova classificazione degli adenomi epatici e una migliore comprensione della loro relazione con il carcinoma epatocellulare. Uno studio recente ha riportato la presenza di alterazioni cromosomiche e genetiche negli adenomi epatici associati alla GSD1a: guadagno simultaneo del 6p e perdita del 6q, associazione di adenomi più grandi con aberrazioni del cromosoma 6, ridotta espressione di IGF2R e

LATS1 (geni candidati a soppressori tumorali) nel 6q in oltre il 50% degli adenomi epatici associati alla GSD1a [14]. L'attivazione della beta-catenina è stata segnalata come un importante fattore di rischio per la degenerazione maligna [13]. Fino ad oggi, la presenza di beta-catenina attivata è stata segnalata in 3 adenomi epatici associati alla GSD1a, di cui uno associato a un carcinoma. Anche il controllo metabolico è stato discusso come meccanismo coinvolto nella formazione degli adenomi. In uno studio retrospettivo caso-controllo non sono state riscontrate differenze significative nell'equilibrio metabolico tra i pazienti affetti da GSD1 che sviluppavano adenomi e quelli che non li sviluppavano [15]. Un altro meccanismo potrebbe coinvolgere le citochine nel siero.

Kim et al [16] hanno, inoltre, riportato che i topi affetti da GSD1a presentano un aumento persistente del conteggio dei neutrofilii nel sangue periferico insieme a livelli elevati di fattore di stimolazione delle colonie di granulociti (G-CSF) e di chemotattico dei neutrofilii indotto da citochine. Gli autori suggeriscono che vi sia una progressiva bassa sfida immunitaria dato che nei pazienti affetti da GSD1 si osserva un danno a lungo termine al fegato nonostante i controlli dietetici [16].

- Aumento dei ROS: I radicali liberi dell'ossigeno sono generati come prodotto collaterale del metabolismo cellulare, ma in condizioni normali, il nostro corpo dispone di meccanismi antiossidanti che neutralizzano e limitano i loro effetti dannosi.

Tuttavia, quando c'è uno squilibrio tra la produzione di radicali liberi e la capacità del corpo di neutralizzarli, si instaura una condizione di stress ossidativo. Questa situazione può portare a danni cellulari e tissutali significativi e ha un ruolo cruciale in molte malattie croniche e degenerative.

Nel contesto della nefropatia associata alla GSD1a, lo stress ossidativo emerge come un fattore critico. A seguito dell'accumulo di glicogeno, tipico della malattia, si ritiene che vi sia una maggiore produzione di radicali liberi e, in definitiva, un aumento dello stress ossidativo.

Lo studio di Yiu et al. nel 2010 [17] ha apportato un significativo contributo alla comprensione di questo fenomeno, evidenziando il legame tra lo stress ossidativo e la progressione della nefropatia nella GSD1a in modelli animali (topo). Questo legame suggerisce che, se lo stress ossidativo potesse essere gestito o ridotto, ci potrebbero essere vie terapeutiche per mitigare o ritardare la nefropatia associata alla GSD1a.

### 3.2.5 Quadro clinico e profilo biochimico

#### Quadro clinico

“Doll Face”

Epatomegalia

Bassa statura

#### Profilo biochimico

Ipoglicemia

Acidosi lattica

Iperlipidemia

Iperuricemia

#### Terapia

Dietetica



- Osteoporosi
- Gotta
- Ritardo puberale
- Proeinuria
- Calcolosi renale
- Ipertensione arteriosa
- Ipertensione polmonare
- Pancreatite
- Danni neurocognitivi
- Anemia
- Ovaio policistico
- Diatesi emorragica

Figura 4. Quadro clinico della glicogenosi tipo 1a

I pazienti affetti da GSD1a possono manifestare diversi sintomi e caratteristiche cliniche (figura 4). Di seguito sono riportate le principali:

- Ipoglicemia indotta dal digiuno: i pazienti affetti da GSD1 hanno una capacità limitata di tollerare il digiuno. Possono sperimentare episodi di ipoglicemia che si verificano rapidamente, di solito circa 2-2,5 ore dopo un pasto. L'ipoglicemia, che può causare convulsioni, e l'acidosi lattica contribuiscono alla gravità iniziale della malattia. In alcuni casi, l'ipoglicemia può essere meno sintomatica poiché il lattato può essere utilizzato come fonte di energia per il cervello. Il quadro cronico porta ad una scarsa «awareness» dell'ipoglicemia, scarsamente avvertita anche per valori inferiori a 40 mg/dl.

- Iperlattacidemia nel periodo neonatale: nel neonato, si possono osservare livelli elevati di acido lattico nel sangue e portare ad acidosi lattica.
- Interessamento epatico:
  1. Epatomegalia: uno dei primi sintomi più comuni è l'addome sporgente causato da un ingrossamento significativo del fegato intorno ai 3 mesi di età. In alcuni casi, il fegato può risultare già ingrandito alla nascita. Le dimensioni del fegato aumentano gradualmente e il suo margine inferiore può scendere al di sotto della linea ombelicale. L'epatomegalia potrebbe non essere facilmente rilevata durante l'esame fisico poiché il fegato risulta molle al tatto.
  2. Adenomi epatici: gli adenomi epatici di solito non causano sintomi e raramente vengono rilevati durante l'esame obiettivo, tranne in casi molto rari in cui possono essere presenti adenomi superficiali che rendono la superficie del fegato irregolare [18,19]. Di solito vengono diagnosticati tra la seconda e la terza decade di vita, la loro frequenza varia dal 16% al 75% ed è uguale in entrambi i sessi [20]. L'ecografia epatica, la tomografia computerizzata (TC) o la risonanza magnetica (RM) ne consentono la diagnosi e il successivo follow-up. Durante i primi dieci anni, l'ecografia epatica dovrebbe essere eseguita una volta all'anno. Dall'età di 10 anni, potrebbe essere proposta la RM epatica ogni anno. Specifici modelli di RM, legati alla ripartizione diffusa del grasso e alla dilatazione dei sinusoidi, sono stati associati rispettivamente agli adenomi con mutazione HNF-1a e agli adenomi infiammatori [21]. Inoltre, la risonanza magnetica con shift chimico si è rivelata utile nel discriminare l'aumento dell'ecogenicità epatica nelle glicogenosi [22] e anche per quanto riguarda la quantificazione della steatosi epatica. Se vengono rilevate lesioni epatiche, il follow-up deve essere intensificato e la RM epatica dovrebbe essere proposta ogni 6 mesi, talvolta associata ad esami ecografici se la RM è più difficile da organizzare. La TC può essere utile qualora sia prevista una resezione chirurgica degli adenomi.

- Complicanze renali: i pazienti affetti da GSD1a accumulano glicogeno non solo nel fegato, ma anche nei reni e presentano una patologia simile alla nefropatia diabetica, che può progredire fino all'insufficienza renale [23]. Inizialmente, il problema si manifesta attraverso una iperfiltrazione glomerulare che successivamente evolve in microalbuminuria. Con l'avanzare della condizione, si passa dalla microalbuminuria alla proteinuria: se non correttamente gestita, può portare all'insufficienza renale [20]. Istologicamente è stata osservata glomerulosclerosi focale segmentaria e fibrosi interstiziale. La maggior parte dei pazienti di età superiore ai 25 anni presentano microalbuminuria e oltre il 50% proteinuria [24].

Nei modelli animali con delezione specifica per il rene di G6Pase, è stata osservata una nefropatia ad insorgenza precoce [25] con un incremento dei livelli di stress ossidativo dovuto all'attivazione dei sistemi dell'angiotensina II e del TGF- $\beta$ 1 [17].

le complicanze a livello renale rappresentano un'area di grande attenzione nel campo della glicogenosi tipo 1a e sono caratterizzate da un'evoluzione progressiva.

In alcuni pazienti si può osservare un aumento delle dimensioni dei reni all'ecografia.

Un'altra potenziale complicanza è rappresentata dall'ipercalciuria, spesso dovuta a una disfunzione del tubulo distale renale. Questo squilibrio, se non trattato, può favorire la formazione di calcoli renali e/o nefrocalcinosi. Diversi studi, come quelli di Weinstein et al. nel 2001[26] e Scales et al. nel 2010 [27], hanno evidenziato come anche l'ipocitraturia possa essere un fattore di rischio per la nefrocalcinosi. Anche lo stress ossidativo è stato evidenziato in modelli animali (topo) come un meccanismo chiave alla base della nefropatia associata alla GSD1a [17].

Infine, è di vitale importanza che, una volta rilevata e confermata la presenza di microalbuminuria, si inizi subito un trattamento specifico. Secondo gli studi di Melis et al. nel 2005 [28].

- Ipertrigliceridemia: l'ipertrigliceridemia grave sembra aumentare il rischio di pancreatite [29], mentre il rischio di aterosclerosi e di complicanze cardiovascolari precoci non sembra essere rilevante [20,30,31,32,33]. Tuttavia, è presente uno studio fatto su 28 pazienti affetti da GSD1 (età media 23 anni) che ha riportato una disfunzione arteriosa caratterizzata dall'aumento dello spessore medio-intimale carotideo e da un maggiore livello pressorio misurato mediante tonometria dell'arteria radiale [34].
- Iperuricemia [35]: può portare alla gotta e contribuisce, insieme all'ipocitraturia, alla formazione di calcoli, nefrocalinosi e insufficienza renale [20].
- Caratteristiche fisiche: i pazienti possono presentare un volto paffuto e rotondo, spesso descritto come "doll-like", e un addome sporgente che evidenzia arti sottili.
- Aspetti ematologici:
  1. La piastrinopenia può essere legata alla dislipidemia, e porta ad una tendenza alle ecchimosi e alle emorragie.
  2. Anemia: L'anemia è spesso presente ed è a genesi multifattoriale: insufficienza renale, deficit nutrizionali, sanguinamento da adenomi epatici, ecc.
  3. Neutropenia: la neutropenia cronica o intermittente e la disfunzione dei neutrofili è tipica della forma di glicogenosi tipo 1b.
- Aspetti endocrinologici:
  1. La bassa statura è tipica di questi pazienti
  2. Altre problematiche endocrinologiche sono il ritardo della crescita e la pubertà ritardata [20,36] che possono essere migliorati da un buon controllo metabolico [37]; le irregolarità del ciclo mestruale, la policistosi ovarica; un'aumentata prevalenza di ipotiroidismo (GSD1a e GSD1b) e tiroiditi autoimmuni (GSD1b). [38].
  3. È frequente l'ipovitaminosi D (insufficienza renale, deficit nutrizionali) e l'osteoporosi (metà dei pazienti adulti; legata in parte alle restrizioni di lattosio e galattosio con la dieta) [39], potrebbe essere correlata alla

debolezza muscolare [40]. Anche l'acidosi cronica e l'ipertrigliceridemia giocano un ruolo importante nello sviluppo dell'osteopenia.

4. Non sono descritti deficit di fertilità

- Diarrea intermittente: alcuni pazienti possono sperimentare episodi di diarrea.
- Ipertensione polmonare: è una complicanza molto rara, a prognosi infausta [18,41,42]. La sua fisiopatologia non è ben nota; si sospetta un'anomalia nel metabolismo della serotonina nelle piastrine [42].

Le complicanze a lungo termine [43,44,30] possono essere ritardate da un buon controllo metabolico.

### 3.2.6 Mutazioni e correlazioni genotipo/fenotipo

Il gene umano G6Pase (G6PC) è stato isolato da Lei et al. [45]. Il gene è localizzato sul cromosoma 17 in posizione 17q21, si estende per 12,5 kb, comprende 5 esoni e codifica per una proteina altamente idrofobica di 357 amminoacidi contenente 9 eliche transmembrana. Il suo promotore contiene diversi elementi di risposta per glucocorticoidi, AMP ciclico e insulina ed è regolato dai fattori nucleari degli epatociti che ne controllano l'espressione [46]. Sono stati studiati più di 550 pazienti affetti da GSD1a non correlati tra loro in tutto il mondo e sono state identificate oltre 85 mutazioni (Human Gene Mutation Database; <http://www.hgmd.cf.ac.uk>, [47]). La maggioranza sono mutazioni missenso (64%) [48] e tutte sono piccole alterazioni genetiche. Alcuni alleli non sono stati identificati. Solo alcune delle mutazioni hanno una frequenza significativa [53]:

- Nella popolazione caucasica, p.R83C e p.Q347X sono presenti rispettivamente nel 33% e nel 18% degli alleli di GSD1a.
- Nei pazienti ebraici, p.R83C è particolarmente frequente (98% degli alleli) e p.Q347X si trova negli alleli rimanenti (2%).
- Negli americani di origine ispanica, la mutazione c.380\_381insTA rappresenta circa la metà degli alleli.
- Nei pazienti giapponesi, le mutazioni p.Q347X e p.R83C non sono mai state trovate, p.R83H è molto rara, ma il cambiamento nucleotidico silente



c.648G > T, responsabile della delezione di 91 nucleotidi nell'esone 5 nel cDNA, è presente nel 91% degli alleli di GSD1a in questa popolazione.

