

ESMERALDA EMÍLIA GOMES MARTINS

**DOENÇAS HEREDITÁRIAS DO METABOLISMO: IMPORTÂNCIA DE UM
DIAGNÓSTICO PRECOCE PARA A CRIANÇA E PARA A FAMÍLIA**

Dissertação de Candidatura ao grau de Doutor em Ciências Médicas, submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientadora - Doutora Laura Vilarinho

Investigadora

Chefe da Unidade de Rastreio Neonatal, Centro de Genética Médica Doutor Jacinto de Magalhães, INSA, IP

Co-orientadora - Professora Doutora Helena Jardim

Directora do Departamento de Criança e do Adolescente do Centro Hospitalar do Porto.

Professora Associada Convidada do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

TRABALHOS DE SUPORTE A ESTA TESE

Durante o período de elaboração desta tese foram efectuados vários trabalhos, pessoais ou em colaboração, que foram publicados em revistas internacionais e nacionais e cujos resultados servem de suporte à discussão e conclusões que aqui serão apresentadas.

Publicações internacionais:

Garcia P*, Martins E*, Diogo L, Rocha H, Marcão A, Gaspar E, Almeida M, Vaz C, Soares I, Barbot C, Vilarinho L (2008). Outcome of three cases of untreated maternal glutaric aciduria type I. *Eur J Pediatr* 167:569-73 (*Autores que contribuíram de forma igual para o trabalho).

Nogueira C, Aiello C, Cerone R, Martins E, Caruso U, Moroni I, Rizzo C, Diogo L, Leão E, Kok F, Deodato F, Schiaffino MC, Boenzi S, Danhaive O, Barbot C, Sequeira S, Locatelli M, Santorelli FM, Uziel G, Vilarinho L, Dionisi-Vici C (2008). Spectrum of MMACHC mutations in Italian and Portuguese patients with combined methylmalonic aciduria and homocystinuria, cblC type. *Mol Genet Metab* 93(4):475-80.

Quental S, Macedo-Ribeiro S, Matos R, Vilarinho L, Martins E, Teles EL, Rodrigues E, Diogo L, Garcia P, Eusébio F, Gaspar A, Sequeira S, Furtado F, Lança I, Amorim A, Prata MJ (2008). Molecular and structural analyses of maple syrup urine disease and identification of a founder mutation in a Portuguese Gypsy community. *Mol Genet Metab* 94(2):148-56.

Martins E, Santos Silva E, Vilarinho S., JM Saudubray, Vilarinho L (2010). Neonatal cholestasis: an uncommon presentation of hyperargininemia. *J Inher Metab Dis* DOI 10.1007/s10545-010-9263-7.

Quental S, Vilarinho L, Martins E, Teles EL, Rodrigues E, Diogo L, Garcia P, Eusébio F, Gaspar A, Sequeira S, Amorim A, Prata MJ (2010). Incidence of maple syrup urine disease in Portugal. *Mol Genet Metab* 100(4):385-87.

Martins E, Cardoso ML, Rodrigues E, Barbot C, Ramos A, Bennett MJ, Leão Teles E, Vilarinho L (2011). Short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: the clinical relevance of an early diagnosis and report of four new cases. *J Inher Metab Dis* 34: 835-42.

Martins E, Gaspar A, Bandeira A, Nogueira C, Brandão O, Rocha H, Cláudio M. Gomes, Vilarinho L (2011). Multiple Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency: molecular diagnosis, structural analysis and clinical correlation. Clin Genet (Submetido).

Martins E, Marcão A, Bandeira A, Fonseca H, Nogueira C, Vilarinho L (2011). Methionine adenosyltransferase I/III deficiency in Portugal: high frequency of a dominantly inherited form in a small area of Douro high lands. J Inherit Metab Dis (Aceite).

Publicações nacionais:

Rocha J, Martins E, Cabral A, Almeida MF (2007). Consenso para o tratamento nutricional da Leucínose. Acta.Pediatr Por 38: 120-28.

Martins E, Barbot C, Cardoso ML, Silva E, Vilarinho L (2008). Avaliação da efectividade do tratamento das doenças metabólicas tipo intoxicação diagnosticadas no período sintomático. Acta Pediatr Por 39:233-39.

Martins E, Bandeira A, Rocha.H, Marcão A, Vilarinho L (2009). Benefícios do rastreio neonatal nas doenças da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos. Nascer e Crescer 18:246-51.

Outras publicações:

Além dos artigos publicados durante o período de elaboração desta tese, há outros trabalhos que é importante realçar porque têm conteúdos relacionados com o âmbito deste trabalho e demonstram o tempo prolongado de contacto e estudo desta matéria.

Vaz Osório R, Vilarinho L, Pires Soares J, Almeida M, Carmona C, Martins E (1999). Programa Nacional de Diagnóstico Precoce: 20 anos de rastreio neonatal. Arq Med 13:163-68.

Cardoso ML, Leão E, Rodrigues E, Martins E, Vilarinho L (2000). Aciduria 3-hidroxi-3-metilglutárica na população portuguesa. Arq Med 14 202-06.

Rivera I, Cabral A, Almeida A, Leandro P, Carmona C, Eusebio F, Tasso T, Vilarinho L, Martins E, et al (2000). The correlation of genotype and phenotype in Portuguese hyperphenylalaninemic patients. Mol Gen Metab 69:195-03.

Cardoso M.L, Martins E, Vasconcelos R, Vilarinho L, Rocha J (2001). Identification of a novel R21X mutation in the liver-type arginase gene (ARG1) in four Portuguese patients with argininemia. Hum Mutat 14: 355-56.

Temudo T, Martins E, Poças F, Cruz R, Vilarinho L (2004). Maple syrup disease presenting as paroxysmal dystonia. *Ann Neurol* 56:749-50.

Cardoso ML, Rodrigues MR, Leão E, Martins E, Diogo L, Rodrigues E et al (2004). The E37X is a common HMGCL mutation in Portuguese patients with 3-hydroxy-3-methylglutaric CoA lyase deficiency. *Mol Gen Metab* 82:334-38.

Martins E, Santos Silva E, Cardoso ML, Barbot C, Medina M, Vilarinho L (2005). Follow-up of two cases of hyperargininemia after liver transplantation. *J Inherit Metab Dis* 2005; 28:64.

Quental S, Martins E, Vilarinho L, Amorim A, João Prata M (2008). Maple syrup urine disease due to a new large deletion at BCKDHA caused by non-homologous recombination. *J Inherit Metab Dis* DOI 10.1007/s10545-008-1046z.

AGRADECIMENTOS

O meu agradecimento sincero a todos os que contribuíram e tornaram possível a elaboração deste trabalho.

À minha orientadora Doutora Laura Vilarinho, expresso a minha gratidão pela oportunidade, entusiasmo, acompanhamento constante e pela coordenação de todo o trabalho. Conheci a Doutora Laura há cerca de 20 anos, no meu primeiro estágio de Doenças Metabólicas e a minha dívida profissional ultrapassa em muito o âmbito deste trabalho.

À Professora Helena Jardim, minha co-orientadora nesta recta final, o apreço pela confiança depositada em mim, pelos conselhos pertinentes e pela revisão crítica desta tese.

Para a Anabela Bandeira, minha companheira da Unidade de Doenças Metabólicas, com quem compartilho muito do trabalho aqui apresentado, uma palavra especial de agradecimento pela ajuda, a disponibilidade, o espírito de equipa e a amizade que muito prezo.

À Maria Luís Cardoso, que embora a 1170 km de distância, foi uma das pessoas que mais próximo estive de mim, ajudando-me com a sua amizade e conhecimento, a sua alegria e espírito crítico, nunca me deixando desistir deste trabalho.

À Dr^a Margarida Medina, sob cuja direcção tive o privilégio de trabalhar durante o meu internato de pediatria e que no início dos anos 90, me deu a conhecer a área das doenças metabólicas. O meu obrigado pelo seu exemplo pessoal e profissional, que marcaram para sempre a minha actividade e o meu respeito pelos doentes.

Aos meus colegas da unidade multidisciplinar, que me apoiam e asseguram o seguimento mais cuidadoso e mais completo destes doentes; à Ermelinda Silva, Inês Carrilho, Manuela Santos, Manuela Almeida, Júlio Rocha e Carla Carmona. O meu bem-haja a todos também pela vossa amizade.

Aos meus colegas de outros Centros de Tratamento; à Ana Gaspar, Luísa Diogo, Paula Garcia, Elisa Leão Teles e Esmeralda Rodrigues, a disponibilidade para colaborar em

trabalhos que permitiram uma abordagem nacional de algumas patologias e enriqueceram este trabalho. Um obrigado também ao Paulo Rego.

No Centro de Genética Médica, agradeço a todos aqueles que de forma pronta e nunca negada, colaboram no diagnóstico e seguimento laboratorial destes doentes.

Agradeço, de maneira muito especial, às pessoas sem as quais a fase final de elaboração desta tese não teria sido possível.

Ao avô Vítor e à Ana a elaboração da capa.

À Doutora Clara Barbot, e ao Dr Vaz Osório a leitura, as sugestões e a correcção do meu português.

À Paula Machado, os esquemas, a formatação, a paciência, a preocupação e a competência informática.

Dirijo também palavras de sincero agradecimento, aos meus doentes e familiares cuja força e coragem constituem muitas vezes, para mim, verdadeiras lições de vida que ultrapassam em muito o mero conhecimento médico.

Por fim, agradeço à minha família, pelo amor e apoio incondicional que sempre me tem dado nos meus projectos pessoais e profissionais. Um agradecimento especial ao Miguel, meu companheiro, ao meu filho Francisco e à minha mãe, meus pilares mais próximos e mais fortes.

ÍNDICE

RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
I. INTRODUÇÃO	17
1.1 - DOENÇAS HEREDITÁRIAS DO METABOLISMO – GENERALIDADES	19
1.2 - RASTREIO NEONATAL SISTEMÁTICO.....	20
1.3 - ALARGAMENTO DO RASTREIO A NOVAS PATOLOGIAS	23
1.4 - RASTREIO METABÓLICO: DESAFIOS PARA O FUTURO	44
II. OBJECTIVOS	47
III. DOENTES E MÉTODOS.....	51
IV. RESULTADOS.....	55
4.1- EVOLUÇÃO CLÍNICA FAVORÁVEL DOS DOENTES METABÓLICOS COMO CONSEQUÊNCIA DO SEU DIAGNÓSTICO PRÉ-SINTOMÁTICO OU PRECOCE	59
4.1.1- <i>Aminoacidopatias e acidúrias orgânicas.....</i>	<i>59</i>
- Avaliação da efectividade do tratamento das doenças metabólicas tipo intoxicação diagnosticadas no período sintomático	
- Consenso para o tratamento nutricional da Leucinose.	
- Neonatal cholestasis: an uncommon presentation of hyperargininemia	
4.1.2- <i>Defeitos da β-oxidação mitocondrial dos ácidos gordos.....</i>	<i>81</i>
- Benefícios do rastreio neonatal nas doenças da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos	
- Short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: the clinical relevance of an early diagnosis and report of four new cases	
- Multiple Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency: molecular diagnosis, structural analysis and clinical correlation	
4.2- IMPORTÂNCIA DO RASTREIO ALARGADO NAS FAMÍLIAS.....	113
- Outcome of three cases of untreated maternal glutaric aciduria type I	
- Methionine adenosyltransferase I/III deficiency in Portugal: high frequency of a dominantly inherited form in a small area of Douro high lands	
4.3 - INTERESSE DO ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO NAS NOVAS DOENÇAS RASTREADAS	131
- Incidence of maple syrup urine disease in Portugal	
- Molecular and structural analyses of maple syrup urine disease and identification of a founder mutation in a Portuguese Gypsy community	
- Spectrum of MMACHC mutations in Italian and Portuguese patients with combined methylmalonic aciduria and homocystinuria, cblC type	

V. DISCUSSÃO.....	151
5.1 - CONTRIBUTO DO PROGRAMA NACIONAL DE DIAGNÓSTICO PRECOCE PARA A EVOLUÇÃO CLÍNICA DOS DOENTES METABÓLICOS	153
5.1.1 - Aspectos gerais.....	153
5.1.2 - Aminoacidopatias e acidúrias orgânicas.....	154
5.1.3 - Defeitos da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos	161
5.1.4 - Monitorização bioquímica dos doentes.....	163
5.2 - IMPORTÂNCIA DO RASTREIO ALARGADO NAS FAMÍLIAS.....	164
5.3 - INTERESSE DO ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO NAS NOVAS DOENÇAS RASTREADAS.....	166
5.4 - ALARGAMENTO DO RASTREIO A NOVAS PATOLOGIAS.....	167
VI. CONCLUSÕES.....	169
VII. BIBLIOGRAFIA.....	173
VIII. ANEXOS.....	185

ABREVIATURAS MAIS UTILIZADAS NO TEXTO

3HMG	Acidúria 3-hidroxi-3-metilglutárica
AMM	Ácido metilmalónico
AP	Ácido propiónico
APOFEN	Associação Portuguesa de Fenilcetonúria e Outras Doenças Metabólicas
Arg	Arginina
BH4	Tetrahidrobiopterina
Cbl	Cobalamina
Cit	Citrulina
DHM	Doenças Hereditárias do Metabolismo
DP	Diagnóstico precoce
EIM	Erro Inato do Metabolismo
IGM	Instituto de Genética Médica
Ile	Isoleucina
LCHAD	Desidrogenase dos hidroxiácidos de cadeia longa
Leu	Leucina
MADD	Défice múltiplo das desidrogenases dos ácidos gordos
MAT I/III	Metionina adenosiltransferase
MCAD	Desidrogenase dos ácidos gordos de cadeia média
Met	Metionina
MIM	Mendelian Inheritance in Man
MS/MS	Espectrometria de massa em <i>tandem</i>
NTBC	2-(2-Nitro-4-trifluorometilbenzoil)-1-3-ciclohexanediona
Phe	Fenilalanina
PKU	Fenilcetonúria
PNDP	Programa Nacional de Diagnóstico Precoce
PNN	Período neonatal
Pro	Prolina
RN	Recém-nascidos(s)
SCHAD	Desidrogenase dos hidroxiácidos de cadeia curta
TC	Transportador da carnitina
Tyr	Tirosina

Val	Valina
VLCAD	Desidrogenase dos ácidos gordos de cadeia muito longa
X-Leu	Leucina e seus isómeros

RESUMO

O sucesso do rastreio neonatal da fenilcetonúria nas décadas de 70/80, veio permitir a partir da década de 90, com o recurso à espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS), a pesquisa de um grande número de doenças hereditárias do metabolismo (DHM). A possibilidade de obter um diagnóstico pré-sintomático para estas doenças, que dispõem de tratamento, é potencialmente gratificante, havendo uma tendência para alargar cada vez mais o painel das doenças rastreáveis. Assim em Portugal, o Programa Nacional de Diagnóstico Precoce (PNDP) passou a incluir 24 patologias a partir de 2004. Presentemente, o benefício do rastreio é inequívoco para um grupo restrito de doenças, em que se inclui a fenilcetonúria e o défice da desidrogenase dos ácidos gordos de cadeia média (MCAD), e não consensual para as restantes, com diferentes painéis de rastreio nos vários países.

Neste trabalho, propusemo-nos avaliar o contributo de um diagnóstico pré-sintomático na saúde das crianças rastreadas e a importância deste diagnóstico na vida das respectivas famílias. Este estudo incluiu 253 doentes com DHM, sendo alvo de especial relevância 93 que são afectados pelas patologias recentemente incluídas no painel de rastreio metabólico neonatal alargado em Portugal. Estes 93 doentes pertencem a dois grupos, os diagnosticados na fase sintomática com base na apresentação clínica (n=45) e os rastreados pelo PNDP, na sua maioria em fase pré-sintomática (n=48).

Foram comparados em paralelo os doentes com a mesma DHM em termos de morbilidade e mortalidade. A fenilcetonúria é a única DHM em que já existem registos consistentes do seguimento a longo prazo e cujo sucesso serviu de ponto de partida para o rastreio das restantes doenças. Na avaliação do benefício para o doente foram especialmente consideradas quatro patologias: leucínose, argininemia, acidúria 3-hidroxi-3-metilglutárica (3HMG) e défice de MCAD, por serem as mais relevantes na nossa experiência. Concluimos que o diagnóstico precoce contribuiu para a redução da morbilidade e da mortalidade aguda e crónica associadas a estas DHM sendo o ganho para a criança mais efectivo na leucínose, argininemia e défice de MCAD.

No impacto para a família, destaca-se a importância do diagnóstico dos demais membros afectados, muitas das vezes ainda assintomáticos ou com sintomas *minor*, mas também nalgumas situações com quadros incapacitantes e arrastados ao longo dos anos sem diagnóstico etiológico. Nestes casos, o aconselhamento genético e o diagnóstico pré-natal são uma mais-valia inquestionável.

O rastreio neonatal permite o diagnóstico de todas as variantes da patologia, desde os casos mais graves aos mais ligeiros, assim como um real conhecimento epidemiológico

das DHM. Estes dados suportam a decisão de incluir no painel português, doenças muito raras noutros países europeus e que, pelo contrário, são particularmente frequentes entre nós, nomeadamente a argininemia e a 3HMG.

Uma reflexão sobre o trabalho desenvolvido, permite-nos concluir que a comunicação do resultado anómalo à família por parte de um clínico experiente no diagnóstico e tratamento destas patologias, o acompanhamento multidisciplinar, o aconselhamento e estudo familiar quer a nível bioquímico quer genético e a possibilidade de diagnóstico pré-natal, fazem desta intervenção integrada na área da pediatria, uma mais-valia para os doentes do foro metabólico.

ABSTRACT

After the success of neonatal screening for phenylketonuria in the 70s/80s and, with the application in the 90's, of the tandem mass spectrometry (MS/MS), it became possible to search for a large number of inherited metabolic diseases (IMD). The possibility of having a early diagnosis for these treatable disorders is potentially rewarding, which lead to a tendency to extend the panel of screening disorders. Hence, since 2004, in Portugal, the *Programa Nacional de Diagnóstico Precoce* (National Neonatal Screening Program) includes 24 IMD. Currently, the benefit is unequivocal for a limited group of diseases – including phenylketonuria and medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MCAD), but the remaining disorders are still subject of discussion, which explains the existence of heterogeneous screening panels in different countries.

In this study, we proposed ourselves to assess the contribution of the neonatal screening for the health of children with pre-symptomatic diagnosis and to evaluate the impact of this diagnosis in the life of their families. This study included 253 metabolic patients, with particular attention to the 93 patients affected with the diseases recently included in the Portuguese expanded neonatal metabolic screening panel. These 93 patients were divided into two groups: those who have been diagnosed in a symptomatic stage (n=45) and those that have been detected by the neonatal screening program, most of them in pre-symptomatic stage (n=48).

Within the same IMD, patients of the two groups have been compared for morbidity and mortality. Phenylketonuria is the only IMD with solid records of long-term follow-up and whose successful treatment was used as a starting point for the screening of the remaining diseases. Concerning the evaluation of the benefit for the patient, four diseases were specifically assessed: MSUD, hyperargininemia, 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria (3HMG) and MCAD deficiency - because they are the most assumed relevant IMD according to our experience. We have verified that the early diagnosis contributed to a reduction of the mortality and morbidity associated with acute and chronic presentations of these IMD. The gain has been most significant for children with MSUD, hyperargininemia and MCAD deficiency.

Regarding the impact in the family, we highlight the importance of diagnosing affected relatives, often still asymptomatic or presenting minor symptoms, but also, in a few cases, with long time disabling symptoms without adequated diagnosis. In these cases, genetic counseling and prenatal diagnosis are unquestionably valuable. Expanded neonatal screening allows for the diagnosis in most of the diseases in its whole spectrum - from severe to mild – and also for the knowledge of the real epidemiology of the IMD.

These data support the decision of inclusion, in the Portuguese panel, of very rare diseases in other European countries, which are particularly frequent among us - such as hyperargininemia and 3HMG.

Some reflection on the work already developed allowed us to conclude that the communication of abnormal results to the family by an expert clinician in the diagnosis and treatment of these disorders, the multidisciplinary follow up, the counseling and familial study (both biochemical and genetic) and the possibility of prenatal diagnosis, make this integrated intervention in the area of Pediatrics an advantage for metabolic patients.

I. INTRODUÇÃO

1.1 - Doenças Hereditárias do Metabolismo – Generalidades

As Doenças Hereditárias do Metabolismo (DHM) são entidades de natureza genética em que a metabolização de um determinado composto se encontra alterada. Na sua origem está uma deficiência enzimática específica, que afecta uma determinada via metabólica, levando à acumulação de substratos (muitas vezes tóxicos) e à produção diminuída ou nula de um produto biologicamente importante (Sriver *et al.*, 2001). O défice enzimático é a consequência fenotípica da existência de mutações num ou vários genes codificantes para o passo metabólico em causa. O diagnóstico laboratorial de uma doença metabólica pode portanto ser efectuado a vários níveis, nomeadamente por análise bioquímica de substratos e metabolitos, enzimática e/ou molecular (Blau *et al.*, 2003).

No início do século XX, Archibald Garrod contribuiu de modo decisivo para a génese do conceito de DHM. Nos seus estudos sobre a Alcaptonúria, constatou que todos os doentes excretavam grande quantidade de ácido homogentísico na urina e que a transmissão da patologia podia ser explicada recorrendo às leis de Mendel (Garrod A, 1908). Mais tarde, postulou que certas doenças surgem devido à ausência de uma enzima que catalisa um passo específico de uma via metabólica, introduzindo assim novos conceitos como via metabólica, bloqueio metabólico e erro inato do metabolismo (EIM). A partir destas definições foram feitas várias classificações para os EIM, sendo a mais utilizada a que os divide em três grupos principais, dois deles envolvendo o metabolismo intermediário: doenças por “Intoxicação” e por “defeito energético”, e um terceiro grupo que se refere aos defeitos enzimáticos da síntese ou degradação das moléculas complexas que ocorrem em distintos organelos celulares (Saudubray *et al.*, 2006).

A identificação, quatro décadas mais tarde, do primeiro défice enzimático, com transmissão recessiva, como causa de doença humana (Gibson, 1948), veio provar a veracidade dos conceitos formulados por Garrod, até então subvalorizados. Esta descoberta e o desenvolvimento de metodologias como a cromatografia em papel, cromatografia gasosa e a electroforese em papel e gel, foram importantes avanços possibilitando o diagnóstico bioquímico de novas doenças. No entanto, na década de 70, os EIM eram ainda considerados um grupo de patologias extremamente raras. Só após um período de rápido desenvolvimento científico e tecnológico é que surgiu uma maior consciencialização da sua existência e da importância do seu diagnóstico, que associada a um maior conhecimento por parte dos clínicos, permitiu o reconhecimento de um grande número de doenças do foro metabólico, transformando este grupo de patologias num dos mais importantes dentro da actual medicina (Sanjurjo *et al.*, 2001).

Consideradas individualmente, as DHM são doenças raras, mas globalmente constituem um grupo grande e heterogêneo, responsável por uma morbidade e mortalidade significativas, sobretudo na população pediátrica (Joubert *et al.*, 2007). Estão identificados mais de 600 EIM e o seu número aumenta continuamente (Pàmpols R., 2010), sendo a incidência estimada na população geral entre 1/800 e 1/1000 nados vivos (Leonard e Morris, 2006).

Dentro das DHM, as formas potencialmente tratáveis, assumem maior relevo pela indicação de início urgente de uma terapêutica adequada, que evite as sequelas neurológicas e físicas, por vezes muito graves ou mesmo fatais, que ocorrem num número significativo de doentes. Por conseguinte, a detecção precoce de todas as patologias metabólicas tratáveis é fundamental para uma evolução favorável (Leonard *et al.*, 2002; Pandor *et al.*, 2004).

Após o êxito do tratamento pré-sintomático da fenilcetonúria (PKU), novas terapêuticas têm vindo a ser testadas para as demais DHM, umas com sucesso efectivo, salvando a vida a centenas de doentes, outras com carácter mais experimental e actualmente ainda pouco promissoras (Leonard JV, 2006).

Hoje são cada vez em maior número os doentes com patologia metabólica que atingem a idade adulta, colocando novos desafios no que respeita à continuidade dos cuidados e à salvaguarda da sua qualidade de vida.

1.2 - Rastreio Neonatal Sistemático

1.2.1 - Conceito

O rastreio sistemático neonatal é um programa de saúde pública de prevenção secundária, que tem como objectivo detectar, em estado pré-sintomático, doenças para as quais existe tratamento, reduzindo assim a sua morbidade e mortalidade. É um dos maiores programas de medicina preventiva nos países ocidentais, obedece a valores cívicos e princípios éticos que garantem um acesso universal e equitativo a todos os recém-nascidos (RN), e a participação informada dos pais. Este Programa deve ter o apoio político e governamental que assegure a sua sustentabilidade e a adequada vigilância, o tratamento e o seguimento dos indivíduos afectados (Laberge C., 1994; Penchaszadeh *et al.*, 2000; American Academy of Pediatrics, 2000).

1.2.2 - História do Rastreio

Os avanços científicos e tecnológicos da segunda metade do século XX, facilitaram o diagnóstico e o conhecimento mais profundo deste tipo de doenças.