- Nei pazienti cinesi, c.648G > T è anche frequente (54% degli alleli). La mutazione p.Q347X non è mai stata trovata e p.R83C solo una volta, mentre p.R83H è presente nel 26% degli alleli mutati.
- Nei pazienti coreani, c.648G > T è anche la mutazione più frequente (75%).
- Nei pazienti tunisini, p.R83C e p.R170Q rappresentano rispettivamente il 67% e il 28% degli alleli [54].

La struttura e la funzione di cinquanta mutazioni missenso e della delezione in-frame p.F327del sono state studiate [51,55]. Le 5 mutazioni nel sito attivo (comprese le mutazioni p.R83C/H), 23 delle 32 mutazioni elicoidali e 8 delle 14 mutazioni non elicoidali aboliscono completamente l'attività (alterando la stabilità proteica e/o la capacità catalitica). Le restanti mutazioni missenso studiate sono associate a una certa attività residua. I risultati di questo studio [55] dovrebbero contribuire a facilitare la delineazione genotipo-fenotipo, almeno per i pazienti omozigoti per una mutazione studiata. Un paziente giapponese omozigote per la mutazione non elicoidale p.P257L aveva un fenotipo molto lieve, in accordo con lo studio di espressione, e non ha mai avuto episodi di ipoglicemia. Il fenotipo clinico dei pazienti che portano queste mutazioni "lievi" dovrebbe essere documentato precisamente al fine di cercare di determinare l'attività minima di G6Pase necessaria per evitare gli episodi di ipoglicemia. Lo stato omozigote per c.648G > T è stato associato a un fenotipo più lieve per quanto riguarda gli eventi di ipoglicemia [56], ma altri fattori genetici e/o acquisiti potrebbero influenzare un possibile aumento del rischio di carcinoma epatocellulare [57].

### 3.2.7 Diagnosi

Gli esami di laboratorio a digiuno solitamente mostrano ipoglicemia, iperlattacidemia, ipertrigliceridemia, ipercolesterolemia e, in molti casi, iperuricemia [58].

I test funzionali mostrano l'assenza di una risposta glicemica e l'aggravamento dell'iperlattacidemia dopo l'iniezione di glucagone (1 mg/m<sup>2</sup> di superficie

corporea) in un paziente a digiuno o due ore dopo un pasto ricco di carboidrati. L'iniezione di galattosio (1 g/kg) non induce iperglicemia né corregge l'ipoglicemia. Altre anomalie biochimiche includono ipoacetoneemia, ipoinsulinemia e iperglicagonemia. È stato inoltre riportato un marcato aumento dell'attività della biotinidasi sierica nei pazienti affetti da GSD1a [59].

In passato, la diagnosi biochimica della GSD1 richiedeva necessariamente una biopsia epatica (idealmente fresca, non congelata), sufficientemente grande da consentire l'analisi dei diversi costituenti del sistema G6Pase [60]. L'attività idrolitica dell'enzima viene misurata utilizzando diversi substrati: mannosio-6-fosfato (per valutare l'integrità delle membrane microsomiali), G6P e pirofosfato. Nel tipo 1a, l'attività idrolitica è difettosa, indipendentemente dal substrato utilizzato e dallo stato delle membrane microsomiali. Non è stato possibile stabilire correlazioni tra il fenotipo biochimico e il fenotipo clinico basate sui risultati dell'attività residua e dell'accumulo di glicogeno nel fegato.

L'istologia del fegato mostra una distensione epatocitica indotta da glicogeno e grasso. In alcuni pazienti può essere presente anche fibrosi.

La sequenziazione completa del gene G6PC permette la diagnosi in quasi tutti i pazienti con segni clinici e biochimici evocativi di GSD1a, riducendo così la necessità di una biopsia epatica.

### **3.2.7.2 Diagnosi differenziale**

Quasi tutti i casi vengono diagnosticati nell'infanzia. Un numero limitato di parametri clinici e biologici consente la diagnosi: una marcata ed estesa epatomegalia associata a episodi ipoglicemici e una concentrazione elevata di lattato nel sangue a digiuno che diminuisce dopo un pasto ricco di carboidrati o un test di tolleranza al glucosio sono indicativi della GSD1.

La diagnosi può essere più difficile nei pazienti più grandi, specialmente nei pochi pazienti che presentano una rara tolleranza prolungata al digiuno [12,61].

Tra le altre malattie della gluconeogenesi, in alcuni casi può essere presa in considerazione la carenza di fruttosio-1,6-bisfosfatasi. Tuttavia, in questa malattia, la tolleranza al digiuno è molto più lunga (8-10 ore) rispetto alla GSD1 e il fegato non è così ingrandito.

Possono essere presi in considerazione in diagnosi differenziale anche altri tipi di GSD (*tabella II*). La GSD3 (deficit di amilo-1-6-glicosidasi) può essere clinicamente simile nell'infanzia, ma l'ipoglicemia di solito non è così grave come nel tipo I poiché la gluconeogenesi è intatta e la fosforilasi è ancora in grado di metabolizzare i rami periferici del glicogeno. Nella GSD3, la lattatemia a digiuno e l'acido urico sono tipicamente normali e i livelli di transaminasi epatiche sono più alti rispetto alla GSD1. La GSD di tipo 6 (deficit di fosforilasi epatica) o di tipo 9 (deficit di chinasi fosforilasi b epatica) dovrebbero essere prese in considerazione anche in quanto possono presentarsi come una forma grave di queste malattie. I tumori epatici primari e la sindrome di Pepper (metastasi epatiche del neuroblastoma) possono essere presi in considerazione, ma sono facilmente esclusi attraverso dati clinici e ecografici.

<b>Tipo di GSD</b>	<b>Caratteristiche cliniche</b>	<b>Variazioni biochimiche</b>
Ia (von Gierke)	Epatomegalia (+++), ritardo della crescita, distensione addominale	Ipoglicemia (+++), acidemia lattica, iperuricemia (++), iperlipidemia, chetosi lieve
Ib	Epatomegalia, ritardo della crescita, distensione addominale, ulcere orali e intestinali	Ipoglicemia (+++), acidemia lattica, iperuricemia (++), iperlipidemia, chetosi lieve
III (Cori, Forbes)	Epatomegalia, ritardo nella crescita	Ipoglicemia, Chetosi (++), iperlipidemia, aumento CK e transaminasi
IV (Andersen)	Epatomegalia, ritardo nella crescita, distensione addominale, cirrosi	Ipoglicemia infrequente
VI (Hers)	Epatomegalia, ritardo nella crescita, distensione addominale	Ipoglicemia, chetosi lieve
IXa	Epatomegalia, ritardo nella crescita	Ipoglicemia, chetosi lieve, iperlipidemia lieve
IXb	Epatomegalia, ritardo nella crescita, ipotonia, debolezza muscolare	Ipoglicemia, chetosi lieve, iperlipidemia lieve
Sindrome di Fanconi-Bickel	Epatomegalia, ritardo nella crescita, tubulopatia di Fanconi	Ipoglicemia (veloce), glicosuria, iperamminoaciduria, acidosi, iperfosfaturia

*Tabella II. Diagnosi differenziale delle glicogenosi epatiche*

### **3.2.7.3 Diagnosi Prenatale**

Prima dell'identificazione del gene coinvolto, per stabilire in epoca prenatale la presenza di GSD1a era necessaria una biopsia fetale del fegato effettuata nelle fasi avanzate della gravidanza, un metodo non esente da errori diagnostici.

Grazie agli avanzamenti nella ricerca molecolare, oggi è molto più semplice diagnosticare in anticipo la GSD1a, specialmente se sono già state riconosciute mutazioni genetiche all'interno della famiglia [62,63,64]. La malattia è trasmessa come un tratto autosomico recessivo per cui entrambi i genitori di un bambino affetto devono essere eterozigoti. Per fare la diagnosi genetica prenatale, è possibile estrarre il DNA fetale dai villi coriali o dal liquido amniotico.

### **3.2.8 Gestione e trattamento**

#### **3.2.8.1 Trattamento dietetico**

Il trattamento per i pazienti affetti da GSD1a ha l'obiettivo di prevenire l'ipoglicemia al fine di evitare il coinvolgimento neurologico e le complicanze a lungo termine, come danni al fegato e ai reni, e assicurare una crescita normale. Il trattamento si basa principalmente su modifiche dietetiche e prevede le seguenti misure [58]:

- **Pasti frequenti:** si consiglia di consumare pasti frequenti durante il giorno per evitare l'ipoglicemia.
- **Alimentazione continua notturna:** viene utilizzata una sonda nasogastrica per fornire un apporto costante di nutrienti (6-8 mg di glucosio/kg/min) durante la notte. Dopo il primo anno di vita, l'amido di mais crudo (introdotto dai 9 ai 12 mesi di età, con aumento progressivo delle dosi) può, in alcuni pazienti, sostituire l'alimentazione continua notturna alla dose iniziale di 0,5 g/kg, aumentando lentamente fino a 1 g/kg ogni 4 ore. Man mano che il bambino cresce, il regime di amido di mais può essere modificato alla dose di 1,5-2,0 g/kg ogni 6 ore. Gli adulti possono assumere 1,7-2,5 g/kg prima di coricarsi.
- **Carboidrati a lento assorbimento:** si raccomanda l'assunzione di carboidrati a lento assorbimento, come l'amido crudo [65], per evitare un'eccessiva

produzione di lattato. Un nuovo tipo di amido modificato è stato testato nei pazienti con GSD: finora sembra che questo nuovo amido possa consentire, in alcuni pazienti, una durata più lunga di euglicemia e un migliore controllo metabolico a breve termine [66,67].

- Limitazione di fruttosio e galattosio: è consigliato limitare l'assunzione di fruttosio e galattosio, in quanto possono peggiorare l'iperlattacidemia.
- Monitoraggio dell'apporto calorico giornaliero: l'apporto calorico deve essere monitorato attentamente. Un apporto insufficiente non corregge i disturbi metabolici (ipoglicemia, iperlattacidemia e iperuricemia) e può causare ritardo nella crescita, mentre un apporto eccessivo può portare a sovraccarico di glicogeno, epatomegalia, iperlipidemia e obesità.
- Composizione della dieta: la dieta dovrebbe consistere nel 60-65% di carboidrati, 10-15% di proteine e il resto da grassi.
- Monitoraggio clinico e biologico (*tabella III*): l'efficacia del trattamento viene valutata attraverso il monitoraggio dei parametri clinici (crescita, indice di massa corporea, epatomegalia, pressione sanguigna) e dei parametri biologici (livelli di glucosio, lattato, trigliceridi, colesterolo, acido urico, gas nel sangue, proteine nelle urine, conteggio delle cellule del sangue). La glicemia preprandiale deve essere superiore a 3,5 mmol/L e adeguata all'escrezione urinaria di lattato effettiva, che deve essere inferiore a 0,06 mmol/mmol di creatinina nei campioni di urine di 12 ore (notte e giorno).

Parametri	Target
Glicemia preprandiale	> 3.5-4.0 mmol/L (adeguare all'escrezione di lattato effettiva)
Rapporto lattato/creatinina nelle urine	< 0.06 mmol/mmol
Concentrazione sierica di acido urico	Range normale per età e laboratorio
Basi nel sangue venoso	> - 5mmol/L
Bicarbonato nel sangue venoso	> 20 mmol/L
Concentrazione sierica di trigliceridi	< 6.0 mmol/L
Indice di massa corporea	0.0 – 2.0 SDS

*Tabella III. Target terapeutici della terapia della GSD1a*

- Monitoraggio del lattato: in caso di malattia acuta intercorrente, il monitoraggio del lattato nel sangue può essere utile per valutare l'acidità e l'andamento della malattia [68].
- Evitare soluzioni contenenti lattato durante interventi chirurgici o procedure speciali e si consiglia di mantenere la glicemia attraverso infusioni di glucosio al 10% (prima, durante e dopo l'intervento) e di monitorare attentamente l'emostasi [69].

In generale, il trattamento mira a mantenere i livelli di glucosio nel sangue stabili e ad evitare la produzione eccessiva di lattato, al fine di prevenire le complicanze e garantire una buona qualità di vita.

### **3.2.8.2 Integratori e farmaci**

Gli ausili terapeutici includono integratori vitaminici (vitamine D e B1, ecc.), calcio (considerando l'assunzione limitata di latte), ferro in caso di anemia (dopo aver escluso altre cause) e allopurinolo quando è presente l'iperuricemia.

Se è presente microalbuminuria permanente, viene avviato il trattamento con un inibitore dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE-inibitori) al fine di prevenire complicanze renali [28], e possono essere aggiunti farmaci per abbassare la pressione sanguigna se la pressione rimane elevata. Nel caso di una gravidanza, gli ACE inibitori devono essere interrotti immediatamente. L'iperlipemia risponde solo parzialmente al trattamento dietetico, ma i farmaci per abbassare i trigliceridi non sono indicati se il livello rimane al di sotto di 10 mmol/L. I farmaci per abbassare il colesterolo non sono indicati nei giovani pazienti a causa del basso rischio di aterogenicità.

### **3.2.8.3 Terapia nelle emergenze**

La procedura di emergenza per scompenso metabolico acuto in pazienti con GSD1a si attua nel seguente modo:

1. La soluzione endovenosa di glucosio deve essere somministrata immediatamente, inizialmente come iniezione in bolo (in 10 minuti) seguita dal 125-150% del normale fabbisogno di glucosio (a seconda della temperatura

corporea) per 12 ore seguito a sua volta dal 100-125% del normale fabbisogno di glucosio (*tabella IV*).

<b>Età</b>	<b>Bolo</b>	<b>Fabbisogno normale di glucosio</b>
0-12 mesi	500 mg glucosio/kg (5 ml 10% glucosio/kg)	7-9 mg/kg/min
1-6 anni	400 mg glucosio/kg (4 ml 10% glucosio/kg)	6-8 mg/kg/min
6-12 anni	350 mg glucosio/kg (3.5 ml 10% glucosio/kg)	5-6 mg/kg/min
Adolescenti	300 mg glucosio/kg (3 ml 10% glucosio/kg)	5 mg/kg/min
Adulti	250 mg glucosio/kg (2.5 ml 10% glucosio/kg)	3-4 mg/kg/min

*Tabella IV. Terapia nelle emergenze: schema di somministrazione del glucosio*

2. L'acidosi metabolica deve essere corretta con soluzione di bicarbonato per via endovenosa.

### **3.2.9 Outcome e follow-up**

Il rischio di trasformazione maligna degli adenomi epatocellulari in carcinomi epatocellulari sembra essere basso [20,70,71]: nessuna trasformazione maligna è stata segnalata nello studio retrospettivo europeo [20]; altri studi hanno suggerito che più i pazienti invecchiano, più aumenta il rischio di trasformazione [72]. La gestione degli adenomi può essere di attesa o chirurgica. Clinicamente, se si verificano dolori addominali che richiedono l'utilizzo di forti analgesici per essere controllati, si deve sospettare una trasformazione maligna, anche se tali manifestazioni non sono specifiche. I marcatori biologici (alfa-fetoproteina e ACE nel siero) non sono predittivi di trasformazione maligna. La tomografia computerizzata del fegato e la risonanza magnetica possono essere utili in questi casi, anche se sono necessarie ulteriori valutazioni. La resezione chirurgica degli adenomi epatici è fattibile. Segnalazioni precedenti hanno evidenziato frequenti problemi emorragici [73], ma tali complicanze possono essere evitate, a condizione

che si ottenga un rigoroso controllo metabolico prima dell'intervento chirurgico [74].

Se il controllo dietetico fallisce o gli adenomi epatici subiscono una trasformazione maligna, il trattamento delle complicanze consiste nel trapianto di fegato [75]. Il trapianto di fegato corregge l'ipoglicemia e le altre anomalie biochimiche mentre non è stato dimostrato che possa prevenire il coinvolgimento renale, che potrebbe addirittura peggiorare a causa della terapia immunosoppressiva dovuta al trapianto stesso. Tuttavia, l'esperienza di trapianto di fegato per GSD1 è limitata a causa della rarità della malattia. Sono state segnalate complicanze come il rigetto cronico del trapianto, l'infezione da epatite C post-trasfusionale, l'insufficienza renale, l'artrite gottosa e la trombosi della vena porta che richiede un re-trapianto [76]. La letteratura attuale mostra che è possibile ottenere risultati soddisfacenti a medio termine nei pazienti con GSD1 [76]. Dati simili sono stati riportati per il trapianto di fegato da donatore vivente in tali pazienti [77]. Come evidenziato da Davis e Weinstein [78], i rischi e i benefici del trapianto di fegato devono essere valutati attentamente e quest'ultimo dovrebbe essere eseguito solo quando è presente un alto rischio di carcinoma epatocellulare o di disfunzione epatica. Il trapianto di cellule epatiche potrebbe rappresentare un approccio meno invasivo in futuro [79].

Il trapianto di rene viene eseguito in caso di grave insufficienza renale ma non corregge l'ipoglicemia [72]. Si può pensare ad un trapianto combinato fegato-rene quando la funzione renale è già compromessa ed è stato eseguito con successo in alcuni casi [80,81].

### **3.2.10 Prognosi**

Un trattamento dietetico precoce ed efficace porta a una riduzione della mortalità e della morbilità, permettendo alla maggior parte dei pazienti di condurre una vita abbastanza normale. Se viene mantenuta una normoglicemia, le anomalie metaboliche e i parametri clinici migliorano nella maggior parte dei pazienti, anche se l'iperlipidemia persiste. Nei pazienti che rispondono bene al trattamento l'incidenza degli adenomi sembra essere inferiore mentre bisogna tenere presente che la malattia renale non può essere completamente evitata. Alcuni pazienti non



rispondono bene e potrebbero richiedere un trapianto di fegato o un trapianto combinato rene-fegato (con la mortalità e la morbilità associate a tali procedure) [20,12,37]

### **3.3 AMBULATORIO DI MALATTIE METABOLICHE EREDITARIE PER L'ADULTO**

Fino a non molto tempo fa, i pazienti affetti da malattie metaboliche ereditarie potevano contare su un supporto assistenziale che li accompagnava sostanzialmente fino al raggiungimento della maggiore età, momento in cui perdevano la possibilità di essere istituzionalmente seguiti dai pediatri esperti di malattie metaboliche, e non trovavano un continuum nella loro assistenza nell'epoca adulta. Inoltre, il fenotipo della malattia in età adulta può essere diverso da quello riscontrato in età pediatrica e le differenze possono essere notevoli anche da un paziente all'altro.

A partire dal 2018, presso l'UOC Malattie del Metabolismo dell'Azienda Ospedale-Università Padova, è stata avviata la realizzazione di un Ambulatorio dedicato, con un percorso assistenziale interamente dedicato ai pazienti adulti affetti da malattie metaboliche ereditarie, che possono ora contare su un continuum nelle loro cure, con una visione a 360°. L'approccio multidisciplinare, basato sulla collaborazione di diversi specialisti, clinici e di laboratorio, è il punto di forza dell'ambulatorio dedicato al paziente adulto, dove si fondono le competenze dei singoli e dove esse stesse crescono grazie al dialogo e all'aggiornamento continuo del personale coinvolto.

L'Ambulatorio rappresenta il punto di riferimento per le malattie metaboliche ereditarie per tutta la Regione Veneto e anche per pazienti provenienti da altre Regioni. Vengono seguiti pazienti affetti da numerose patologie, in particolare le glicogenosi, i disturbi del ciclo dell'urea, le malattie da accumulo lisosomiale (es. Malattia di Fabry), le acidurie organiche (es. aciduria metimalonica), la cistinosi renale.

In particolare, sono 11 i pazienti attualmente seguiti affetti da GSD1a e, nelle tabelle seguenti (*tabella V e VI*), sono riassunti i principali dati di laboratorio e clinici al momento della presa in carico.

Paziente	Età	Sesso	Genetica
1	41	F	p. Q347xD38V
2	38	M	ND
3	45	F	ND
4	39	M	p.R83C p.R170Q
5	41	M	p.R83C p.Q20R
6	64	F	ND
7	27	M	ND
8	40	M	ND
9	38	F	c.79delC/p.Gln27ArgfsX9; c.1039C>T/p.Glu347Ter
10	33	M	ND
11	47	F	ND

*Tabella V. Descrizione della casistica dei pazienti con GSD1a seguiti presso l'ambulatorio*

Paziente	Emoglobina (g/L)	pH (sangue venoso)	Glicemia a digiuno (mmol/L)	Acido lattico (mmol/L)	Acido urico (mmol/L)	Creatinina (umol/L)	eGFR (ml/m <sup>2</sup> /1.73mq)(EPI-CKD)	Trigliceridi (mmol/L)	Proteinuria 24h (g)	Episodi di ipoglicemia	Adenomi epatici	Trapianto di rene
1	118*	7,31*	4,6	4,7*	0,28	30*		2,04*	0,11	SI	SI	NO
2	110*	7,36	8,2*	2,6*	0,46*	73		2,74*	0,11	SI	SI	NO
3	107*	7,30*	8,5*	6,2*	0,36*	46		3,32*	0,16	SI	NO	NO
4	105*	7,24*	4,0	2,8*	0,49*	61		6,47*	0,40*	SI	NO	NO
5	154	7,26*	6,0*	2,2	0,28	69		2,77*	0,14	SI	NO	NO
6	114*	7,37	3,6*	2,4*	0,29	71		5,40*	0,48*	SI	SI	SI
7	106*	7,30*	6,3*	7,0*	0,70*	49*		9,85*	0,13	SI	NO	NO
8	105*	7,36	4,6	7,5*	0,33	104		6,19*	ND	SI	SI	NO
9	93*	7,33*	4,8	1,6	0,28	194*		4,34*	0,30*	SI	NO	NO
10	106*	7,30*	3,1*	6,9*	0,27	55*		>50,00*	0,07	SI	NO	NO
11	107*	7,39	5,8*	4,6*	0,39*	35*		2,85*	ND	SI	SI	NO

Tabella VI. Principali dati di laboratorio e clinici al momento della presa in carico  
\*valori patologici

In sintesi, 10 pazienti su 11 presentano alterati livelli di emoglobina, 7 pazienti su 11 presentano pH alterato, 7 pazienti su 11 presentano glicemia a digiuno alterata, 9 pazienti su 11 presentano alterati livelli di acido lattico, 5 pazienti su 11 presentano alterati livelli di acido urico, 5 pazienti su 11 presentano alterati livelli di creatinina sierica, 3 pazienti su 11 presentano alterati livelli di eGFR, 11 pazienti su 11 presentano alterati livelli di trigliceridi, 3 pazienti su 9 (2 dati non disponibili) presentano alterati livelli di proteinuria nelle 24h, 11 pazienti su 11 riferiscono precedenti episodi di ipoglicemia, 5 pazienti su 11 presentano adenomi epatici e infine 1 solo paziente su 11 è stato precedentemente sottoposto a trapianto di rene.

### **3.4 MODELLI SPERIMENTALI DI MALATTIA**

I modelli sperimentali di malattia permettono di studiare i meccanismi fisiopatologici delle malattie metaboliche, in laboratorio, su animali o colture cellulari. Qualunque sia il modello utilizzato, deve riprodurre almeno alcuni degli aspetti della malattia, ed essere il più "fedele" possibile alla patologia umana.

Questi modelli rendono possibile uno studio sulle malattie più precisa e dettagliato, riducendo gli elementi confondenti e consentendo di ripetere gli esperimenti più volte, in modo tale da garantire risultati affidabili. Questa considerazione è tanto più valida nelle malattie metaboliche ereditarie, dove le casistiche sono spesso estremamente limitate e le conoscenze ancora molto povere.

- Modelli animali: continuano a essere utilizzati per studiare anche le malattie rare, pur presentando sempre più limitazioni in ambito sperimentale/bioetico. Animali geneticamente modificati possono essere impiegati per riprodurre fenotipi specifici di malattie rare e consentire lo studio approfondito delle basi patologiche e delle possibili terapie.
- Colture cellulari primarie: sono costituite da cellule direttamente isolate da tessuti o organi affetti da malattie rare, che vengono coltivate in vitro e possono fornire informazioni preziose sulla fisiopatologia della malattia e sulla risposta ai trattamenti. Tuttavia, talvolta può essere difficile ottenere un

numero sufficiente di cellule primarie e la loro durata di vita in vitro può essere limitata.

- **Linee cellulari stabilizzate:** queste linee cellulari sono derivate da colture cellulari primarie, ma sono state modificate geneticamente o stabilizzate per proliferare indefinitamente in vitro (“immortalizzate”). Sono spesso utilizzate per la produzione di grandi quantità di cellule per condurre studi approfonditi sulla malattia, testare nuove terapie o valutare la risposta ai farmaci.
- **Modelli cellulari derivati da cellule staminali pluripotenti indotte (IPSC o IPS):** le cellule staminali pluripotenti possono essere indotte a differenziarsi in tipi cellulari specifici, ad esempio associati alle malattie rare. Questi modelli cellulari possono fornire una piattaforma per lo studio della patogenesi, la valutazione di potenziali trattamenti e l'identificazione di biomarcatori. Inoltre, possono essere utilizzati per lo screening di farmaci per malattie rare.
- **Organoidi:** gli organoidi sono strutture tridimensionali che si auto-organizzano a partire da cellule staminali o progenitrici. Possono essere utilizzati per modellare specifici tessuti o organi affetti da malattie rare, fornendo un ambiente tridimensionale che riflette meglio la fisiologia dell'organismo. Gli organoidi possono consentire lo studio delle interazioni cellulari, delle alterazioni patologiche e l'individuazione di potenziali approcci terapeutici.

L'utilizzo di questi modelli cellulari e animali, combinato con studi clinici e altre approcci sperimentali, può contribuire a migliorare la comprensione e la gestione delle malattie rare, nonché a identificare nuovi bersagli terapeutici e sviluppare trattamenti innovativi. È importante sottolineare che la scelta del modello dipenderà dalle caratteristiche specifiche della malattia e dagli obiettivi della ricerca.