Destacam-se alguns marcos históricos que constituíram as bases necessárias para o posterior desenvolvimento dos actuais programas de rastreio:

- Em 1934, Folling descreveu a fenilcetonúria e identificou o marcador bioquímico da doença, o aminoácido fenilalanina (Folling I, 1934).
- Em 1953, Bickel afirmou que o tratamento dietético da fenilcetonúria baseado na restrição em fenilalanina podia evitar o atraso mental, se fosse iniciado antes do aparecimento dos primeiros sintomas (Bickel *et al.*, 1953).
- Em 1963, Guthrie utilizou uma amostra de sangue capilar impregnado em papel de filtro, para determinar a concentração sanguínea de fenilalanina pelo método da inibição bacteriana (Guthrie e Susi, 1963), criando assim as bases metodológicas e conceptuais actualmente vigentes, e que permitem o diagnóstico precoce de várias anomalias hereditárias. Efectivamente, a amostra de sangue seco recolhida em papel de filtro de composição, textura, espessura e porosidade padronizadas (cartão de Guthrie), apresenta grandes vantagens não só do ponto de vista de conservação e transporte da amostra, mas também, com inúmeras possibilidades numa perspectiva analítica. Permite assim efectuar análises com técnicas diversas, incluindo espectrométricas, cromatográficas, imunológicas, enzimáticas e de genética molecular (Bruist NR., 1993).
- No ano seguinte, surgiram as primeiras publicações referentes aos rastreios de fenilcetonúria, utilizando o cartão de Guthrie, efectuadas no Canadá e Estados Unidos (Partington e Anderson, 1964; Irwin *et al.*, 1964), com posterior alargamento a diversos países.
- Em 1968, Wilson e Jungner, definiram um conjunto de condições a aplicar às doenças metabólicas susceptíveis de benefício com o rastreio sistemático. Estas recomendações, serviram de base à Organização Mundial de Saúde (OMS) para definir os 10 critérios, em 1975:
 1. causarem dano mental e físico grave ou risco de vida no período neonatal (PNN);
 2. terem possibilidade de diagnóstico clínico efectivo no período neonatal;
 3. terem tratamento eficaz e acessível;

4. melhoria do prognóstico clínico com o tratamento;
5. terem uma incidência relativamente elevada;
6. disporem de um método analítico rápido, fiável e de custo reduzido;
7. conhecimento suficiente da história natural da doença;
8. garantia de acessibilidade ao tratamento;
9. avaliação do custo/benefício;
10. garantia de continuidade de cuidados.

O rastreio da fenilcetonúria é hoje efectuado em praticamente todos os países desenvolvidos. Progressivamente, e com base no sucesso desta experiência, o rastreio foi alargado a outras doenças congénitas ou hereditárias que obedeciam aos critérios da OMS. Entre estas, a mais consensual e generalizada é o hipotiroidismo congénito, que foi introduzido no rastreio por Dussault no Canadá em 1973 (Dussault e Large, 1973).

1.2.3 - Cronologia do Rastreio Neonatal em Portugal

Em Portugal, o Programa Nacional de Rastreio Neonatal Sistemático, também designado como Programa Nacional de Diagnóstico Precoce (PNDP) iniciou-se em 1979, por iniciativa do Instituto de Genética Médica (IGM) - Porto, incidindo inicialmente apenas sobre a fenilcetonúria (Magalhães *et al.*, 1984). Os primeiros meses foram destinados ao estudo da receptividade das mães a esta nova tecnologia e à escolha do tipo de organização mais aconselhável para o nosso País. Em 1981, foi introduzido o rastreio para o hipotiroidismo congénito e foi criado em Lisboa o segundo Centro Regional de Rastreios, no sentido de alargar a área de influência do rastreio a todo o sul do País. Porém, em 1983 esse Centro foi encerrado, passando todas as fichas a ser enviadas para o Laboratório Nacional de Rastreios sediado no IGM, e começando assim a organização a estruturar-se em moldes semelhantes aos actuais. A taxa de cobertura a nível nacional era então de cerca de 70%, atingindo os 85% em 1986 (Magalhães *et al.*, 1986).

Em 1985, os produtos dietéticos hipoproteicos passaram a ser comparticipados pelo Estado, facilitando o acesso aos mesmos e a sua diversificação (DR 9 - II Série de 25 de Junho de 1985).

Em 1987, a Faculdade de Farmácia de Lisboa começou a proceder ao estudo das biopteridinas (análises importantes para identificar as formas de fenilcetonúria que não respondem favoravelmente às medidas dietéticas como prevenção de lesões neurológicas), melhorando assim o diagnóstico e permitindo reajustes atempados de

tratamento nos casos, raros, de défice de co-factor da fenilalanina hidroxilase, a tetrahidrobiopterina (BH4).

Em 1992 foi atingido o milhão de crianças rastreadas nascidas em Portugal, e deram-se os primeiros passos para a criação da Associação Portuguesa de Fenilcetonúria (APOFEN), que mais tarde foi alargada a outras doenças do metabolismo das proteínas que também requerem uma dieta restrita em proteína e determinados aminoácidos.

Nos anos seguintes, baixaram-se os valores de chamada inicialmente estabelecidos para as duas doenças sistematicamente rastreadas, a fenilcetonúria e o hipotiroidismo congénito, encurtou-se o tempo médio de início de tratamento e melhorou-se a taxa de cobertura que progressivamente se aproximou dos 100% dos RN.

Entretanto, vários estudos piloto foram efectuados para outras entidades, nomeadamente para a hiperplasia congénita das supra-renais, défice em biotinidase e fibrose quística (Vaz Osório *et al.*, 1999).

1.3 - Alargamento do Rastreio a Novas Patologias

1.3.1 - Novas tecnologias e novas possibilidades

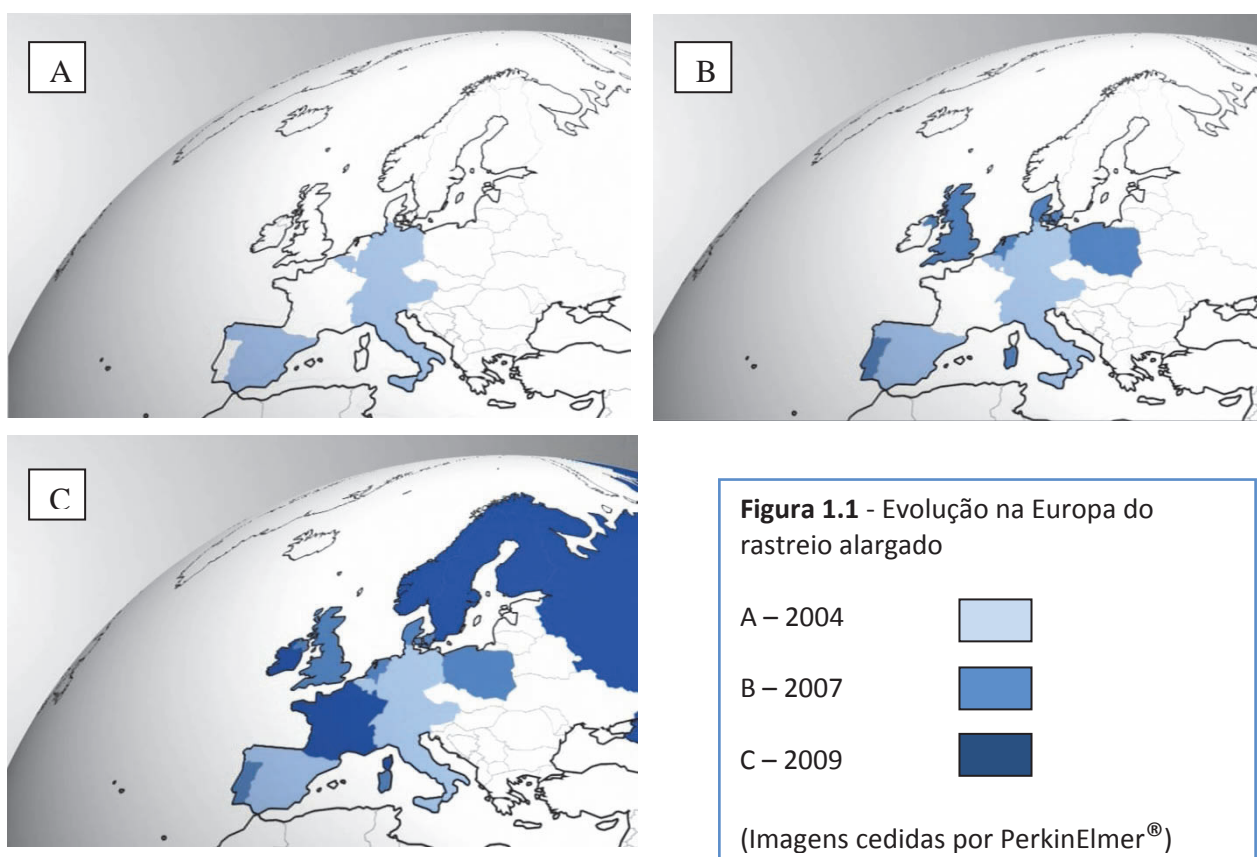
A partir do final da década de 90, com a aplicação da espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS) ao rastreio neonatal, tornou-se possível o rastreio de um grande número de DHM, sem necessidade de aumentar o volume de sangue colhido ao RN (Green e Pollitt., 1999; Zytkovicz *et al.*, 2001; Wilcken *et al.*, 2003).

Efectivamente, a MS/MS é uma metodologia, altamente sensível, que permite a identificação de moléculas através do seu peso molecular, podendo também ser utilizada para quantificação, recorrendo a padronização interna ou externa. As técnicas baseadas na espectrometria de massa, aplicadas ao diagnóstico de DHM, começaram a ser desenvolvidas no início dos anos setenta (Griffiths *et al.*, 2001), embora estivessem associadas a aplicações cromatográficas complexas e morosas. O desenvolvimento de novas técnicas de ionização, como o bombardeamento rápido de átomos e posteriormente o *electrospray* (ESI), traduziu-se num grande avanço para a utilização da espectrometria, em aplicações biomédicas, permitindo a análise directa de moléculas de origem biológica. A aplicação desta técnica ao rastreio neonatal de doenças metabólicas foi desenvolvida na década de noventa (Millington *et al.*, 1990, Rached *et al.*, 1995; Chace *et al.*, 1999) e baseia-se na determinação da concentração de aminoácidos e acilcarnitinas por ESI-MS/MS, permitindo rastrear mais de 30 DHM entre as quais,

doenças do ciclo da ureia, do metabolismo dos aminoácidos, dos ácidos orgânicos e da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos.

A disponibilidade destas novas tecnologias veio evidenciar que nem todas as doenças passíveis de serem rastreadas, obedecem aos critérios inicialmente estabelecidos por Wilson e Jungner. Houve então necessidade de adaptar os antigos critérios, com o objectivo de os manter globalmente aceites (Wilcken *et al.*, 2003; Pollitt RJ, 2007). Por exemplo, os factores custo do rastreio e a elevada incidência deixaram de ser considerados, uma vez que no diagnóstico simultâneo por MS/MS, os gastos envolvendo as diferentes DHM são comuns e relativamente independentes do número de patologias rastreadas. No entanto, respeitando os princípios éticos e organizacionais de que o rastreio não é apenas um painel de doenças, mas que deve integrar além do rastreio, educação, diagnóstico, seguimento, tratamento e avaliação (Therrell *et al.*, 2001), as restantes recomendações inicialmente estabelecidas continuam a ser observadas e adaptadas à actualidade.

O tempo presente é de transição, o painel das doenças rastreadas com a utilização de MS/MS não é consensual e como tal não é uniforme nos vários países. Por exemplo, nos Estados Unidos, país pioneiro no rastreio por MS/MS, o *American College of Medical Genetics* recomendava, em 2006, um painel de rastreio neonatal cobrindo 29 doenças (sendo 22 EIM). Este painel, viria a ser rapidamente questionado e contestado por vários autores (Botkin *et al.*, 2006, Tarini *et al.*, 2006, Vallance *et al.*, 2008). Também, na União Europeia existe uma heterogeneidade considerável nos programas de rastreio neonatal. Em 2007, 13 países europeus não tinham ainda iniciado o rastreio neonatal alargado e nos 9 países que utilizam MS/MS o número de doenças rastreadas variava entre 2 e 23 (Bodamer *et al.*, 2007) (Figura 1.1). É no entanto consensual, em todos estes países, que o sucesso destes programas passa por um seguimento clínico a longo prazo e que só este pode fornecer evidência suficiente sobre os doentes que têm ganhos efectivos com o rastreio neonatal (Howell e Engelson., 2007; James e Levy, 2006).



1.3.2 - Rastreio alargado em Portugal

Em Portugal, o rastreio neonatal alargado é coordenado pelo Presidente do INSA, pela Comissão Executiva do Diagnóstico Precoce e apoiado pelo Ministério da Saúde (DR n°7 de 12-01-2010).

O rastreio piloto de doenças metabólicas por MS/MS, em Portugal, arrancou em 2004 nas Regiões Norte e Centro, com alargamento posterior à Região Sul, passando a ter cobertura nacional a partir de Junho de 2006 (Vilarinho *et al.*, 2010).

Este estudo incluiu, para além da fenilcetonúria, o rastreio adicional de 13 doenças metabólicas (Vaz Osorio R, 2004), a partir do sangue colhido para o cartão de Guthrie (vulgo ficha de diagnóstico precoce):

- Aminoacidopatias [3]: leucínose, citrulinemia e acidúria argininosuccínica.
- Acidúrias orgânicas [5]: metilmalónica, propiónica, isovalérica, 3-hidroxi-3-metilglutárica e glutárica tipo I.
- Doenças da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos [5]: défice em carnitina palmitoil transferase I e II, défice das desidrogenases dos ácidos gordos de cadeia média (MCAD), longa (LCHAD) e muito longa (VLCAD).

A fenilcetonúria, cujo rastreio foi inicialmente efectuado pelo teste microbiológico de Guthrie (Magalhães *et al.*, 84), e depois pelo método enzimático da Quantase®, passou também a ser rastreada por MS/MS, sendo assim 14 os EIM pesquisados em simultâneo em cada RN.