#### **3.4.1 Modelli utilizzati nella GSD1a**

In letteratura sono presenti diversi lavori riguardanti modelli animali di GSD1a [25, 82,83,84,85,86], mentre esiste un unico studio che utilizza modelli cellulari di GSD1a [87]. In tale studio, Katagami et al. hanno dimostrato che le colture di cellule staminali pluripotenti indotte (IPSCs) umane possano rappresentare un valido

modello per esplorare i meccanismi fisiopatologici della GSD1a. Hanno sviluppato e analizzato una specifica linea di iPSC derivante da un paziente affetto da GSD 1a in forma attenuata, portatore di una mutazione nel gene G6PC (c.648G>T; p.Leu216=). Queste cellule, ottenute dai fibroblasti del paziente e riprogrammate con l'ausilio dei vettori del virus Sendai, mostrano caratteristiche simili alle cellule staminali embrionali umane, inclusa la capacità di differenziarsi in tutti e tre gli strati germinativi. Queste iPSC, inoltre, conservano un cariotipo regolare e presentano la citata mutazione del gene G6PC. Una volta stabilizzate, le iPSC possono evolversi in epatociti che rivelano una reazione positiva alla colorazione per l'alfa-fetoproteina. Questo approccio ha permesso di identificare un modello promettente per approfondire gli aspetti fisiopatologici legati alle complicanze epatiche nella GSD1a.

Per quanto riguarda le metodiche basate sull'uso di colture cellulari primarie umane, in letteratura è stato descritto l'utilizzo di colture di cellule epiteliali renali URECs umane per lo studio dell'interessamento renale in alcune patologie, come ad esempio le malattie renali cistiche ereditarie [88], l'aciduria propionica [89], l'aciduria metilmalonica [90] e la malattia di Fabry [91].

Al contrario ad oggi, non risulta che tale metodica sia stata ancora utilizzata per lo studio dell'interessamento renale nella GSD1a, che rappresenta l'oggetto della presente tesi.

Di seguito vengono descritte in sintesi le principali caratteristiche delle cellule epiteliali renali.

### **3.4.2 Anatomia delle cellule tubulari epiteliali renali**

Le cellule tubulari epiteliali tappezzano l'interno dei tubuli renali. La loro morfologia varia in base alla sezione del nefrone in cui si trovano.

1. Tubulo Contorno Proximale: Localizzato nella corteccia renale, è costituito da cellule epiteliali cubiche dotate di un bordo spazzolato, denso di microvilli. Questa configurazione aumenta la superficie di assorbimento, ottimizzando il riassorbimento di sostanze utili come glucosio, aminoacidi e ioni.

2. Ansa di Henle: Questa struttura a forma di U si estende dalla corteccia alla midollare renale. La parte discendente ha cellule sottili e permeabili all'acqua, mentre la parte ascendente presenta cellule più spesse, specializzate nel riassorbimento attivo di sodio e cloruro.
3. Tubulo Contorno Distale: Simili alle cellule del TPC, ma con meno microvilli, queste cellule sono essenziali per la regolazione fine della composizione dell'urina, in particolare riguardo al bilancio di sodio e potassio.
4. Dotto Collettore: Le cellule qui presenti sono fondamentali per l'ultima fase di concentrazione dell'urina e la regolazione del bilancio idrico.

### **3.4.3 Fisiologia delle cellule tubulari epiteliali renali**

Queste cellule sono strutturate per riassorbire e secernere attivamente sostanze, permettendo una precisa regolazione del filtrato glomerulare. Ad esempio, nel TPC, oltre all'80% del sodio filtrato viene riassorbito, insieme a molecole nutritive come glucosio e aminoacidi. Il processo è altamente attivo e dipende dal trasporto mediato da trasportatori specifici e pompe, come la pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasi.

L'Ansa di Henle, attraverso il gioco di permeabilità differenziale delle sue cellule, consente la formazione di un gradiente osmotico nella midollare renale, essenziale per la concentrazione dell'urina.

Nel TDC, la secrezione e il riassorbimento di ioni, in particolare potassio e sodio, sono finemente regolati in risposta a segnali ormonali, come l'aldosterone.

### **3.4.4 Marcatori delle cellule tubulari epiteliali renali**

I marcatori delle cellule epiteliali tubulari renali sono utilizzati per identificare e studiare le cellule dei tubuli renali, specialmente in studi sulla fisiologia e patologia renale. Questi marcatori possono essere utilizzati in esperimenti di immunomarcatura, Western blot, PCR e altre tecniche di biologia molecolare e cellulare.

Di seguito vengono elencati alcuni dei marcatori più comunemente utilizzati per identificare le cellule epiteliali tubulari renali:

- AQP1 (Aquaporina 1): principalmente espresso nelle cellule del tubulo prossimale e nell'ansa sottile ascendente di Henle.
- AQP2 (acquaporina 2): principalmente espresso a livello del dotto collettore.
- Megalin (o gp330): recettore endocitico presente principalmente nei microvilli del tubulo prossimale.
- Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase: pompa ionica ubiquitaria, ma densamente espressa nella membrana basolaterale delle cellule tubulari.
- E-caderina: marcatore per l'epitelio in generale, comprese le cellule epiteliali tubulari renali.
- KIM-1 (Kidney Injury Molecule-1): non è presente in condizioni normali ma viene espressa in risposta al danno tubulare e quindi è spesso utilizzata come marcatore di lesioni tubulari.
- Vimentina: è tipicamente un marcatore mesenchimale, ma la sua espressione può aumentare nelle cellule tubulari in risposta al danno.
- CD10: è un marcatore della superficie cellulare del tubulo prossimale.



## 4. SCOPO DELLO STUDIO

I pazienti affetti da GSD1a accumulano glicogeno non solo nel fegato, ma anche nei reni e presentano una patologia simile alla nefropatia diabetica, che può progredire fino all'insufficienza renale. Nei modelli animali con delezione specifica per il rene di G6Pase, è stata osservata una nefropatia ad insorgenza precoce (25) con un incremento dei livelli di stress ossidativo dovuto all'attivazione dei sistemi dell'angiotensina II e del TGF- $\beta$ 1 (17).

Metodiche basate sull'uso di cellule epiteliali renali URECs umane sono state utilizzate per lo studio dell'interessamento renale in alcune patologie, come ad esempio le malattie renali cistiche ereditarie, l'aciduria propionica, l'aciduria metilmalonica e la malattia di Fabry. Al contrario ad oggi, non risulta che tale metodica sia stata ancora utilizzata per lo studio dell'interessamento renale nella GSD1a, che rappresenta l'oggetto del presente studio.

Scopo dello studio è mettere a punto una metodica basata sulla coltura in vitro di cellule epiteliali derivate dall'urina (URECs) di pazienti con GSD1a, fonte facilmente accessibile e non invasiva, per valutare se conservano le loro caratteristiche biologiche e possono essere utilizzate per fornire nuovi strumenti e approcci per lo studio dei meccanismi molecolari alla base del coinvolgimento renale e per la gestione clinica della malattia.

Questo approccio offre numerosi potenziali vantaggi: oltre a eliminare la necessità di procedure invasive come le biopsie, l'utilizzo di cellule epiteliali renali isolate dall'urina potrebbe permettere studi longitudinali, monitorando i cambiamenti nelle cellule nel tempo e valutando l'efficacia di nuovi trattamenti o terapie.

## 5. MATERIALI E METODI

I campioni di urina sono stati raccolti, previo consenso informato, da tre pazienti affetti da GSD1a, seguiti presso l'Ambulatorio per le malattie metaboliche rare dell'Azienda Ospedale-Università Padova, e da tre controlli sani [92].

### 5.1 PREPARAZIONE E COLTURA DELLE CELLULE EPITELIALI RENALI DERIVANTI DALLE URINE (URECs)

Le urine (100-200 mL) sono state raccolte in contenitori sterili con 100 U/mL di penicillina, 100 µg/mL di streptomina e 2,5 µg/mL di amfotericina B, seguendo il protocollo descritto da Zhou et al. [93].

A causa dell'elevato rischio di contaminazione, le cellule sono state isolate subito dopo la raccolta delle urine centrifugandole a 400×g per 10 minuti a temperatura ambiente. Il surnatante è stato accuratamente aspirato e sono stati aggiunti 10 mL di tampone fosfato salino (PBS ECB400LX10 Euroclone) contenente streptomina/penicillina e amfotericina B al campione, che è stato centrifugato a 400× g per 10 minuti. Il surnatante è stato scartato e 0,2 mL del pellet sono stati risospesi con 1 mL di terreno primario (DMEM/Ham's 12 Nutrient mix 1:1 (SH3027010 Euroclone, Pero-MI, Italia), supplementato con 10% di siero bovino fetale (FBS South America Origin EU ECS0180L Euroclone), 100 U/mL di penicillina, 100 µg/mL di streptomina (ECB3001D Euroclone), con il kit REGM single Quot (LOCC4127 Euroclone) e 2,5 µg/mL di amfotericina B (ECM0009D Euroclone): la sospensione è stata poi trasferita su una piastra formata da 12 pozzetti rivestiti con lo 0,1% di gelatina (peso/vol). Le cellule sono state incubate a 37 °C e 5% di CO<sub>2</sub> per 24 ore. Ogni 24 ore è stato aggiunto alle cellule 1 ml di terreno primario. Tre giorni dopo la semina, il terreno è stato aspirato, lasciandone circa 1 mL, quindi è stato aggiunto 1 mL di terreno fresco, cambiato poi ogni giorno. Quando sono apparse piccole colonie cellulari (quattro-cinque cellule), il terreno primario è stato nuovamente cambiato con il terreno di proliferazione ogni 2 giorni. Le cellule sono state espanse fino all'80-90% di confluenza e poi divise per un'ulteriore

proliferazione. Le cellule sono state risospese in Cryostor (CS10 Voden, MI, Italia), quindi congelate al quarto passaggio in azoto liquido per un uso successivo.

Successivamente allo studio descritto in questa tesi, le cellule sono state scongelate e finora coltivate fino all'ottavo passaggio mantenendo vitalità e le caratteristiche morfologiche.

## **5.2 ANALISI MORFOLOGICA DELLE URECs**

La microscopia elettronica a trasmissione (TEM) è stata utilizzata per fornire informazioni morfologiche sulle cellule al quarto passaggio di coltura. Sono stati utilizzati i protocolli TEM standard su un microscopio FEI Tecnai G2 presso il Dipartimento di Biologia dell'Università di Padova.

## **5.3 IMMUNOFLUORESCENZA SULLE URECs**

Per caratterizzare le cellule in coltura sono stati utilizzati: anticorpi anti-E-caderina di topo (610182 BD Biosciences, Milano, Italia), anticorpi policlonali AQP1, coniugati con Alexa Fluor®647 (BS-1506R-A647 CliniSciences, Nanterre Francia), e AQP2, coniugati con Cy5 (BS-4611R-CY5 CliniSciences).

Le URECs sono state seminate su un vetrino coprioggetto rotondo ( $\varnothing$  13 mm) a una densità di  $1,0 \times 10^4$  e incubate per una notte con il terreno di proliferazione. Le diverse preparazioni di cellule sono state successivamente incubate con anti-E-caderina o, anti-AQP1 o anti-AQP2 a 4 °C per un'altra notte. L'anticorpo primario E-caderina è stato rilevato mediante incubazione con IgG anti-topo coniugato con Alexa Fluor®488 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) per 1 ora a temperatura ambiente. Infine, le cellule sono state colorate con 4,6-diamido-2-fenilindolo (DAPI Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) per 15 minuti a 37°C per la visualizzazione dei nuclei. Le immagini sono state acquisite con un microscopio Apotome.2 (Axiovert 200 M, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Germania).

## **5.4 QUANTIFICAZIONE DEI ROS**

I ROS nelle UREC sono stati misurati con il kit Cellular ROS Assay (DCFDA/H2DCFDA-Cellular ROS Assay Kit AMab113851 Prodotti Gianni Srl Milano, Italia) secondo le

istruzioni del produttore. Le cellule sono state seminate su una piastra da 96 micropozzetti con fondo scuro trasparente con circa 25.000 cellule per pozzetto. Le cellule sono state incubate per una notte a 37 °C e al 5% di CO<sub>2</sub>. Il giorno successivo, le cellule sono state coltivate per 24 ore in condizioni di glucosio normale (5,5 mM), alto (25 mM) o basso (0,5 mM). Le cellule incubate per tutta la notte con 100 µM di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sono state utilizzate come controllo positivo. Successivamente, le cellule sono state incubate con DCFDA per 45 minuti a 37°C e analizzate su un lettore di piastre (Mithras LB 940 Berthold Italia Srl) a Ex/Em = 485/535 nm in modalità endpoint. Ogni procedimento è stato eseguito almeno in triplicato.

## **5.5 ANALISI STATISTICA**

L'analisi statistica nel confronto dei ROS fra soggetti affetti da patologia e soggetti di controllo, ai diversi livelli di glucosio, è stata effettuata usando il test di distribuzione t di Student per dati non appaiati.

## **5.6 APPROVAZIONE DELLO STUDIO**

Lo studio è stato condotto in accordo con la dichiarazione di Helsinki e approvato dal Comitato etico dell'Azienda Ospedale-Università Padova.