Para conseguir um resultado atempado e informação individual, relativa ao RN, que auxiliasse na interpretação de resultados, houve necessidade de introduzir algumas alterações metodológicas importantes. Assim, a colheita de sangue foi antecipada, passando a ser efectuada entre o 3º e 6º dia de vida, e foi criado um novo tipo de cartão de colheita, que permite o registo de dados complementares, como o tipo de aleitamento e medicação em curso, e que possui um código de barras, que permite aos pais aceder informaticamente ao resultado do rastreio (Figura 1.2 A e B).

COMISSÃO NACIONAL PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE				N.º					
NÃO PREEN- CHER	TSH	NORMAL	REPETIR	N.º DATA DA RECEPÇÃO NO LABORATÓRIO / /					
	PKU	NORMAL	REPETIR						
PREENCHER EM MAIÚSCULAS NO ACTO DA COLHEITA	FILHO DE			N.º					
	DIRECÇÃO								
	TELEFONE								
	NASCIMENTO	<table border="1"> <tr><th colspan="2">DATAS</th></tr> <tr><td>/</td><td>/</td></tr> </table>	DATAS		/	/	SEXO <input type="checkbox"/> Masc. <input type="checkbox"/> Fem.	PREMATURO <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
	DATAS								
	/	/							
COLHEITA	<table border="1"> <tr><td>/</td><td>/</td></tr> </table>	/	/	TRATAMENTO POR ANTIBIÓTICOS	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não				
/	/								
LOCAL DE COLHEITA			<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não						
DISTRITO			É BENEFICIÁRIO DOS S. M. S. ? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não						
ENVIAR PARA: INSTITUTO DE GENÉTICA MÉDICA Praça Pedro Nunes, 74 • 4000 PORTO • Telefs. 699240-699398									

Figura 1.2 A - Ficha utilizada para colheita de sangue ao RN antes do alargamento do rastreio.

ENVIAR PARA: CENTRO DE GENÉTICA MÉDICA JACINTO DE MAGALHÃES
PRAÇA PEDRO NUNES, 88 - 4099-028 PORTO TEL. 226 070 300 / 226 070 328

Filho de _____
Endereço _____
C. Postal _____
Localidade _____

Nascimento _____
Colheita _____
Alimentação - Peito Outra

Sexo M F Medicação S N
Local da Colheita _____ Distrito _____

Prematuro S N
Peso _____ gr.
Icterícia S N
Gêmeos 1º 2º 3º

A. R. S. / Seg. Soc. ADSE SAMS
Outros _____
N.º Beneficiário _____

Se esta colheita for uma repetição, assinalar com uma cruz

COLABORE CONNOSCO
no pezinho do bebé pode estar o seu futuro

Para os Pais
NOTA: CONSERVE ESTE TALÃO
Para saber o resultado do teste do seu filho ou confirmar a recepção da ficha,
consulte na Internet www.diagnosticoptrecoce.org e digite este número.

5 201002 335618

Figura 1.2 B - Ficha utilizada para colheita de sangue ao RN após o alargamento do rastreio (com código de barras).

O facto de Portugal ter um Laboratório Nacional de Rastreio garante, a acessibilidade e equidade de diagnóstico a todas as crianças nascidas no nosso território. A taxa de cobertura e a adesão de 100% à realização do teste de rastreio (o qual não tem carácter de obrigatoriedade), demonstram que a educação dos profissionais e a informação da população foram também conseguidas. A criação de centros de tratamento (Despacho 25822 DR II Série de 15-12-2005), integrando profissionais de saúde com experiência em doenças metabólicas, inseridos em unidades hospitalares multidisciplinares com capacidade de atendimento permanente tem como objectivo que a informação aos pais, a confirmação do diagnóstico, o tratamento e o seguimento destes doentes sejam os mais adequados.

A centralização, no Centro de Genética Médica - Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge dos produtos hipoproteicos necessários ao tratamento das DHM proteico, acessíveis a todos os doentes do país, melhorou muito o cumprimento da dieta, a qualidade de vida e a saúde dos doentes.

O painel de DHM rastreadas foi então alargado para 24 (Tabela 1.1), seguindo o princípio base de que a doença a rastrear deve sempre ser passível de tratamento específico, o qual deve ser iniciado precocemente, para evitar a morte que muitas vezes acompanha o primeiro episódio de descompensação ou as sequelas tardias irreversíveis (Fernandes *et al.*, 2006).

Tabela 1.1 - Painel de doenças rastreadas em Portugal e incidência calculada a partir do número de casos positivos no rastreio de 316.272 RN (adaptado de Vilarinho *et al.*, 2010).

Doenças	MIM	Frequência estimada
Aminoacidopatias		1:5.856
Fenilcetonúria	261600	1:12.163
Hiperfenilalaninemia	261640	1:26.354
Leucinose	248600	1:105.141
Tirosinemia tipo I	276700	1:79.061
Tirosinemia tipo II/III	276600/276710	1:316.243
Homocistinúria clássica	236200	1:316.243
Hipermetioninémia (MATI/III)	250850	1:45.178
Doenças do Ciclo da Ureia		1:79.061
Citrulinemia tipo I	215700	1:158.122
Acidúria argininosuccínica	207900	1:316.243
Hiperargininemia	207800	1:316.243
Acidúrias orgânicas		1:13.177
3-Metilcrotonilglicinúria	210200	1:45.178
Acidúria Isovalérica	243500	1:105.141
Défice em Holocarboxilase sintetase	253270	1:158.122
Acidúria Propiónica	232000	1:316.243
Acidúria Metilmalónica (por défice da metil-malonil-CoA mutase)	251000	1:316.243
Acidúria Glutárica tipo I	231670	1:52.707
Acidúria Metilmalónica (défice do metabolismo da Cbl C, D)	251100/251110	1:316.243
Acidúria 3-Hidroxi-3-metilglutárica	246450	1:105.141
Défices da β-oxidação mitocondrial dos ácidos gordos		1:6.325
Défice da desidrogenase dos ácidos gordos de cadeia média	201450	1:9.036
Défice da desidrogenase dos hidroxiácidos de cadeia longa	143450	1:105.141
Défice múltiplo das desidrogenases dos ácidos grdos	231680	1:105.141
Défice do transportador da Carnitina	212140	1:105.141
Défice da desidrogenase dos ácidos gordos de cadeia muito longa	201475	1:105.141
Défice da carnitina palmitoil-transferase I	225120	1:316.243
Défice da carnitina palmitoil-transferase II	255110	1:158.122
Total		1:2.396

1.3.3 - Rastrear ou não rastrear?

A possibilidade de obter um diagnóstico pré-sintomático para as doenças metabólicas que actualmente dispõem de tratamento, é estimulante e gratificante, havendo tendência para alargar o painel base, e incluir novas patologias. É no entanto importante, que esta expansão seja rigorosamente monitorizada, avaliando os benefícios (diminuição da morbilidade, mortalidade e melhoria da qualidade de vida) e inevitavelmente os custos

associados (Wilcken *B.*, 2006; Pandor *et al.*, 2004; Wilcken *B.*, 2008; Liebl *et al.*, 2003). Actualmente, as doenças identificáveis por MS/MS podem ser agrupadas em diferentes categorias, segundo o grau de evidência de benefícios (Dhondt JL, 2010). Assim, para a PKU, primeira doença metabólica rastreada, é neste momento consensual e inquestionável a vantagem clínica e económica do rastreio (Leonard e Dezateux., 2002); sucede o mesmo com a homocistinúria clássica, para a qual a longa experiência da Irlanda mostra resultados válidos e plenamente aceites (Yap e Naughten., 1998). Considerando o novo grupo de DHM detectadas precocemente por MS/MS, há também benefícios claros para o défice de MCAD (Hass *et al.*, 2007; van der Hilst *et al.*, 2007). As restantes doenças são ainda alvo de discussão, nomeadamente aquelas em que o início precoce de uma terapêutica correcta, não impede que os doentes sofram descompensações graves e ainda as formas de apresentação clínica extremamente precoce, com início no primeiro ou segundo dia de vida, já sintomáticas à data do rastreio (Pandor *et al.*, 2004; Liebl *et al.*, 2003; Waisbren *et al.*, 2002; Nennstiel-Ratzel *et al.*, 2005). O benefício a longo prazo é também questionável, uma vez que há DHM em que o início precoce do tratamento pode não ser suficiente para evitar manifestações tardias como a neuropatia e retinopatia na LCHAD (Spiekerkoetter *et al.*, 2009).

1.3.4 - Breve descrição das patologias incluídas no rastreio metabólico

Tal como já foi referido em 3.1, podemos dividir as patologias incluídas no rastreio alargado em três grandes grupos: aminoacidopatias, acidúrias orgânicas e defeitos da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos.

Os dois primeiros englobam DHM dos aminoácidos em passos metabólicos distintos e sob o ponto de vista fisiopatológico são “doenças tipo intoxicação”, isto é, patologias que se caracterizam por sinais e sintomas de intoxicação aguda e progressiva, após um intervalo livre, por acumulação de metabolitos tóxicos a montante do bloqueio enzimático. Há uma relação evidente com a ingestão do alimento que funciona como tóxico e com as intercorrências agudas, especialmente as infecciosas, devido ao catabolismo proteico associado. Podem manifestar-se de forma aguda no PNN, horas ou dias após o nascimento, ou mais tardiamente em qualquer idade como doença crónica e progressiva ou, de forma aguda, com descompensações, caracterizadas por uma elevada mortalidade e morbilidade. O tratamento a longo prazo consiste essencialmente na remoção do produto tóxico da dieta, o que na prática se traduz numa alimentação restrita em proteínas (Saudubray *et al.*, 2006).

O último grupo, compreende os defeitos da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos, que são doenças causadas por um “*défice energético*” e devem-se, pelo menos parcialmente, a um defeito na produção ou utilização de energia. Os órgãos mais afectados são, por isso, os mais dependentes de energia como: fígado, miocárdio, cérebro e músculo. As manifestações clínicas surgem, muitas vezes de forma súbita e fatal, ou crónica, com quadros de miopatia, cardiomiopatia e falência hepática. O tratamento consiste na recolocação energética por bloqueio da lipólise, evitando períodos de jejum e no aumento do aporte em hidratos de carbono sobretudo em períodos nocturnos ou de catabolismo (Shekhawat et al 2005).

De seguida serão considerados cada um destes grupos individualmente.

1.3.4.1 - Aminoacidopatias

A análise de aminoácidos por MS/MS constitui a abordagem mais eficaz para identificação de aminoacidopatias no rastreio neonatal, pois permite detectar as alterações bioquímicas muito precocemente com praticamente 100% de sensibilidade e especificidade (Chace *et al.*, 2003; Zytkevicz *et al.*, 2001). Assim, é possível antecipar a data de colheita de sangue, a qual pode ser efectuada a partir das 48 horas de vida, facto extremamente importante para algumas das doenças em que o risco de descompensação nos primeiros dias de vida é elevado, como é o caso da leucinose e da citrulinemia.

Contrariamente aos métodos prévios de rastreio da PKU, que forneciam exclusivamente informação acerca da concentração de fenilalanina no sangue, com MS/MS obtém-se informação em simultâneo sobre a quantidade de fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr), metionina (Met), citrulina (Cit), arginina (Arg), ornitina (Orn) e o somatório da leucina (Leu) e seus isómeros – isoleucina (Ile) e alo-isoleucina - (XLeu), podendo também ser doseados a valina (Val) e a prolina (Pro). O doseamento conjunto permite o cálculo da razão entre aminoácidos, importante para doenças como a fenilcetonúria (razão Phe/Tyr), reduzindo o número de falsos positivos e falsos negativos. A avaliação global de todo o perfil de aminoácidos contribui para o diagnóstico diferencial com outras situações que originam alterações metabólicas secundárias, como a falência hepática, a utilização de nutrição parentérica ou o uso de certos fármacos. Em algumas patologias, o rastreio terá que decorrer em dois passos, como na tirosinemia tipo I, em que um valor elevado de Tyr no rastreio inicial implica o doseamento do composto marcador - succinilacetona - numa segunda fase (Allard *et al.*, 2004).

Na tabela 1.2 (anexo III) estão discriminadas as aminoacidopatias que fazem parte do actual painel de rastreio, os marcadores bioquímicos iniciais e os testes de confirmação.

Seguidamente, é descrito o quadro clínico e bioquímico associado a estas doenças quando não são tratadas atempadamente e o tratamento indicado para cada uma delas:

Fenilcetonúria - défice em fenilalanina hidroxilase (Figura 1.3).

Clínica: quando não detecetada precocemente causa atraso psicomotor, epilepsia, microcefalia, eczema e alterações de comportamento com hiperactividade e agressividade. Este quadro clínico instala-se de forma progressiva e crónica a partir dos primeiros 6 meses de vida (Donlon e Levy, 2008).

Bioquímica: o marcador utilizado para o diagnóstico e monitorização terapêutica a longo prazo é a Phe plasmática e respectiva razão Phe/Tyr.

Tratamento: consiste numa dieta hipoproteica restrita em Phe (Bickel *et al.*, 1953) e suplementada nos restantes aminoácidos. O tratamento com BH₄, tem indicação em doentes com mutações que reconhecidamente responderem a este cofactor enzimático, aumentando a tolerância à Phe e permitindo liberalizar um pouco mais a dieta (Kure S, 1999).