## 6. RISULTATI

### 6.1 CARATTERISTICHE DELLE URECs

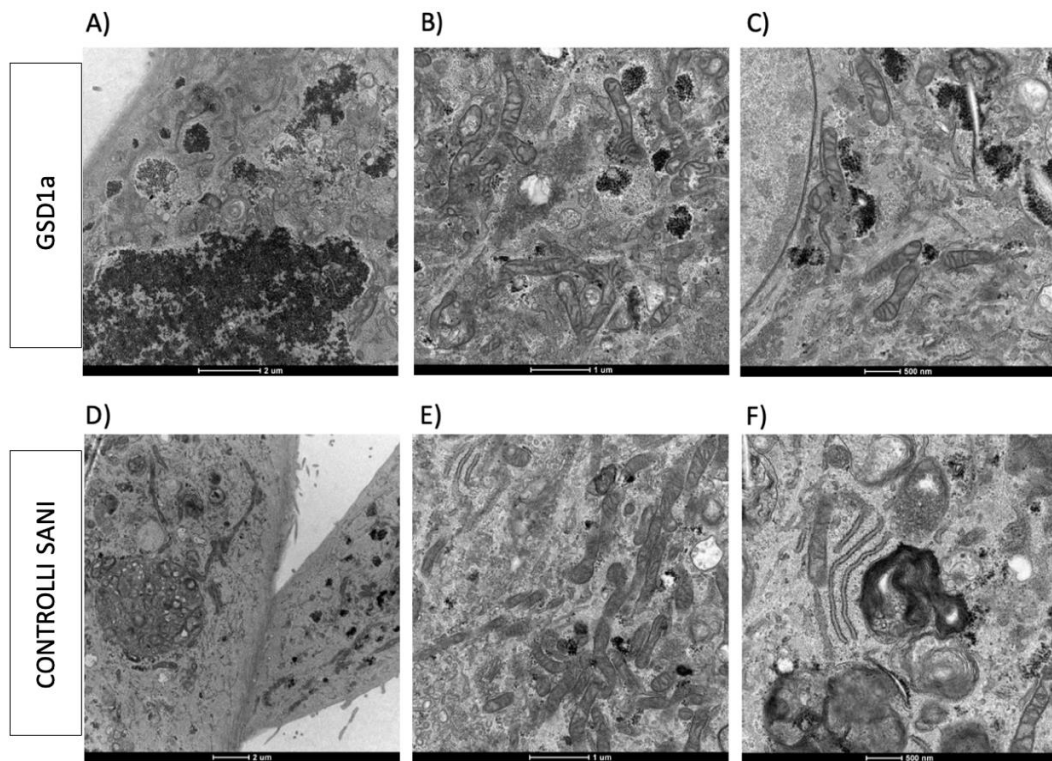
In questo studio abbiamo ottenuto quantità sufficienti di cellule in tre campioni provenienti da pazienti con GSD1a (*Tabella VII*) e tre controlli sani della stessa fascia d'età.

La resa delle colture percentuale di successo delle colture è risultata del 60% circa.

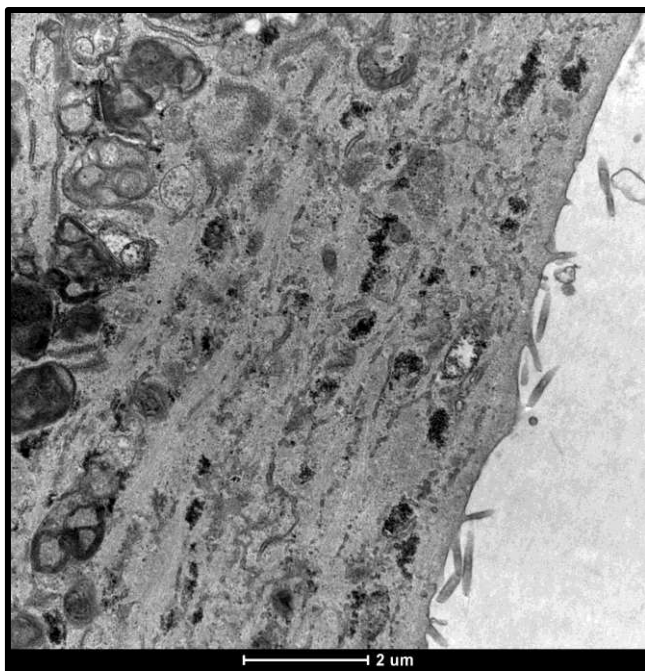
	<b>Paziente 1</b>	<b>Paziente 2</b>	<b>Paziente 3</b>
Età (anni)	40	44	29
Diagnosi	enzimatica	enzimatica	biochimica
Sesso	Maschio	Maschio	Maschio
Mutazione G6P	p.R83C p.R170Q	p.R83C p.Q20R	ND
eGFR (mL/min/1,73 m <sup>2</sup> )	119	110	140
Proteinuria (g/24 h)*	No	No	Si

*Tabella VII. Caratteristiche dei pazienti GSD1a. \*Proteinuria definita come escrezione urinaria di proteine nelle 24 ore > 0,15 g.*

Al quarto passaggio, le cellule URECs provenienti dai pazienti GSD1a (*Figura 5, Riquadri A-C*) conservano un notevole accumulo di glicogeno, come evidenziato dalla microscopia elettronica a trasmissione (*TEM, Figura 5, riquadro A*). In queste cellule non si evidenziano segni di stress rispetto alle cellule prelevate da individui sani (*Figura 5, Riquadri D-F*), coltivate nelle medesime condizioni. Durante questo step, le URECs mostrano le tipiche strutture ciliate dell'epitelio dei tubuli renali (*Figura 5, riquadro D e figura 6*).



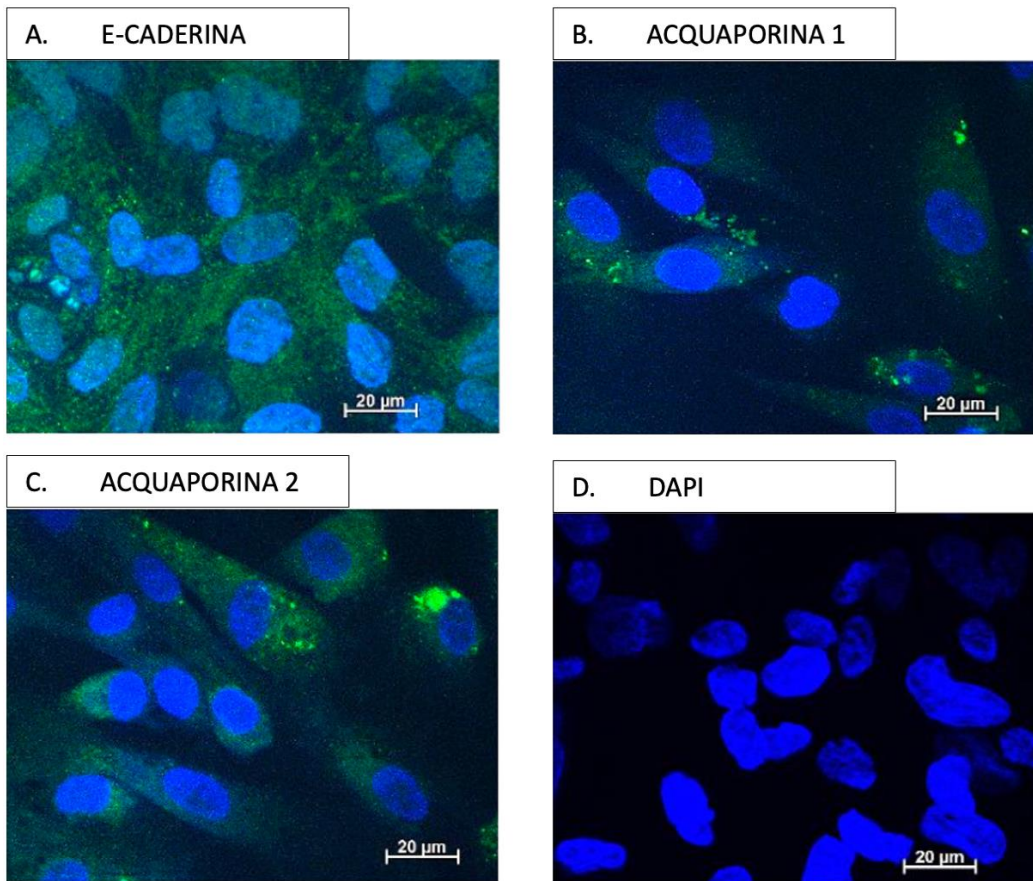
*Figura 5. La Microscopia Elettronica a Trasmissione (TEM) è stata utilizzata per fornire informazioni morfologiche sulle cellule al quarto passaggio di coltura. Pannelli (A-C): morfologia, depositi intracellulari di glicogeno e organelli delle URECs di un paziente con GSD1a; pannelli (D-F): morfologia, organelli e ciglia delle URECs di un soggetto di controllo*



*Figura 6. Strutture ciliari di URECs ottenute da pazienti con GSD1a (particolare)*

Inizialmente è stata osservata una differenza nel tempo impiegato per la formazione delle colonie di URECs: quelle dei soggetti GSD1a hanno richiesto meno tempo rispetto a quelle dei controlli sani (in media 12,6 giorni contro 17 giorni). Tuttavia, nei passaggi successivi, il tempo necessario perché le cellule raggiungessero la confluenza e potessero essere suddivise in un rapporto di 1:2 è risultato analogo, con una media di 5 giorni per entrambi i gruppi.

Per analizzare le caratteristiche dei monostrati epiteliali, abbiamo verificato l'espressione delle giunzioni aderenti (E-caderina), e dei marcatori di origine tubulare (acquaporine 1 e 2). Entrambi i gruppi, URECs GSD1a e controlli sani (questi ultimi non illustrati), hanno mostrato una colorazione positiva con tutti i marcatori (*Figura 7, 8 e 9 segnale in verde*). Poiché l'approccio sperimentale non era focalizzato su specifici segmenti dei nefroni, abbiamo identificato una varietà di cellule epiteliali renali, come confermato dalla presenza simultanea di cellule positive per l'acquaporina 1 (*Figura 7, riquadro B e figura 8*) e 2 (*figura 7, riquadro C e figura 8*).



*Figura 7. Microscopia a immunofluorescenza delle URECs GSD1a colorate con E-caderina (verde, pannello A), un marcatore delle giunzioni aderenti epiteliali; con Aquaporina-1 (AQP1, verde, pannello B), un marcatore del tubulo prossimale renale; con Aquaporina-2 (AQP2, verde, pannello C), un marcatore del dotto collettore. I nuclei cellulari sono stati controcolorati con DAPI (blu, pannello D). Barra di scala, 20 µm.*



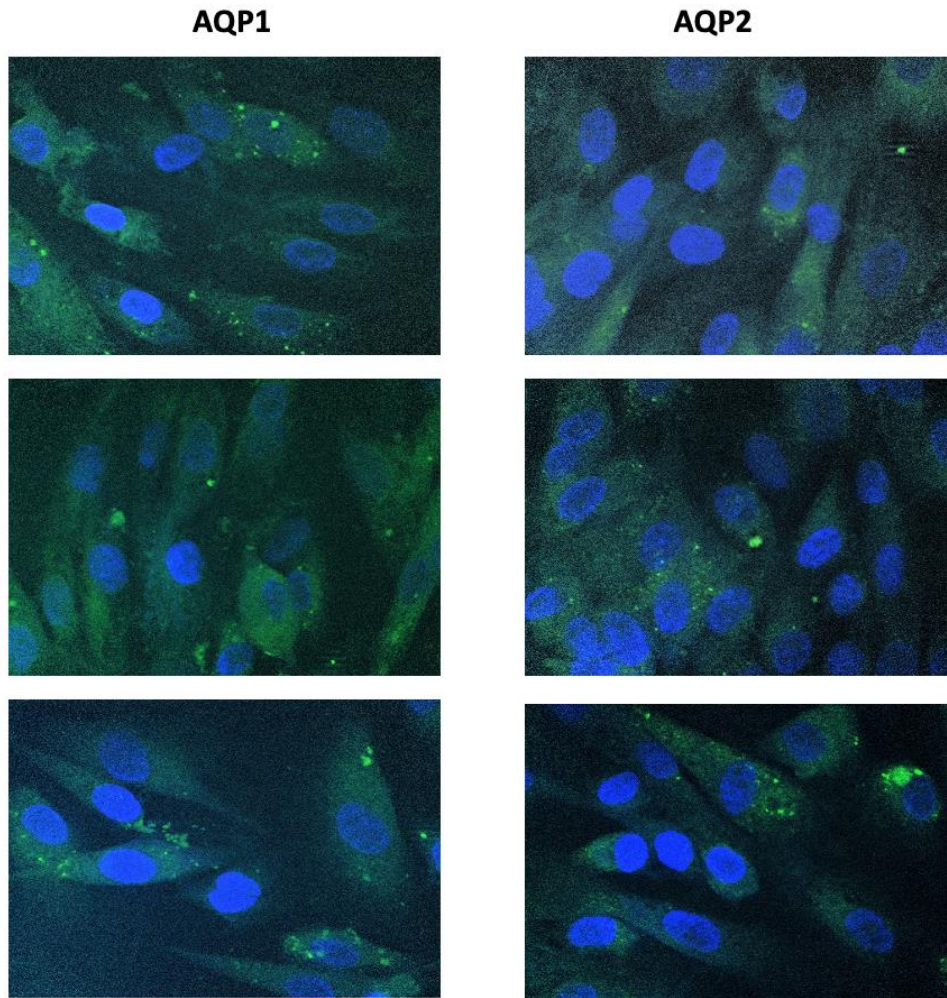


Figura 8. Espressione di Acquaporina 1 (marcatore del tubulo prossimale renale) e Acquaporina 2 (marcatore del dotto collettore) nelle cellule epiteliali derivate dall'urina di pazienti con GSD1a.

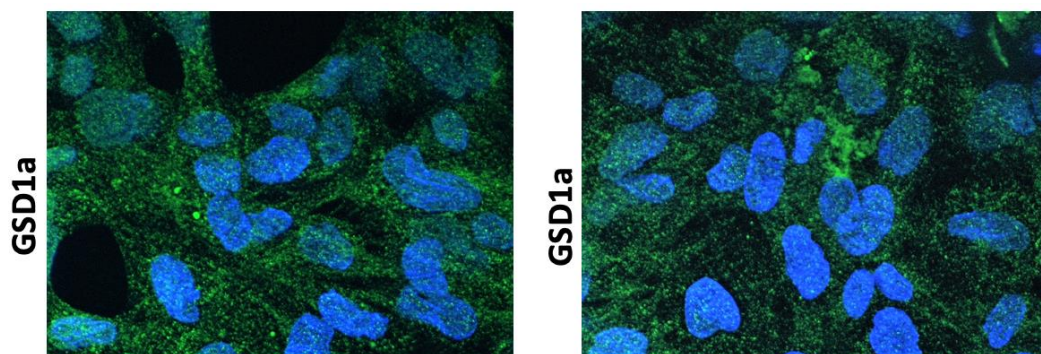


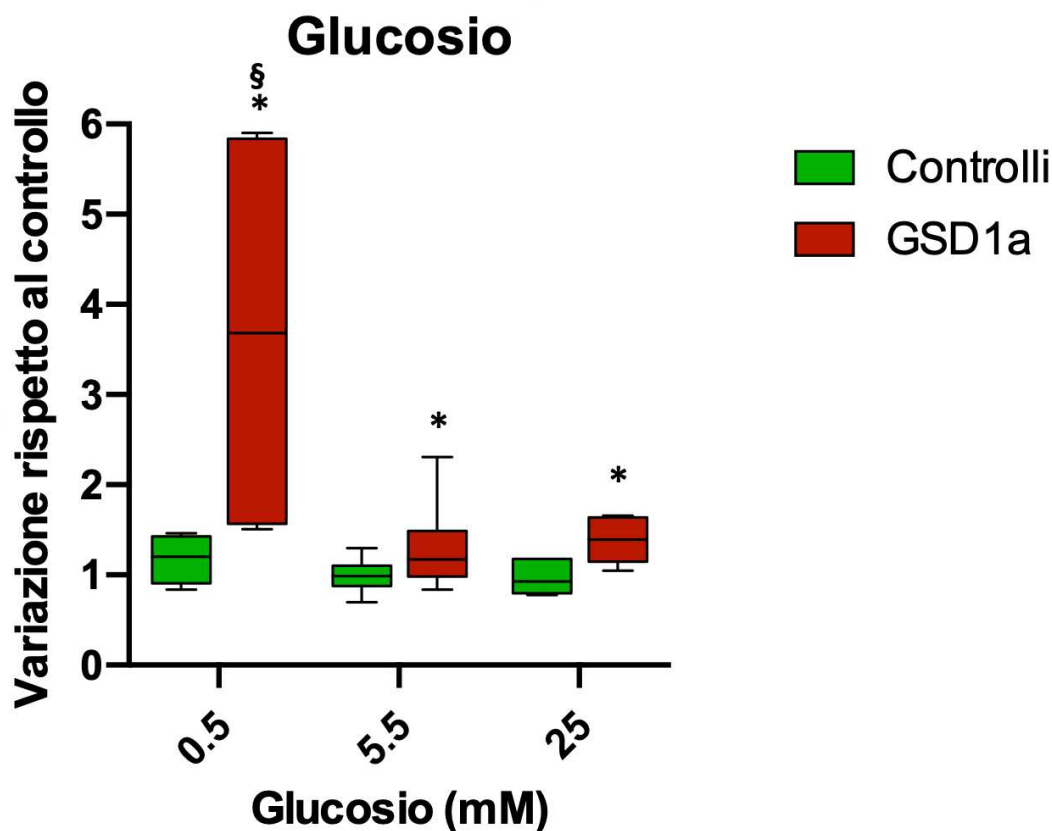
Figura 9. Espressione del marcatore delle giunzioni epiteliali E-caderina (in verde) nelle cellule epiteliali derivate dall'urina di pazienti con GSD1a.

## 6.2 ANALISI DEI ROS NELLE URECs DEI PAZIENTI CON GSD1a

Utilizzando la fluorosonda DCFDA per misurare i livelli di ROS a diverse concentrazioni di glucosio, abbiamo evidenziato che le URECs GSD1a ( $n = 3$ ) presentavano in tutti i casi livelli di ROS superiori rispetto alle URECs dei controlli (*figura 10*):

- a bassa concentrazione di glucosio (0,5 mM): variazione rispetto al controllo:  $3,7 \pm 0,9$ ,  $p = 0,03$ ;
- a concentrazione fisiologica di glucosio (5,5 mM): variazione rispetto al controllo:  $1,3 \pm 0,1$ ,  $p = 0,007$ ;
- ad alta concentrazione di glucosio (25 mM): variazione rispetto al controllo:  $1,4 \pm 0,1$ ,  $p = 0,01$ .

A basso contenuto di glucosio, le cellule provenienti dai pazienti GSD1a avevano livelli più elevati di ROS ( $p < 0,001$ ) rispetto alle cellule GSD1a coltivate a glucosio fisiologico (5,5 mM) e alto (25 mM). (*figura 10*)



*Figura 10. Quantificazione dei livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nelle URECs provenienti da pazienti GSD1a ( $n = 3$ ) e soggetti di controllo ( $n = 3$ ). I ROS*

*sono stati misurati dopo 24 ore di incubazione delle cellule in diverse condizioni di glucosio: basso (0,5 mM), fisiologico (5,5 mM) e alto (25 mM). I valori ottenuti sono riportati come media  $\pm$  DS di almeno 3 repliche tecniche. La significatività statistica è stata verificata tramite t-test non accoppiato. \*  $p < 0,05$  cellule GSD1a vs. cellule di controllo; §  $p < 0,001$  cellule GSD1a a basso glucosio (0,5 mM) vs. cellule GSD1a a glucosio fisiologico (5,5 mM) e alto (25 mM).*

## 7. DISCUSSIONE

I pazienti affetti da GSD1a accumulano glicogeno non solo nel fegato, ma anche nei reni e presentano una patologia simile alla nefropatia diabetica, che può progredire fino all'insufficienza renale [23]. Inizialmente, il problema si manifesta attraverso una iperfiltrazione glomerulare che successivamente evolve in microalbuminuria. Con l'avanzare della condizione, si passa dalla microalbuminuria alla proteinuria: se non correttamente gestita, può portare all'insufficienza renale [20]. Istologicamente è stata osservata glomerulosclerosi focale segmentaria e fibrosi interstiziale. La maggior parte dei pazienti di età superiore ai 25 anni presentano microalbuminuria e oltre il 50% proteinuria [24]. Nei modelli animali con delezione specifica per il rene di G6Pase, è stata osservata una nefropatia ad insorgenza precoce [25] con un incremento dei livelli di stress ossidativo dovuto all'attivazione dei sistemi dell'angiotensina II e del TGF- $\beta$ 1 [17].

Il nostro studio rappresenta la prima dimostrazione riportata in letteratura della possibilità di coltivare le URECs derivanti da pazienti affetti da GSD1a fino al quarto passaggio, preservando le loro specificità biologiche. Queste cellule continuano a immagazzinare glicogeno e manifestano sia marcatori distintivi come E-caderina e acquaporine 1 e 2, sia strutture peculiari, come le ciglia, proprie delle cellule epiteliali renali.

Abbiamo optato per l'implementazione di questo modello umano ex vivo, focalizzato sulla GSD1a poiché è possibile ottenere le URECs in maniera non invasiva. Data la frequente manifestazione di complicanze renali nella GSD1a, le URECs offrono una preziosa opportunità per esplorare le funzionalità delle cellule epiteliali renali associate a questa patologia genetica. La versatilità di questo modello cellulare lo rende anche appropriato per altre malattie metaboliche rare che presentano una caratteristica manifestazione renale [88, 89, 90].

Come primo obiettivo di questo studio, abbiamo testato l'ipotesi che le URECs, derivanti da pazienti con GSD1a, possano fungere da modello sperimentale per analizzare gli effetti dell'accumulo anomalo di glicogeno, in risposta a variazioni di

uno stimolo metabolico (concentrazioni di glucosio), sui livelli di ROS nelle cellule epiteliali renali. La nostra attenzione si è rivolta verso i ROS, dato che studi precedenti su topi hanno evidenziato un incremento dello stress ossidativo renale associato a una delezione selettiva del gene G6Pase [17]. La caratterizzazione funzionale di queste cellule primarie ha messo in luce peculiarità metaboliche direttamente correlate alla genetica della GSD1a.

Sia le cellule ottenute da pazienti con GSD1a, sia quelle ottenute da controlli sono in grado di rispondere a modifiche della concentrazione del glucosio modulando la produzione di ROS. Inoltre, le URECs ottenute da pazienti con GSD1a presentano livelli superiori di ROS a tutte le concentrazioni di glucosio rispetto alle cellule ottenute dai controlli. E' interessante notare che i livelli di ROS risultano più elevati nelle cellule GSD1a esposte a basse concentrazioni di glucosio (0,5 mM), condizione che rispecchia la situazione metabolica di pazienti GSD1a. Quest'ultimi infatti non riescono a garantire l'euglicemia mobilizzando le scorte di glicogeno, a causa dell'inattività dell'enzima G6Pase [74].

L'uso di cellule epiteliali dei tubuli renali isolate da campione di urina (URECs) come modello cellulare per lo studio dei meccanismi molecolari che portano allo sviluppo di danno renale nella GSD1a presenta numerosi vantaggi rispetto all'utilizzo di un modello animale:

- **Affidabilità:** le URECs derivano direttamente da individui umani, il che significa che riflettono più da vicino la biologia umana rispetto a un modello animale. Questo è particolarmente importante nelle malattie genetiche, dove piccole differenze genetiche tra specie possono portare a risultati sperimentali molto diversi.
- **Semplicità ed Efficienza:** La coltura cellulare è generalmente meno costosa e più rapida rispetto agli studi sugli animali.
- **Riduzione della Variabilità:** A differenza degli organismi viventi, che presentano una notevole variabilità in risposta agli stimoli, le cellule in coltura sono più controllate e possono offrire risultati più coerenti. Inoltre, Alcune specie animali possono non manifestare sintomi o risposte molecolari simili a quelli umani per una determinata patologia, portando a possibili interpretazioni errate o fuorvianti.

- **Considerazioni Etiche:** L'uso di colture cellulari riduce la necessità di sperimentazione animale, eliminando le preoccupazioni etiche legate all'uso di animali in ricerca.
- **Specificità dell'Organo:** Utilizzando URECs, si può studiare direttamente l'organo di interesse (il rene) e la sua risposta in condizioni patologiche.
- **Personalizzazione della ricerca:** Se le URECs vengono raccolte da pazienti specifici, possono essere utilizzate per studi personalizzati, ad esempio, per valutare la risposta del paziente a determinati trattamenti.
- **Studi su grande scala:** È possibile espandere le colture di URECs in laboratorio per ottenere un grande numero di cellule, rendendole ideali per studi su larga scala o screening di farmaci.

Sono presenti anche diversi vantaggi rispetto all'utilizzo di cellule staminali pluripotenti indotte umane (iPSC):

- **Fonte Non Invasiva:** La principale attrattiva delle URECs è la loro origine. Esse possono essere ottenute da campioni di urina, con riduzione del disagio per il paziente e dei rischi associati al prelievo di tessuti.
- **Rilevanza Diretta:** Le cellule epiteliali dei tubuli renali sono le vere cellule bersaglio in molte malattie renali. Pertanto, utilizzare queste cellule fornisce un contesto biologico più diretto e pertinente per studiare la fisiopatologia renale.
- **Tempi e costi:** La differenziazione delle iPSCs in un tipo cellulare specifico può essere un processo lungo e costoso. L'uso di URECs, essendo già un tipo cellulare differenziato, può ridurre il tempo e i costi associati alla generazione di un modello cellulare.
- **Minore complessità:** La generazione delle iPSCs e la loro successiva differenziazione richiedono una tecnologia avanzata e competenze specializzate. D'altro canto, l'isolamento e la coltura delle URECs risultano essere relativamente più semplici.
- **Conservazione delle caratteristiche cellulari:** Dal momento che le URECs sono direttamente isolate dai pazienti, tendono a conservare le caratteristiche molecolari e fisiologiche specifiche della patologia da cui è

affetto il paziente, offrendo un modello più autentico per lo studio della malattia.

Tuttavia, è importante notare che ci sono anche degli svantaggi nell'utilizzo delle cellule epiteliali dei tubuli renali, come la limitata capacità di proliferazione e la potenziale perdita di fenotipo in coltura. Inoltre, le iPSCs offrono il vantaggio di essere potenzialmente illimitate, geneticamente modificabili e in grado di modellare molteplici stadi della malattia o di essere differenziate in vari tipi di cellule. La scelta del modello cellulare dipenderà, perciò dagli obiettivi specifici della ricerca e dalla malattia specifica in esame.