Hiperfenilalaninemia moderada ou benigna - défices parciais em fenilalanina hidroxilase.

Clínica: pode manifestar-se com défice de atenção e alterações do sono.

Bioquímica: caracterizada por níveis de Phe aumentados, mas em menor grau que na forma clássica de PKU atrás descrita (Costello *et al.*, 1994).

Tratamento: quando necessário, é sobreponível ao da PKU.

Hiperfenilalaninemia maligna - alterações no metabolismo do cofactor BH₄ (Figura 1.3) com aumentos persistentes de Phe que não respondem ao tratamento dietético.

Clínica: caracterizada por uma deterioração neurológica progressiva, com atraso de desenvolvimento, epilepsia e distonia.

Bioquímica: o diagnóstico diferencial com as formas clássicas de PKU, por défice em fenilalanina hidroxilase, faz-se pelo doseamento das biopterinas urinárias e da enzima dihidropterina redutase no sangue (Pronzone *et al.*, 1993).

Tratamento: as formas que respondem à BH4 não necessitam de tratamento dietético. O uso de neurotransmissores (L-Dopa e 5-OH-triptofano) pode estar indicado nalgumas situações (Martinez e Garcia, 2010).

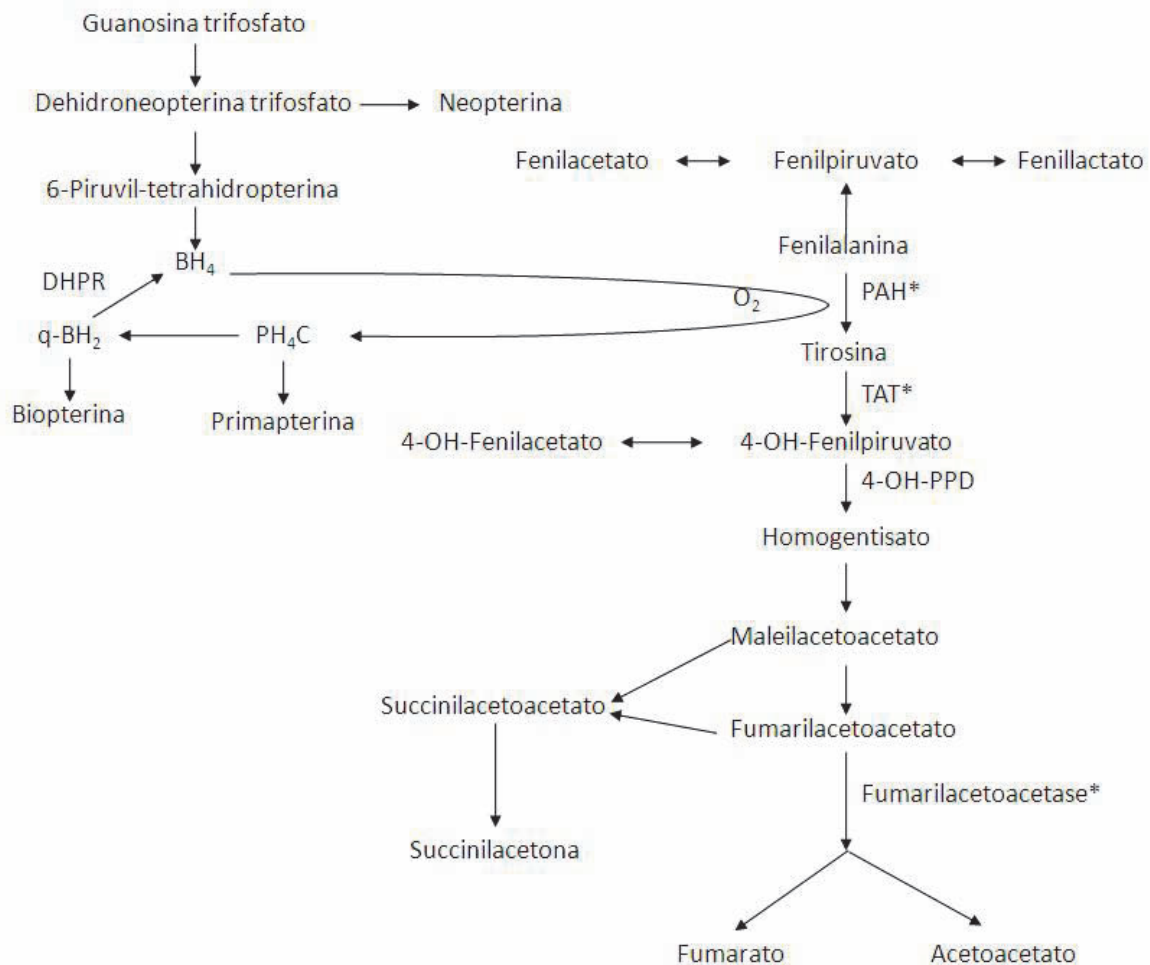


Figura 1.3 - Metabolismo da fenilalanina, tirosina e pterinas.

Abreviaturas- q-BH2 dehidrobiopterina, DHPH dehidropterina redutase, PAH fenilalanina hidroxilase, PH4C pterina 4-carbinolamina, TAT tirosina aminotransferase, 4-OH-PPD 4-hidroxifenilpiruvato desidrogenase.

Tirosinemias - O rastreio permite diagnóstico das tirosinemias tipos I, II e III (Figura 1.3).

Tirosinemia tipo I - déficit em fumarilacetoacetase.

Clínica: pode manifestar-se de forma aguda, com rápida deterioração da função hepática e renal, ou de forma crónica com tubulopatia renal, cirrose e carcinoma hepatocelular.

Bioquímica: elevação da tirosina, mas sobretudo de maleil e fumaril/acetoacetato e do composto marcador – succinilacetona.

Tratamento: dieta restrita em fenilalanina e tirosina e utilização do NTBC, fármaco que bloqueia a degradação da tirosina diminuindo a acumulação de compostos tóxicos fundamentalmente de succinilacetona. O transplante hepático foi único tratamento possível durante vários anos, mas actualmente é efectuado só nos casos que desenvolvem hepatocarcinoma (Dias *et al.*, 2010).

Tirosinemia II - défice em tirosina aminotransferase.

Clínica: caracteriza-se por queratite com úlceras “herpetiformes” na córnea, hiperqueratose palmoplantar e atraso mental.

Bioquímica: elevação da tirosina.

Tratamento: restrição na ingestão de tirosina (Chakrapani e Holme, 2006).

Tirosinemia III - défice em 4-hidroxi-fenilpiruvato desidrogenase.

Clínica: caracteriza-se por atraso cognitivo, défice de atenção, epilepsia e ataxia.

Bioquímica: elevação da tirosina

Tratamento: restrição na ingestão de tirosina (Chakrapani e Holme, 2006).

Leucinose - défice em 2-cetoácido-desidrogenase dos aminoácidos ramificados: Leu, Val e Ile (Figura 1.4).

Clínica: pode surgir no período neonatal com recusa alimentar, letargia progressiva e evolução para coma, após um intervalo livre de sintomas, ou manifestar-se mais tardiamente: quer por episódios de descompensação aguda intermitente com ataxia, convulsões e letargia, quer de forma crónica e progressiva com hipotonia, má evolução estatoponderal e atraso de desenvolvimento psicomotor (Wendel e Ogier de Baulny, 2006).

Bioquímica: os aminoácidos ramificados estão elevados no plasma, assim como a alo-leucina cuja presença é patognomónica.

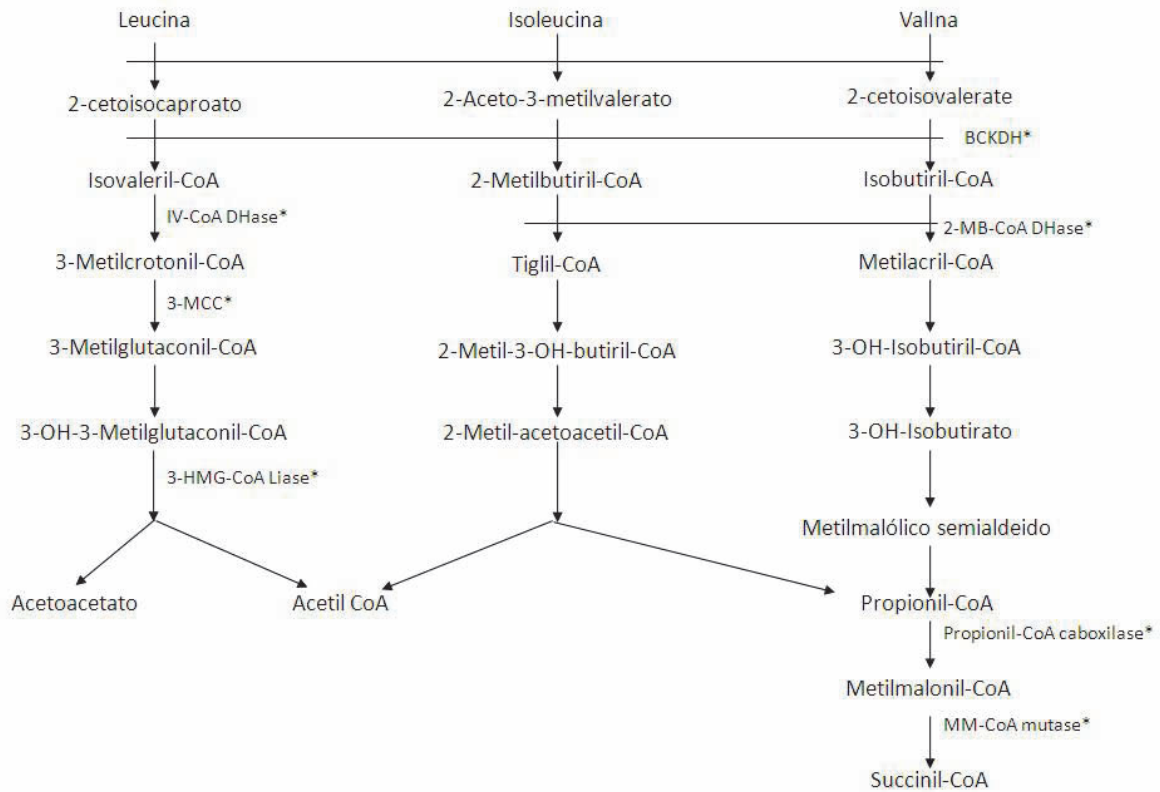


Figura 1.4 - Metabolismo dos aminoácidos ramificados.

Abreviaturas- BCKDH 2-cetoacido-desidrogenase dos aminoácidos ramificados, 3-HMG-CoA liase 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA liase, IV-CoADHase isovaleril-CoA desidrogenase, 3-MCC 3-metilcrotonil-CoA carboxilase, MM-CoA mutase metilmalonil-CoA mutase

Tratamento: na fase aguda, o objectivo principal passa pela normalização o mais rápido possível dos níveis de aminoácidos (AA) ramificados, em especial da Leu que é o aminoácido mais neurotóxico. Em situações mais graves é necessário utilizar técnicas de depuração exógena, como a diálise peritoneal, hemodiálise ou hemodiafiltração. Nos casos de menor gravidade pode conseguir-se uma redução adequada da Leu, induzindo o anabolismo e a síntese proteica, pela administração entérica contínua de uma fórmula com elevado teor calórico, isenta em proteínas naturais e suplementada com uma mistura de AA essenciais (falamos neste caso em depuração endógena). A longo prazo, o tratamento consiste numa alimentação restrita nos AA ramificados, optimizada de forma a permitir um normal crescimento, e na prevenção e evicção das descompensações durante situações de stress metabólico. Um número restrito de casos responde à terapêutica com tiamina, que é o cofactor enzimático (Rocha *et al.*, 2007; Kner *et al.*, 2011).

Homocistinúria - défice em cistationina β - sintetase (Figura 1.5).

Clínica: caracterizada pelo envolvimento dos órgãos alvo, nomeadamente olho (luxação do cristalino), esqueleto (dolicoestenomegalia e aracnodactilia), sistema vascular (tromboembolismo) e sistema nervoso central (atraso cognitivo e acidentes vasculares cerebrais) (Couce e Fraga, 2006).

Bioquímica: elevação da homocistina/homocisteína e Met plasmáticas e diminuição da cistina (Cys).

Tratamento: deve ser sempre testada a resposta terapêutica à piridoxina, que é o cofactor enzimático (Kluijtmans *et al.*, 1999). A esta terapêutica associa-se a vitamina B12 e o ácido fólico. Nas formas que não respondem ou que respondem parcialmente, são iniciados uma dieta hipoproteica restrita em metionina e suplementos de L-cistina. O citrato de betaína, é outro fármaco utilizado, pois promove a remetilação da homocistina em Met e é útil nas situações de mais difícil controlo (Devun *et al.*, 2004).

Hipermetioninemia - défice em metionina adenosiltransferase (MAT I/III) (Figura 1.5).

Clínica: o atraso, as alterações neurológicas e a epilepsia são observadas apenas em alguns doentes e não têm relação directa com os níveis de metionina. As alterações da mielinização são devidas à diminuição em S-adenosilmetionina.

Tratamento: passa por uma dieta restrita em Met, a qual está indicada para valores de Met superiores a 300 $\mu\text{mol/L}$ (Chien *et al.*, 2005).

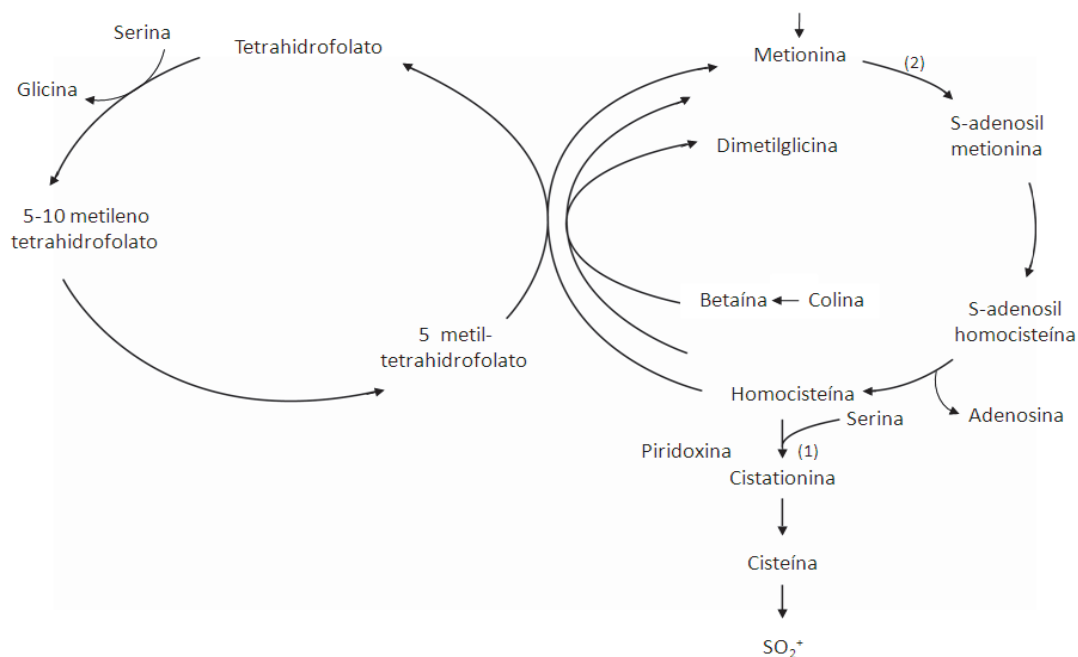


Figura 1.5 - Metabolismo dos aminoácidos sulfurados.

Abreviaturas - (1) cistationina- β -sintetase, (2) metionina adenosiltransferase

Doenças do ciclo da ureia - O ciclo da ureia permite ao organismo transformar o excesso de nitrogénio em ureia e sintetizar arginina. Das seis doenças clássicas do ciclo da ureia é efectuado o rastreio apenas de três, citrulinemia tipo I, acidúria argininosuccínica e argininemia (Figura 1.6). O marcador bioquímico comum a estas patologias é a elevação da amónia plasmática. O tratamento é também semelhante em todas elas e aqui descrito conjuntamente.

Citrulinemia I - défice em argininosuccinato sintetase.

Clinica: pode manifestar-se no período neonatal, após intervalo livre. Com recusa alimentar, letargia progressiva, falência hepática e evolução para coma, ou, mais tardiamente, com episódios de descompensação aguda com vómitos, letargia/ irritabilidade, ataxia e coma (Bachmann C, 2003).

Bioquímica: o marcador específico é a elevação da Cit plasmática.

Acidúria argininosuccínica - défice em argininosuccinato liase.

Clinica: tem apresentação igual à descrita para a citrulinemia.

Bioquímica: o aumento do ácido argininosuccínico urinário é o marcador específico desta patologia.

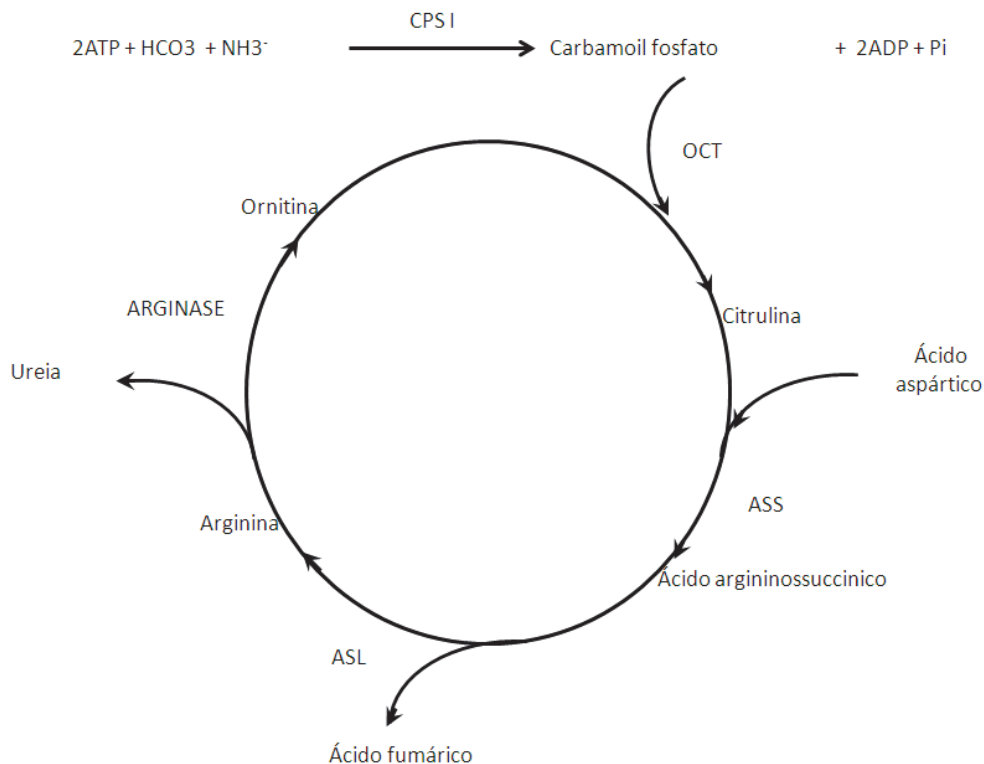


Figura 1.6 - Metabolismo do ciclo da ureia.

Abreviaturas - ASL argininosuccinato liase, ASS argininosuccinato sintetase, CPS1 carbamilfosfato sintetase, NH3 amónia, OCT ornitina carbamiltransferase

Argininemia - défice em arginase I.

Clínica: raramente tem uma apresentação semelhante à descrita para as outras doenças do ciclo da ureia e apresenta-se tipicamente com um quadro de paraparésia espástica progressiva e atraso mental, sendo o envolvimento hepático menos grave (Bachmann C, 2003).

Bioquímica: o marcador de diagnóstico é a elevação da Arg plasmática.

Tratamento: consiste numa alimentação restrita em proteínas, associada à administração de aminoácidos essenciais e suplementos de L-arginina (excepto na argininemia) e na utilização de fármacos quelantes da amónia, benzoato e fenilbutirato de sódio, que criam vias alternativas de excreção do nitrogénio (Maestri *et al.*, 1991). Nas formas graves de apresentação neonatal é necessário recorrer frequentemente a técnicas de depuração exógena.

1.3.4.2 – Acidúrias orgânicas

As acidúrias orgânicas caracterizam-se pela acumulação no sangue e urina, de compostos derivados do metabolismo intermediário, que têm pH marcadamente ácido. Estes ácidos sofrem conjugação *in vivo* com carnitina, seja para metabolização posterior, seja para facilitar a sua excreção (por via urinária), originando as respectivas acilcarnitinas.

O rastreio das acidúrias orgânicas por MS/MS é feito através do doseamento das acilcarnitinas dos diferentes ácidos, após a sua conversão laboratorial em butiril-ésteres (Rashed *et al.*, 1995).

Atendendo a que a designação química de muitas das acilcarnitinas é extremamente complexa e pouco prática, existe uma nomenclatura simplificada, consensualmente aceite, e elaborada essencialmente em função do número de átomos de carbono existente no seu esqueleto ácido.

Em algumas patologias, como é o caso da acidúria glutárica tipo I, o rastreio baseia-se na quantificação de uma só acilcarnitina, mas na maioria das situações utilizam-se várias acilcarnitinas e os *ratios* entre elas. Assim, por exemplo, a elevação de propionilcarnitina (C3) que é de esperar nas acidemias metilmalónica e propiónica, pode passar despercebida nas formas menos graves de apresentação tardia, e ser totalmente normal nos défices de cobalamina. Nestas situações, é útil a determinação dos quocientes entre a C3 e a acetilcarnitina (C2): [C3/C2] e entre C3 e palmitoilcarnitina (C16): [C3/C16] (Lindner *et al.*, 2008). Além disso, algumas acilcarnitinas são utilizadas como marcadores

comuns a várias DHM, como é o caso da 3-hidroxi-isovalericarnitina (C5OH) para a 3-metilcrotonilglicinuria, acidúria 3-hidroxi-3-metilglutárica e défice em holocarboxilase sintetase.

Na tabela 1.3 (anexo IV) descrevem-se as acidúrias orgânicas que fazem parte do actual painel de rastreio em Portugal, os marcadores bioquímicos utilizados na abordagem inicial (acilcarnitinas) e os testes de confirmação do diagnóstico utilizados, sendo muitas vezes efectuado o estudo molecular da criança e dos progenitores mediante consentimento informado.

A sintomatologia e alterações bioquímicas esperadas neste grupo de patologias são as seguintes:

Acidúrias metilmalónica - défice em metilmalonil-CoA mutase e **Acidúria propiónica** - défice em propionil-CoA carboxilase.

Ambas as acidúrias resultam de um bloqueio enzimático no catabolismo dos aminoácidos ramificados (Figura 1.4).

Clínica: manifestam-se no período neonatal com recusa alimentar, letargia progressiva e evolução para coma, após um intervalo livre de sintomas, podendo manifestar-se também mais tardiamente, quer por episódios de descompensação aguda intermitente, quer de forma crónica e progressiva com hipotonia, má evolução estaturponderal e atraso de desenvolvimento psicomotor (Horster *et al.*, 2009).

Bioquímica: é frequente a cetoacidose e a elevação da amónia nas apresentações agudas. Os marcadores específicos são o aumento do ácido metilmalónico (AMM) e propiónico (AP) na urina para as acidúrias metilmalónica e propiónica respectivamente, para além de outros compostos nomeadamente a propionilglicina e o ácido metilcitríco.

Terapêutica: na fase aguda tem como objectivo uma rápida eliminação dos metabolitos tóxicos. A excreção urinária do AMM é bastante efectiva, sendo importante um aporte hídrico elevado para forçar a eliminação renal desta substância. Já a excreção de AP é menos importante, dada provavelmente a sua estrutura e características próprias, obrigando a recorrer, com maior frequência a técnicas de depuração exógena. Tal como já foi referido anteriormente para a leucinose, recorre-se à promoção do anabolismo, associando um aporte calórico elevado e administração de uma mistura de AA essenciais, isenta de Val, Ile, Met e treonina, específica destas acidúrias. A nível farmacológico são importantes a carnitina, que ajuda na excreção dos tóxicos e previne o défice secundário nesta substância, os quelantes de amónia se houver níveis secundariamente aumentados e ainda a prova de resposta farmacológica ao cofactor enzimático (vitamina B12 na acidúria metilmalónica e biotina na acidúria propiónica). A longo prazo, mantém-se a restrição proteica e a carnitina,

sendo de realçar também o uso de metronidazol, que reduz a produção bacteriana de AP a nível intestinal (Sanjurjo *et al.*, 2010).

Além da **acidúria metilmalónica** por défice da apoenzima, são rastreadas também as **variantes C e D** (Cbl C e Cbl D), que se devem a alterações da activação endógena da vitamina B12. Nestas variantes está alterada a síntese da adenosilcobalamina (cofactor da metilmalonil -CoA mutase) e da metilcobalamina (cofactor da metionina sintetase), ocorrendo um aumento simultâneo do AMM e da homocistina/homocisteína (Watkins e Roseblatt, 2011) (Figura 1.5).

Clínica: pode manifestar-se precocemente com doença neurológica, ocular, hematológica, renal e cardíaca, ou mais tarde, com doença neurológica progressiva e alterações de comportamento (Martinelli *et al.*, 2011).

Bioquímica: elevação simultânea do AMM e da homocistina/homocisteína, e do ácido metilcítrico.

Tratamento: efectuado com vitamina B12 na forma activa (hidroxicobalamina), ácido fólico e betaína. A restrição proteica e o uso de carnitina não são medidas consensuais (Fowler *et al.*, 2008).

Acidúria isovalérica - défice em isovaleril-CoA desidrogenase (Figura 1.4).

Clínica: semelhante à descrita para as acidúrias metilmalónica e propiónica.

Bioquímica: aumento dos ácidos isovalérico, 3-hidroxi-isovalérico e de isovalerilglicina.

Tratamento: em linhas gerais é igual ao das acidúrias anteriormente descritas. Nesta doença está indicado efectuar suplementos em glicina além da carnitina (Wendel e Ogier de Baulny, 2006).

Acidúria 3-hidroxi-3-metilglutárica (3HMG) - défice em 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA liase.