Il principale limite di questo studio è rappresentato proprio dalla sua novità, in quanto richiede ovviamente ulteriori conferme e va consolidato, sia dal nostro gruppo di ricerca, sia da eventuali altri gruppi.

Infine, come sempre, esiste una notevole differenza tra le condizioni controllate di un laboratorio e la complessità biologica di un corpo umano. Sebbene si possano identificare determinati meccanismi molecolari di danno renale in vitro, non è automatico presupporre che questi riflettano con precisione la realtà clinica di un paziente. La traduzione dei risultati dal laboratorio alla clinica rimane uno degli ostacoli più ardui nella ricerca biomedica.

È fondamentale quindi che vengano intrapresi ulteriori studi non solo per consolidare la metodica descritta, ma anche per confermare, approfondire ed estendere le osservazioni fatte.

Questo nuovo modello sperimentale può diventare uno strumento prezioso in studi prospettici osservazionali sul singolo paziente o su popolazioni, per esplorare i meccanismi fisiopatologici e monitorare l'evoluzione dell'interessamento renale nell'ambito della GSD1a, ma anche di altre malattie rare del metabolismo.

Infine, potrebbe essere utilizzato come piattaforma per testare la sicurezza e l'efficacia di interventi farmacologici, anche personalizzati, vista la difficoltà ad eseguire studi clinici di intervento terapeutico su popolazioni così esigue, fornendo informazioni importanti per lo sviluppo di nuovi trattamenti.

## **8. CONCLUSIONI**

In conclusione, la comprensione dettagliata dei meccanismi molecolari alla base delle alterazioni metaboliche della GSD1a nelle cellule renali rappresenta ancora un terreno in gran parte inesplorato.

Il nostro studio rappresenta la prima dimostrazione che le URECs ottenute da pazienti con GSD1a e coltivate in vitro, mantengono le proprie caratteristiche morfologiche e funzionali e potrebbero rappresentare un modello sperimentale promettente per studiare le complicanze renali della GSD1a, in particolare i meccanismi molecolari che portano al danno renale.



## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Morava E, Rahman S, Peters V et al.: Quo vadis: the redefinition of ‘inborn metabolic diseases’. *J Inherit Metab Dis* 2015; 38: 1003–1006
2. Van Karnebeek CDM, Wortmann SB, Tarailo-Graovac M et al (2018) The role of the clinician in the multi-omics era: are you ready. *J Inherit Metab Dis* 41:571–582
3. Ferreira CR, Rahman S, Zschocke J: An international classification of inherited metabolic disorders (ICIMD). *J Inherit Metab Dis* 2021; 44(1) :164–177
4. Saudubray JM, Mochel F, Lamari F, Garcia-Cazorla A: Proposal for a simplified classification of IMD based on a patho- physiological approach: a practical guide for clinicians. *J Inherit Metab Dis* 2019, 42: 706–727
5. Oldfors A (2017) Is Glycogenin essential for glycogen synthesis? *Cell Metab* 26(1):12–14.
6. Walter JH, Labrune P, Laforét P: The Glycogen Storage Diseases and Related Disorders. In: *Inborn Metabolic Diseases*. Saudubray J, Baumgartner MR, Garcia-Cazorla A', Walter JH eds. Springer Publ, Berlin 2022, pp 179-200
7. Chen YT: Glycogen storage diseases. In: *The Metabolic Bases of Inherited Disease*. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. eds McGraw-Hill Publ, New-York, 2000 pp 1521-1551
8. Ekstein J, Rubin BY, Anderson SL, Weinstein DA, Bach G, Abeliovich D, Webb M, Risch N: Mutation frequencies for glycogen storage disease Ia in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Med Genet A* 2004, 129:162-164
9. Derks TGJ, Rodriguez-Buritica DF, Ahmad A, de Boer F, Couce ML, Grünert SC, Labrune P, López Maldonado N, Fischinger Moura de Souza C, Riba-Wolman R; et al.; Glycogen Storage Disease Type Ia: Current Management Options, Burden and Unmet Needs. *Nutrients* 2021; 13: 3828
10. Kovacevic A, Ehrlich R, Mayatepek E, Wendel U, Schwahn B: Glycogen storage disease type Ib without hypoglycemia. *Mol Genet Metab* 2007; 90: 349-350
11. Bandsma RH, Smit GP, Kuipers F: Disturbed lipid metabolism in glycogen storage disease type 1. *Eur J Pediatr* 2002; 161(Suppl.1): S65-S69
12. Smit GPA, Rake JP, Akman HO, DiMauro S: The Glycogen-Storage Diseases and Related Disorders “Liver glycogenoses”. In: *Inborn Metabolic Diseases*. Fernandes J, Saudubray JM, van den Berghe G, and Walter JH. eds Springer Medizin Verlag Publ, Heidelberg, 2006 pp 101-112
13. Zucman-Rossi J, Jeannot E, Nhieu JT, Scoazec JY, Guettier C, Rebouissou S, Bacq Y, Leteurtre E, Paradis V, Michalak S, Wendum D, Chiche L, Fabre M, Mellottee

- L, Laurent C, Partensky C, Castaing D, Zafrani ES, Laurent-Puig P, Balabaud C, Bioulac-Sage P: Genotype-phenotype correlation in hepatocellular adenoma: new classification and relationship with HCC. *Hepatology* 2006; 43: 515-524
14. Kishnani PS, Chuang TP, Bali D, Koeberl D, Austin S, Weinstein DA, Murphy E, Chen YT, Boyette K, Liu CH, Chen YT, Li LH: Chromosomal and genetic alterations in human hepatocellular adenomas associated with type Ia glycogen storage disease. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 4781-4790
  15. Di Rocco M, Calevo MG, Taro M, Melis D, Allegri AE, Parenti G: Hepatocellular adenoma and metabolic balance in patients with type Ia glycogen storage disease. *Mol Genet Metab* 2008; 93: 398-402
  16. Kim SY, Chen LY, Yiu WH, Weinstein DA, Chou JY: Neutrophilia and elevated serum cytokines are implicated in glycogen storage disease type Ia. *FEBS Letters* 2007; 581: 3833-3838
  17. Yiu WH, Mead PA, Jun HS, Mansfield BC, Chou JY: Oxidative stress mediates nephropathy in type Ia glycogen storage disease. *Lab Invest* 2010; 90: 620-629
  18. Pizzo CJ: Type I glycogen storage disease with focal nodular hyperplasia of the liver and vasoconstrictive pulmonary hypertension. *Pediatrics* 1980; 65: 341-343.
  19. Lee PJ: Glycogen storage disease type I: pathophysiology of liver adenomas. *Eur J Pediatr* 2002; 161(Suppl.1): S46-S49
  20. Rake JP, Visser G, Labrune P, Leonard JV, Ullrich K, Smit GP: Glycogen storage disease type I: diagnosis, management, clinical course and outcome. Results of the European Study on Glycogen Storage Disease Type I (ESGSD I). *Eur J Pediatr* 2002; 161(Suppl.1): S20-S34
  21. Laumonier H, Bioulac-Sage P, Laurent C, Zucman-Rossi J, Balabaud C, Trillaud H: Hepatocellular adenomas: magnetic resonance imaging features as a function of molecular pathological classification. *Hepatology* 2008; 48: 808-818
  22. Pozzato C, Dall'Asta C, Radaelli G, Torcoletti M, Formenti A, Riva E, Cornalba G, Pontiroli AE: Usefulness of chemical MRI in discriminating increased liver echogenicity in glycogenosis. *Dig Liver Dis* 2007; 39: 1018-1023.
  23. Yiu WH, Pan CJ, Ruef RA; Peng WT, Starost MF, Mansfield BC, Chou JY: Angiotensin Mediates Renal Fibrosis in the Nephropathy of Glycogen Storage Disease Type Ia. *Kidney Int* 2008; 73: 716–723
  24. Visser G, Rake J, Labrune P, Leonard J, Moses S, Ullrich K, Wendel U, Smit P: Consensus Guidelines for Management of Glycogen Storage Disease Type 1b—European Study on Glycogen Storage Disease Type 1. *Eur J Pediatr* 2002; 161(Suppl. S1): S120–S123

25. Clar J, Gri B, Calderaro J, Birling MC, Hérault Y, Smit GPA, Mithieux G, Rajas F: Targeted Deletion of Kidney Glucose-6 Phosphatase Leads to Nephropathy. *Kidney Int* 2014, 86: 747–756
26. Weinstein DA, Somers MJ, Wolfsdorf H: Decreased urinary citrate excretion in type Ia glycogen storage disease. *J Pediatr* 2001; 138: 378-382
27. Scales CD, Chandrashekar AS, Robinson MR, Cantor DA, Sullivan J, Haleblan GE, Leitao VA, Sur RL, Borawski KM, Koeber D, Kishnani PS: Stone formation risk factors in patients with type Ia glycogen storage disease. *J Urol* 2010; 183: 1022-1025
28. Melis D, Parenti G, Gatti R, Casa RD, Parini R, Riva E, Burlina AB, Vici CD, Di Rocco M, Furlan F, Torcoletti M, Papadia F, Donati A, Benigno V, Andria G: Efficacy of ACE-inhibitor therapy on renal disease in glycogen storage disease type 1: a multicentre retrospective study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005; 63: 19-25
29. Kikuchi M, Hasegawa K, Handa I, Watabe M, Narisawa K, Tada K: Chronic pancreatitis in a child with glycogen storage disease type 1. *Eur J Pediatr* 1991; 150: 852-853
30. Talente GM, Coleman RA, Alter C, Baker L, Brown BI, Cannon RA, Chen YT, Crigler JF, Ferreira P, Haworth JC, Herman GE, Issenman RM, Keating JP, Linde R, Roe TF, Senior B, Wolfsdorf JI: Glycogen storage disease in adults. *Ann Intern Med* 1994; 120: 218-226
31. Ubels FL, Rake JP, Slaets JP, Smit GP, Smit AJ: Is glycogen storage disease 1a associated with atherosclerosis? *Eur J Pediatr* 2002; 161(Suppl.1): S62-S64.
32. Wittenstein B, Klein M, Finckh B, Ullrich K, Kohlschutter A: Radical trapping in glycogen storage disease 1a. *Eur J Pediatr* 2002; 161(Suppl.1): S70-S74
33. Nguyen AD, Pan CJ, Weinstein DA, Chou JY: Increased scavenger receptor class B type I-mediated cellular cholesterol efflux and antioxidant capacity in the sera of glycogen storage disease type Ia patients. *Mol Genet Metab* 2006; 89: 233-238
34. Bernier AV, Correia CE, Haller MJ, Theriaque DW, Shuster JJ, Weinstein DA: Vascular dysfunction in glycogen storage disease type I. *J Pediatr* 2009; 154: 588-591
35. Cohen JL, Vinik A, Faller J, Fox IH: Hyperuricemia in glycogen storage disease type I: contributions by hypoglycemia and hyperglucagonemia to increased urate production. *J Clin Invest* 1985; 75: 251-257
36. Nuoffer JM, Mullis PE, Wiesmann UN: Treatment with low-dose diazoxide in two growth-retarded prepubertal girls with glycogen storage disease type Ia resulted in catch-up growth. *J Inherit Metab Dis* 1997; 20: 790-798

37. Däublin G, Schwahn B, Wendel U: Type I glycogen storage disease: favourable outcome on a strict management regimen avoiding increased lactate production during childhood and adolescence. *Eur J Pediatr* 2002; 161(Suppl.1): S40-S45
38. Melis D, Pivonello R, Parenti G, Della Casa R, Salerno M, Lombardi G, Sebastio G, Colao A, Andria G: Increased prevalence of thyroid autoimmunity and hypothyroidism in patients with glycogen storage disease type I. *J Pediatr* 2007; 150: 300-305
39. Lee PJ, Patel JV, Fewtrell M, Leonard JV, Bishop NJ: Bone mineralisation in type 1 glycogen storage disease. *Eur J Pediatr* 1995; 154: 483-487
40. Schönau E, Schwahn B, Rauch F: The muscle-bone relationship: methods and management - perspectives in glycogen storage disease. *Eur J Pediatr* 2002; 161(Suppl.1): S50-S52
41. Humbert M, Labrune P, Simonneau G: Severe pulmonary arterial hypertension in type 1 glycogen storage disease. *Eur J Pediatr* 2002; 161(Suppl.1): S93-S96.
42. Humbert M, Labrune P, Sitbon O, Le Gall C, Callebert J, Hervé P, Samuel D, Machado R, Trembath R, Drouet L, Launay JM, Simonneau G: Pulmonary arterial hypertension and type-I glycogen-storage disease: the serotonin hypothesis. *Eur Respir J* 2002; 20: 59-65.
43. de Parscau L, Guibaud P, Labrune P, Odièvre M: Evolution à long terme des glycoséoses hépatiques. Etude rétrospective de 76 observations. *Arch Fr Pediatr* 1988; 45: 641-645
44. Smit GPA: The long-term outcome of patients with glycogen storage disease type Ia. *Eur J Pediatr* 1993; 152(Suppl.1): S52-S55
45. Lei KJ, Shelly LL, Pan CJ, Sidbury JB, Chou JY: Mutations in the glucose-6-phosphatase gene that cause glycogen storage disease type 1a. *Science* 1993; 262: 580-583
46. van de Werve G, Lange A, Newgard C, Méchin MC, Li Y, Berteloot A: New lessons in the regulation of glucose metabolism taught glucose-6-phosphate system. *Eur J Biochem* 2000; 267: 1533-1549
47. Human Gene Mutation Database. <http://www.hgmd.cf.ac.uk>.
48. Kure S, Hou DC, Suzuki Y, Yamagishi A, Hiratsuka M, Fukuda T, Sugie H, Kondo N, Matsubara Y, Narisawa K: Glycogen storage disease type Ib without neutropenia. *J Pediatr* 2000; 137: 253-256
49. Chen LY, Lin B, Pan CJ, Hiraiwa H, Chou JY: Structural requirements for the stability and microsomal transport activity of the glucose 6-phosphate transporter. *J Biol Chem* 2000; 275: 34280-34286