É também uma doença que afecta o catabolismo da leucina e simultaneamente a produção de corpos cetónicos (cetogénese). Esta patologia tem fisiopatologia mista tipo intoxicação e defeito do metabolismo energético, combinados.

Clínica: caracteriza-se por episódios de vómitos e letargia com evolução para coma. Cerca de metade dos casos tem início neonatal com episódios de hipoglicemia sintomática (Gibson *et al.*, 1998).

Bioquímica: elevação dos ácidos 3-hidroxi-isovalérico, 3-hidroxi-3-metilglutárico e 3-metilglutacónico.

Tratamento: dieta com restrição lipídica e proteica (restrição em Leu), estando também indicado administrar carnitina se os níveis séricos forem baixos (Cardoso *et al.*, 2004).

3-Metilcrotoniglicinúria - déficit em de 3-metilcrotonil-CoA carboxilase.

Clínica: variável, com episódios agudos de vômitos e alterações neurológicas, epilepsia e atraso desenvolvimento, podendo também ser totalmente assintomática nalguns casos.

Bioquímica: aumento da 3-metilcrotonilglicina.

Tratamento: consiste em evitar períodos de jejum longo, aumentar o aporte de hidratos de carbono em situações de stress metabólico e administrar carnitina (Wendel e Ogier de Baulny, 2006).

Acidúria glutárica tipo I - déficit em glutaril-CoA desidrogenase.

Clínica: a macrocefalia surge em cerca de 75% dos casos. A doença pode manifestar-se de forma aguda entre os 3 e os 36 meses de idade, geralmente desencadeada por uma intercorrência infecciosa ou intervenção cirúrgica. A esta crise encefalopática com lesão bilateral dos núcleos estriados, segue-se a instalação de um quadro neurológico dominado pela distonia e hipotonia axial. A evolução crónica, com atraso de desenvolvimento de gravidade variável, pode também ocorrer.

Bioquímica: os metabolitos tóxicos são os ácidos glutárico e 3-hidroxiglutárico, sendo este último o mais neurotóxico.

Tratamento: dieta hipoproteica restrita em lisina e uso diário de suplementos de carnitina. Durante os episódios passíveis de descompensação aguda intensifica-se o tratamento, aumentando o aporte em hidratos de carbono, restringindo as proteínas naturais e duplicando a dose de carnitina (Kolker *et al.*, 2011)

Déficé múltiplo das carboxilases – déficit em holocarboxilase sintetase.

Corresponde ao déficit simultâneo da piruvato carboxilase, propionilcarboxilase e 3-metilcrotonilcarboxilase.

Clínica: pode surgir no período neonatal com vômitos, convulsões, letargia e coma, ou mais tardiamente com atraso de desenvolvimento psicomotor, *rash* cutâneo e alopecia.

Tratamento: administração do co-factor biotina (Baumgartner e Suormala, 2006).

1.3.4.3 - Defeitos da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos

O estudo das doenças da β -oxidação mitocondrial por MS/MS é efectuado pelo doseamento da carnitina livre (C0) e das acilcarnitinas de 2 a 20 carbonos, avaliando assim todos os défices desta via desde os ácidos gordos de cadeia curta até aos ácidos gordos de cadeia longa (Chace *et al.*, 1999). A concentração destas substâncias é mais elevada nos primeiros dias de vida devido ao *stress* do parto, diminuindo rapidamente nas primeiras semanas, contrariamente ao que acontece com as doenças tipo intoxicação em que os metabolitos doseados aumentam com o passar dos dias.

Embora haja acilcarnitinas que são marcadores mais sugestivos de um determinado défice, é muitas vezes a razão entre determinados marcadores típicos de cada doença e a observação de todo o perfil que permite diminuir o risco de falsos positivos e falsos negativos e fazer um diagnóstico com maior rigor.

Na tabela 1.4 (anexo V) estão descritos os defeitos da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos que fazem parte do actual painel de rastreio, os marcadores bioquímicos iniciais e os testes de confirmação. A alteração bioquímica mais sugestiva é a hipoglicemia hipocetótica.

Descrevem-se em seguida as manifestações clínicas esperadas para estas doenças e o tratamento preconizado.

MCAD - défice da desidrogenase dos ácidos gordos de cadeia média.

Clínica: os primeiros sintomas surgem mais frequentemente entre os 3 e 24 meses de vida, coincidindo com o início do jejum nocturno ou com uma intercorrência infecciosa. Pode manifestar-se por vómitos e letargia, com evolução progressiva para o coma, síndrome *Reye-like* ou morte súbita. Pode surgir também mais tardiamente com episódios de vómitos cíclicos (Iafolla *et al.*, 1994). A taxa de mortalidade associada a este primeiro episódio de descompensação é de cerca de 30% (Ratzel *et al.*, 2005).

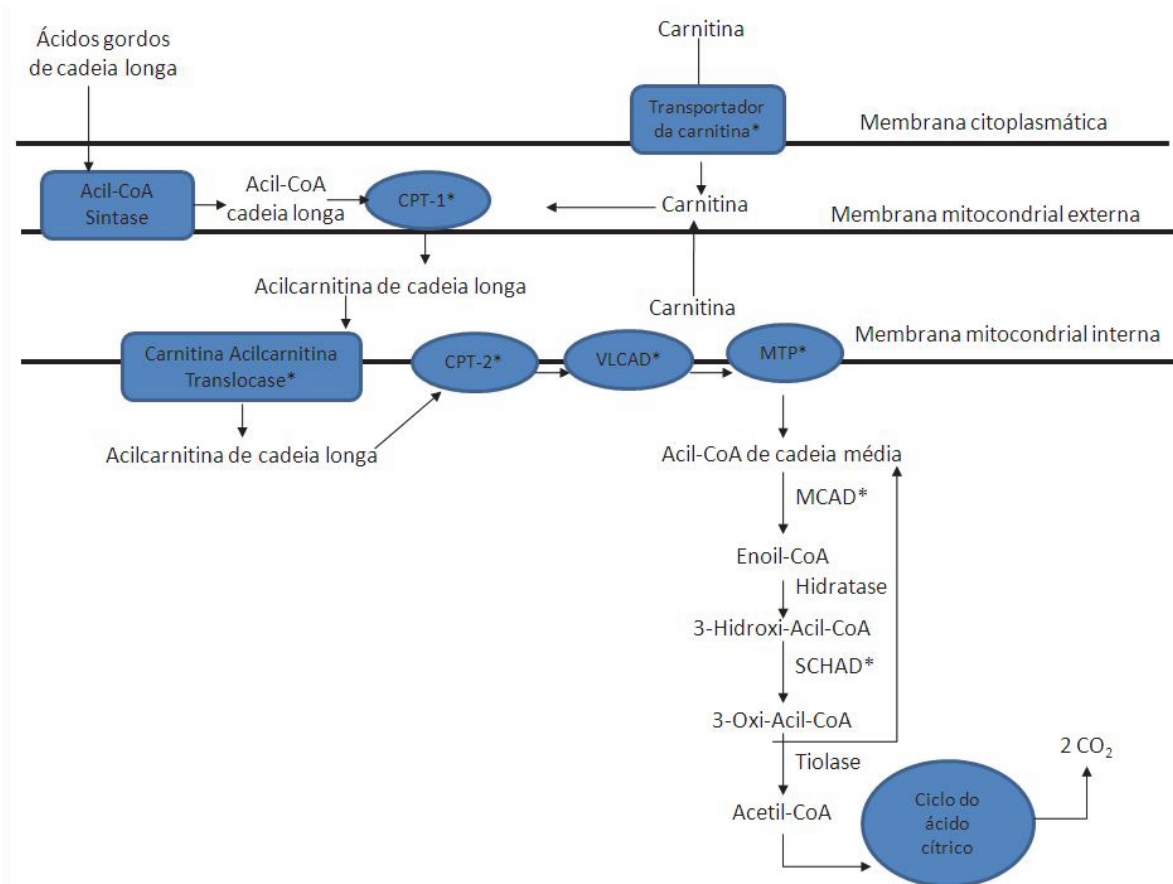


Figura 1.7 - Metabolismo da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos.

Abreviaturas - CPT1 carnitina palmitoil-transferase I, CPT2 carnitina palmitoil-transferase II, MCAD desidrogenase dos ácidos gordos de cadeia média, MPT proteína trifuncional mitocondrial, SCHAD desidrogenase dos hidroxiácidos de cadeia curta, VLCAD desidrogenase dos ácidos gordos de cadeia muito longa

LCHAD - défice da desidrogenase dos hidroxiácidos de cadeia longa.

Clinica: pode manifestar-se no período neonatal com letargia, acidose metabólica, taquipneia e ligeira hipotonia, ou mais tardiamente com vômitos, sonolência, má evolução ponderal, hepatomegalia, hipotonia e debilidade muscular. A cardiomiopatia, que muitas vezes é detectada no primeiro ano de vida, pode ser dilatada ou hipertrófica (Martins *et al.*, 1996). As descompensações metabólicas podem manifestar-se com quadros de síndrome *Reye-like* e/ou rabdomiólise e podem deixar sequelas neurológicas como atraso mental, epilepsia e alterações no tonus (Tyni *et al.*, 1997).

VLCAD - déficit da desidrogenase dos ácidos gordos de cadeia muito longa.

Clínica: as formas mais graves com início no primeiro ano de vida estão associadas a cardiomiopatia hipertrófica, arritmias e por vezes, derrame pericárdico sendo a mortalidade associada ao primeiro episódio de descompensação de 75%. Formas menos graves podem surgir mais tardiamente, com clínica semelhante à descrita para a MCAD. Podem também ocorrer outros fenótipos na adolescência ou idade adulta, com dor muscular e rabdomiólise desencadeada por exercício ou stress e uma evolução progressiva (Quintana e Crespo, 2010).

TC - déficit do transportador da carnitina, déficit primário em carnitina.

Clínica: pode manifestar-se em qualquer idade, havendo um predomínio de sintomas musculares (fraqueza muscular) e cardíacos (cardiomiopatia). Podem também ocorrer morte súbita ou episódios de hipoglicemia hipocetótica (Stanley *et al.*, 2006).

CPT I - déficit da carnitina palmitoil-transferase I.

Clínica: as manifestações surgem no PNN ou nos primeiros meses de vida, com falência hepática, falência multiorgânica, quadros *Reye-like* e por vezes acidose tubular renal. Não está descrito atingimento muscular (Stanley *et al.*, 2006).

CPT II - déficit da carnitina palmitoil-transferase II.

Clínica: podem considerar-se duas formas de apresentação. A forma grave, com cardiomiopatia e arritmias, associada a falência hepática e multiorgânica e, por vezes, com anomalias congénitas. A forma menos grave surge na adolescência ou idade adulta com episódios intermitentes de dor muscular e rabdomiólise desencadeados pelo exercício físico, jejum ou situações de *stress* metabólico (Stanley *et al.*, 2006).

MADD - déficit múltiplo das desidrogenases dos ácidos gordos.

Clínica: podem considerar-se três fenótipos clínicos: tipo I – apresentação neonatal com anomalias congénitas; tipo II – apresentação neonatal sem anomalias; tipo III – forma ligeira de apresentação mais tardia. As formas graves apresentam-se com hipotonia, hipoglicemia, acidose metabólica e/ou hiperamonemia e com alterações congénitas (tipo I) como rins displásicos, anomalias cardíacas e cerebrais. Enquanto as formas tardias podem surgir com episódios intermitentes de vômitos e letargia, durante episódios de

catabolismo, que podem ser letais, ou com quadros de miopatia progressiva (Loehr *et al.*, 1990).

A base comum do tratamento de todas estas doenças consiste em evitar períodos de jejum e assegurar um aporte calórico que evite a lipólise durante períodos de stress metabólico. Estão recomendados restrição lipídica e incremento da ingestão de hidratos de carbono, excepto nos défices em MCAD e primário em carnitina (TC). Nos defeitos da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos de cadeia longa (LCHAD, VLCAD, CPT I e CPT II), está indicada uma restrição em triglicéridios de cadeia longa e suplementação em triglicérideos de cadeia média, ácidos gordos essenciais e vitaminas lipossolúveis. Nos doentes com MADD faz-se em simultâneo restrição lipídica e proteica.

As descompensações agudas devem ser tratadas a nível hospitalar com aporte elevado de glicose por via endovenosa (7 a 12mg/kg/minuto).

O tratamento com carnitina é efectuado de forma sistemática quando há défice do transportador e nas outras situações apenas quando há um défice secundário. A riboflavina está indicada nas formas de MADD que respondem a este cofactor (Spiekerkoetter, 2009; Quintana e Crespo, 2010).

1.4 - Rastreio Metabólico: Desafios para o Futuro

O rastreio neonatal tem uma cobertura muito heterogénea a nível mundial (Figura 1.8), abrangendo apenas cerca de 30% do total de 134 milhões dos RN que nascem anualmente. Destes, 67 milhões nascem na Ásia onde apenas são rastreados 10% (Declaração de Cebu 2008).

No futuro os objectivos serão necessariamente diferentes nos países desenvolvidos e nos países em vias de desenvolvimento.