50. Qui WJ, Gu XF, Ye J, Han LSh, Zhang YF, Liu XQ: Molecular genetic analysis of glycogen storage disease type Ia in 26 Chinese patients. *J Inherit Metab Dis* 2003; 26: 811-812
51. Angaroni CJ, de Kremer RD, Argarana CE, Paschini-Capra AE, Giner-Ayala AN, Pezza RJ, Pan CJ, Chou JY: Glycogen storage disease type Ia in Argentina: two novel glucose-6-phosphatase mutations affecting protein stability. *Mol Genet Metab* 2004; 83: 276-279
52. Ki CS, Han SH, Kim HJ, Lee SG, Kim EJ, Kim JW, Choe YH, Seo JK, Chang YJ, Park JY: Mutation spectrum of the glucose-6-phosphatase gene and its implication in molecular diagnosis of Korean patients with glycogen storage disease type Ia. *Clin Genet* 2004; 65: 487-489
53. Chou JY, Mansfield BC: Mutations in the glucose-6-phosphatase-alpha (G6PC) gene that cause type Ia glycogen storage disease. *Hum Mutat* 2008; 29: 921-930
54. Barkaoui E, Cherif W, Tebib N, Charfeddine C, Ben Rhouma F, Azzouz H, Ben Chehida A, Monastiri K, Chemli J, Amri F, Ben Turkia H, Abdelmoula MS, Kaabachi N, Abdelhak S, Ben Dridi MF: Mutation spectrum of glycogen storage disease type Ia in Tunisia: implication for molecular diagnosis. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30: 989
55. Shieh JJ, Terzioglu M, Hiraiwa H, Marsh J, Pan CJ, Chen LY, Chou JY: The molecular basis of glycogen storage disease type 1a: structure and function analysis of mutations in glucose-6-phosphatase. *J Biol Chem* 2002; 277: 5047-5053
56. Matern D, Seydewitz HH, Bali D, Lang C, Chen YT: Glycogen storage disease type I: Diagnosis and phenotype/genotype correlation. *Eur J Pediatr* 2002; 161(Suppl.1): S10-S19
57. Nakamura T, Ozawa T, Kawasaki T, Nakamura H, Sugimura H: Glucose-6-phosphatase gene mutations in 20 adult Japanese patients with glycogen storage disease type 1a with reference to hepatic tumors. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 1402-1408
58. Kishnani PS, Austin SL, Abdenur JE, Arn P, Bali DS, Boney A, Chung WK, Dagli AI, Dale D, Koeberl D, Somers MJ, Wechsler SB, Weinstein DA, Wolfsdorf JL, Watson MS; American College of Medical Genetics and Genomics. 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-e29
59. Wolf B, Freehauf CL, Thomas JA, Gordon PL, Greene CL, Ward JC: Markedly elevated serum biotinidase activity may indicate glycogen storage disease type Ia. *J Inherit Metab Dis* 2003; 26: 805-809

60. Chen LY, Pan CJ, Shieh JJ, Chou JY: Structure-function analysis of the glucose-6-phosphate transporter deficient in glycogen storage disease type Ib. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 3199-3207
61. Maire I, Baussan C, Moatti N, Mathieu M, Lemonnier A: Biochemical diagnosis of hepatic glycogen storage diseases: 20 years French experience. *Clin Biochem* 1991; 24: 169-178
62. Qu Y, Abdenur JE, Eng CM, Desnick RJ: Molecular prenatal diagnosis of glycogen storage disease type Ia. *Prenat Diagn* 1996; 15: 333-336
63. Wong LJ: Prenatal diagnosis of glycogen storage disease type Ia by direct mutation detection. *Prenatal Diagn* 1996; 16: 105-108
64. Lam CW, Sin SY, Lau ET, Lam YY, Poon P, Tong SF: Prenatal diagnosis of glycogen storage disease type Ib using denaturing high performance liquid chromatography. *Prenat Diagn* 2000; 20: 765-768
65. Weinstein DA, Wolfsdorf JI: Effect of continuous glucose therapy with uncooked cornstarch on the long-term clinical course of type 1a glycogen storage disease. *Eur J Pediatr* 2002; 161(Suppl.1): S35-S39
66. Bhattacharya K, Orton RC, Mundy H, Morley DW, Champion MP, Eaton S, Tester RF, Lee PJ: A novel starch for the treatment of glycogen storage diseases. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30: 350-357
67. Correia CE, Bhattacharya K, Lee PJ, Shuster JJ, Theriaque DW, Shankar MN, Smit GP, Weinstein DA: Use of modified cornstarch therapy to extend fasting in glycogen storage disease types Ia and Ib. *Am J Clin Nutr* 2008; 88: 1272-1276
68. Saunders AC, Feldman HA, Correia CE, Weinstein DA: Clinical evaluation of a portable lactate meter in type I glycogen storage disease. *J Inherit Metab Dis* 2005; 28: 695-701
69. Moses SW: Historical highlights and unsolved problems in type 1. *Eur J Pediatr* 2002; 161(Suppl.1): S2-S9
70. Labrune P, Trioche P, Duvaltier I, Chevalier P, Odièvre M: Hepatocellular adenomas in glycogen storage disease type I and III: a series of 43 patients and review of the literature. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997; 24: 276-279
71. Bianchi L: Glycogen storage disease I and hepatocellular tumours. *Eur J Pediatr* 1993; 152(suppl.1): S63-S70
72. Franco LM, Krishnamurthy V, Bali D, Weinstein DA, Arn P, Clary B, Boney A, Sullivan J, Frush DP, Chen YT, Kishnani PS: Hepatocellular carcinoma in glycogen storage disease type Ia: a case series. *J Inherit Metab Dis* 2005; 28: 153-162

73. Reddy SK, Kishnani PS, Sullivan JA, Koeberl DD, Desai DM, Skinner MA, Rice HE, Clary BM: Resection of hepatocellular adenoma in patients with glycogen storage disease type Ia. *J Hepatol* 2007; 47: 658-663
74. Froissart R, Piraud M, Boudjemline AM, Vianey-Saban C, Petit F, Hubert-Buron A, Eberschweiler PT, Gajdos V, Labrune P: Glucose-6-phosphatase deficiency. *Orphanet J Rare Dis.* 2011; 6: 27-38
75. Labrune P: Glycogen storage disease type I: indications for liver and/or kidney transplantation. *Eur J Pediatr* 2002; 161(Suppl.1): S53-S55
76. Reddy SK, Austin SL, Spencer-Manzon M, Koeber DD, Clary BM, Desai DM, Smith AD, Kishnani PS: Liver transplantation for glycogen storage disease type Ia. *J Hepatol* 2009; 51: 483-490
77. Iyer SG, Chen CL, Wang CC, Wang SH, Concejero AM, Liu YW, Yang CH, Yong CC, Jawan B, Cheng YF, Eng HL: Long-term results of living donor liver transplantation for glycogen storage disorders in children. *Liver Transpl* 2007; 13: 848-852
78. Davis MK, Weinstein DA: Liver transplantation in children with glycogen storage disease: controversies and evaluation of the risk/benefit of this procedure. *Pediatr Transplant* 2008; 12: 137-145
79. Muraca M, Burlina AB: Liver and liver cell transplantation for glycogen storage disease type IA. *Acta Gastroenterol Belg* 2005; 68: 469-472
80. Panaro F, Andorno E, Basile G, Morelli N, Bottino G, Fontana I, Bertocchi M, Di Domenico S, Miggino M, Saltalamacchia L, Ghinolfi D, Bonifazio L, Jarzembowski TM, Valente U: Simultaneous liver kidney transplantation for glycogen storage disease type Ia (von Gierke's disease). *Transplant Proc* 2004; 36: 1483-1484
81. Martin AP, Bartels M, Schreiber S, Buehrdel P, Hauss J, Fangmann J: Successful staged kidney and liver transplantation for glycogen storage disease type Ib: a case report. *Transplant Proc* 2006; 38: 3615-3619
82. Hijmans BS, Boss A, van Dijk TH, Soty M, Wolters H, Mutel E, Groen AK, Derks TGJ, Mithieux G, Heerschap A, et al.: Hepatocytes Contribute to Residual Glucose Production in a Mouse Model for Glycogen Storage Disease Type Ia. *Hepatology* 2017; 66: 2042-2054
83. Lei, K.; Chen, H.; Pan, C.; Ward, J.M.; Mosinger, B.; Lee, E.J.; Westphal, H.; Mansfield, B.C.; Chou, J.Y. Glucose-6-phosphatase dependent substrate transport in the glycogen storage disease type-1a mouse. *Nat. Genet.* 1996; 13: 203-209
84. Mutel, E.; Abdul-Wahed, A.; Ramamonjisoa, N.; Stefanutti, A.; Houberdon, I.; Cavassila, S.; Pilleul, F.; Beuf, O.; Gautier-Stein, A.; Penhoat, A.; et al. Targeted

- Deletion of Liver Glucose-6 Phosphatase Mimics Glycogen Storage Disease Type 1a Including Development of Multiple Adenomas. *J. Hepatol.* 2011; 54: 529–537
85. Resaz R, Vanni C, Segalerba D, Sementa AR, Mastracci L, Grillo F, Murgia D, Bosco MC; Chou JY; Barbieri O, et al.: Development of Hepatocellular Adenomas and Carcinomas in Mice with Liver-Specific  $\alpha$ -Glc6Pase Deficiency. *DMM Dis Model Mech* 2014; 7: 1083–1091
86. Rutten MGS, Derks TGJ, Huijkman NCA, Bos T, Kloosterhuis NJ, van de Kolk KCWA, Wolters JC, Koster MH, Bongiovanni L, Thomas RE, et al.: Modeling Phenotypic Heterogeneity of Glycogen Storage Disease Type 1a Liver Disease in Mice by Somatic CRISPR/CRISPR-Associated Protein 9-Mediated Gene Editing. *Hepatology* 2021; 74: 2491–2507
87. Katagami Y, Kondo T, Suga, M, Yada Y, Imamura K, Shibukawa R, Sagara Y, Okanishi Y, Tsukita K, Hirayama K, Era T, Inoue H: Generation of a Human Induced Pluripotent Stem Cell Line, BRCi009-A, Derived from a Patient with Glycogen Storage Disease Type 1a. *Stem Cell Res* 2020; 49: 102095
88. Ziegler WH, Lüdiger S, Hassan F, Georgiadis ME, Swolana K, Khera A, Mertens A, Franke D, Wohlgemuth K, Dahmer-Heath M, et al.: Primary URECs: A Source to Better Understand the Pathology of Renal Tubular Epithelia in Pediatric Hereditary Cystic Kidney Diseases. *Orphanet J Rare Dis* 2022; 17: 1-12
89. Schumann A, Belche V, Schalle, K, Grünert SC, Kaech A, Baumgartner MR, Kölker S, Hannibal L, Spiekerkoetter U: Mitochondrial Damage in Renal Epithelial Cells Is Potentiated by Protein Exposure in Propionic Aciduria. *J Inherit Metab Dis* 2021; 44; 1330–1342
90. Luciani A, Schumann A, Berquez M, Chen Z, Nieri D, Failli M, Debaix H, Festa BP, Tokonami N, Raimondi A, et al.: Impaired Mitophagy Links Mitochondrial Disease to Epithelial Stress in Methylmalonyl-CoA Mutase Deficiency. *Nat. Commun.* 2020; 11: 970
91. Slaats GG, Braun F, Hoehne M, Frech LE, Blomberg L, Benzing T, Schermer B, Rinschen MM, Kurschat CE. Urine-derived cells: a promising diagnostic tool in Fabry disease patients. *Sci Rep* 2018; 8(1):11042
92. Lenzini L, Iori E, Scannapieco F, Carraro G, Avogaro A, Vitturi N: Urine-Derived Epithelial Cells as a New Model to Study Renal Metabolic Phenotypes of Patients with Glycogen Storage Disease 1a. *Int J Mol Sci.* 2023; 24: 232-238
93. Zhou T, Benda C, Dunzinger S, Huang Y, Ho JC, Yang J, Wang Y, Zhang Y, Zhuang Q, Li Y, et al: Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells from Urine Samples. *Nat Protoc* 2012; 7: 2080–2089