Não faz sentido falar de rastreio neonatal em países onde mais de 50% das crianças não são vacinadas e onde a mortalidade infantil é superior a 20% (Agarwal WK, 2008). No entanto, se tivermos em conta que o hipotiroidismo congénito é responsável pelo atraso cognitivo em 22.000 crianças por ano (Padilla e Therrell, 2007), e tendo em conta a acessibilidade e o preço do tratamento, é licito pensar que este rastreio venha a ser alargado a estes países. O rastreio da drepanocitose, doença que atinge 1% da população em África, não é dispendioso e poderá contribuir para reduzir a mortalidade infantil (Bain JB, 2009).

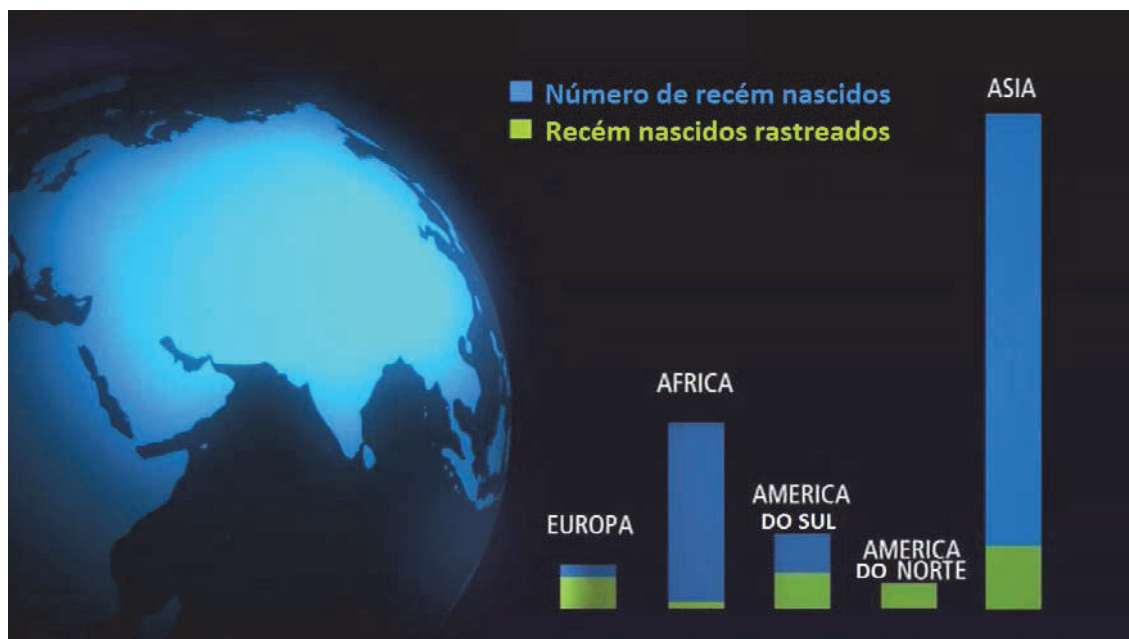


Figura 1.8 - Percentagem dos RN rastreados nos vários continentes. Europa 80%, África 5%, América do sul 50%, América do norte 99%, Ásia 10%

Nos países desenvolvidos, a perspectiva de novos tratamentos e medidas preventivas, o aparecimento de novos meios de diagnóstico e a persecução do ideal em termos de cuidados de saúde, faz prever que no futuro a tendência seja para alargar o painel de rastreio a novas patologias (Wilcken B, 2011).

Dos novos tratamentos recentemente comercializados ou ainda em fase de ensaio clínico destacam-se os tratamentos de substituição enzimática, as substâncias que promovem a estabilização da enzima deficitária (*pharmalogical chaperones*) e a terapia génica. Destes, a maior polémica em relação ao rastreio neonatal coloca-se para as doenças lisosomais, em que a terapêutica de substituição enzimática é particularmente dispendiosa e sem evidência de benefícios a nível do sistema nervoso central (Connock *et al.*, 2006).

Os avanços recentes nas bio e nanotecnologias levaram ao desenvolvimento de novos microsistemas, para separação e análise de biopartículas, que substituirão os sistemas analíticos clássicos. Destacam-se numerosos aparelhos com *microchips*, ultra-sensíveis e capazes de analisar produtos biológicos complexos como o sangue. Estas novas tecnologias, denominadas *digital microfluidics* permitem entre outras aplicações, o estudo enzimático, imunológico e molecular, com uma relação custo benefício favorável e poderão ser incorporadas no rastreio neonatal de doenças lisosomais, peroxisomais, hematológicas e imunológicas num futuro não muito longínquo, abrindo portas a uma nova era do rastreio (Millington *et al.*, 2010).

II. OBJETIVOS

O rastreio neonatal alargado veio possibilitar a identificação em simultâneo, de um grande número de doenças metabólicas, nos primeiros dias de vida, aspecto a que se associa um elevado número de questões de ordem prática e ética, objecto de discussão marcada na actualidade.

Mercê da experiência clínica adquirida ao longo dos anos, quer no seguimento de doentes com fenilcetonúria rastreados no PNDP, quer no diagnóstico e tratamento de inúmeros doentes com patologia metabólica sintomática, no presente trabalho propusemo-nos avaliar qual o contributo que o diagnóstico pré-sintomático das DHM tem na saúde das crianças rastreadas e na das respectivas famílias.

Os principais objectivos deste estudo incidem sobre várias vertentes:

1. Avaliar o contributo do diagnóstico precoce para a redução da mortalidade e morbilidade que se associam a este grupo de patologias.
2. Estudar as repercussões do diagnóstico pré-sintomático nas famílias, nomeadamente a importância do rastreio familiar e a possibilidade de um aconselhamento genético e disponibilidade de diagnóstico pré-natal.
3. Contribuir para o estudo epidemiológico da população portuguesa em algumas destas doenças, e tentar estabelecer uma correlação genótipo/fenótipo das mesmas.
4. Aprofundar o conhecimento das patologias rastreadas, destacando as especificidades identificadas na população portuguesa.

III. DOENTES E MÉTODOS

Neste capítulo descreve-se a metodologia geral utilizada na elaboração deste trabalho.

1. A amostra objecto da presente avaliação, incluiu 253 doentes com patologia metabólica. Destes, foram objecto de especial atenção 93 doentes afectados pelas patologias incluídas recentemente no painel de rastreio metabólico neonatal alargado em Portugal, diagnosticados em fase sintomática, ou seleccionados por aquele programa de rastreio, na sua maioria em fase pré-sintomática. Os outros doentes, um total de 160, são portadores de fenilcetonúria.

Foram incluídos neste estudo, doentes com proveniências distintas:

- a) Unidade de Doenças Metabólicas do Hospital Maria Pia - Centro Hospitalar do Porto, a qual se encontra em funcionamento desde 1994. Nesta Unidade são seguidas 345 crianças com DHM. Foram incluídos no presente estudo 85 doentes, 45 diagnosticados clinicamente (22 aminoacidopatias, 13 acidúrias orgânicas e 10 defeitos da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos) e 40 doentes identificados pelo rastreio neonatal (20 aminoacidopatias, 10 acidúrias orgânicas e 10 defeitos da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos).
 - b) Centros Nacionais de Tratamento de DHM, com o intuito de obter uma visão nacional no referente à realidade de algumas patologias especialmente raras, 8 doentes (4 com leucínose, 2 com MADD e 2 com argininemia).
 - c) Consulta de Doenças Metabólicas Centro de Genética Médica Doutor Jacinto de Magalhães, no âmbito de um protocolo de colaboração conjunta. Nesta consulta estão em seguimento 160 doentes com fenilcetonúria, 139 dos quais rastreados precocemente.
2. Foi efectuado um estudo comparativo da história natural da doença nos doentes sintomáticos vs doentes rastreados, a qual incluiu (i) a idade de diagnóstico, (ii) marcadores bioquímicos ao diagnóstico, (iii) o desenvolvimento psicomotor, (iv) a evolução estatoponderal, (v) o envolvimento multiorgânico, (vi) o número e gravidade dos episódios de descompensação e (vii) a mortalidade. A recolha de dados foi efectuada com base nas tabelas A (Anexo I) e tabela B (Anexo II) que figuram em anexo.

Consideramos duas fases na avaliação clínica dos doentes:

- a) Período inicial - em que o médico do centro de tratamento, após ser informado pelo Laboratório Nacional de Rastreio, contactou telefonicamente a família e marcou uma primeira consulta de avaliação. A admissão hospitalar foi imediata, quando houve suspeita de que o RN não se

encontrava clinicamente bem, ou no caso de doenças com uma grande probabilidade de descompensação precoce, como a leucinose, citrulinemia, acidúrias argininosuccínica, metilmalónica, propiónica e isovalérica. Nas restantes situações, a marcação foi efectuada com carácter de urgência menor. Nesta primeira consulta a família foi informada sobre a situação identificada, elaborada a história clínica, feita a observação do RN, feitas colheitas para confirmação do diagnóstico e iniciada terapêutica quando tal se justificava.

- b) Longo prazo - em que a abordagem clínica e bioquímica dos doentes, embora personalizada, se baseou na utilização de protocolos de tratamento e seguimento nacionais e internacionais. A abordagem foi multidisciplinar, com especial destaque para o seguimento em nutrição, psicologia, pedopsiquiatria, neuropediatria e várias outras especialidades, dependendo do envolvimento multiorgânico de cada doente.
3. Após identificação do caso *índice*, foi sempre efectuado um aconselhamento genético e oferecida a possibilidade de um diagnóstico pré-natal nas doenças em que o mesmo se justificava. Foi também efectuado com base em consentimento informado, o rastreio a familiares, das doenças que apesar de poderem permanecer assintomáticas durante longos períodos de tempo podem manifestar-se subitamente de forma aguda com episódios eventualmente fatais.
4. Além da vertente clínica, foram também efectuados estudos moleculares e epidemiológicos em colaboração com outros centros de tratamento, com o Centro de Genética Médica Jacinto de Magalhães – INSA e Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP). Estes estudos tiveram o consentimento informado dos pais.

Os métodos específicos dos estudos efectuados, que fazem parte dos artigos publicados e que figuram na secção dos resultados, são referidos nos respectivos manuscritos.

IV. RESULTADOS

Este capítulo é composto de 11 artigos científicos, os quais estão divididos em três grupos de acordo com os objectivos propostos para a elaboração da presente tese:

- Evolução clínica favorável dos doentes metabólicos como consequência do seu diagnóstico pré-sintomático ou precoce.
- Importância do rastreio alargado nas famílias.
- Interesse do estudo epidemiológico nas novas doenças rastreadas.

Embora em cada artigo se aborde mais do que um aspecto e por conseguinte o seu conteúdo não seja estanque, foi considerado para esta divisão o tema predominante de cada trabalho.

4.1- Evolução clínica favorável dos doentes metabólicos como consequência do seu diagnóstico pré-sintomático ou precoce

4.1.1- Aminoacidopatias e acidúrias orgânicas

Artigo 1 - *Avaliação da efectividade do tratamento das doenças metabólicas tipo intoxicação diagnosticadas no período sintomático. Acta Pediatr Por 2008;39:233-9.*

Foi efectuado um estudo retrospectivo baseado na análise dos processos dos doentes com as aminoacidopatias e acidúrias orgânicas mais frequentes, diagnosticadas de forma sintomática (antes do início do rastreio alargado) e que estavam em seguimento na Unidade de Doenças Metabólicas do HMP no momento em que iniciei esta investigação. O objectivo deste estudo foi seleccionar e definir um grupo de doentes susceptível de servir de comparação na avaliação posterior dos doentes rastreados com a mesma patologia. Foi calculado o tempo que mediou entre o aparecimento dos primeiros sintomas e o diagnóstico e as consequências deste atraso na morbidade e mortalidade dos doentes.

Artigo 2 - *Consenso para o tratamento nutricional da Leucinose. Acta.Pediatr Por 2007; 38: 120-28.*

Na tentativa de uniformizar a abordagem terapêutica dos doentes com DHM Proteico foram elaborados pelos Centros de Referência protocolos de tratamento e seguimento. Estes protocolos tiveram o apoio e a aprovação da Sociedade Portuguesa de Doenças Metabólicas e foram publicados na revista da Sociedade Portuguesa de Pediatria. Na Unidade de Doenças Metabólicas do HMP elaboramos o protocolo de tratamento da leucinose por ser uma patologia particularmente frequente em seguimento na nossa Unidade.

Artigo 3 - *Neonatal cholestasis: an uncommon presentation of hyperargininemia. J Inherit Metab Dis – DOI 10.1007/s10545-010-9263-7.*

A argininemia assume especial relevo na nossa população, uma vez que é mais frequente em Portugal do que nos restantes países europeus.

As formas de apresentação neonatal desta patologia do ciclo da ureia são especialmente graves e extremamente raras o que nos motivou a fazer uma revisão dos casos com esta

forma de apresentação referidos na literatura e a descrever a evolução clínica de dois casos, com apresentação precoce em seguimento na Unidade de Doenças Metabólicas do HMP, um diagnosticado na fase sintomática e outro rastreado. Estes dois doentes, para além da apresentação neonatal, têm em comum a colestase sugerindo que esta pode ser a forma de apresentação na argininemia. O doente rastreado embora aparentemente assintomático apresentava valores aumentados de amónia e iria seguramente evoluir para coma se não tivesse sido detectado através do Programa de Diagnóstico Precoce.

Avaliação da efectividade do tratamento das doenças metabólicas tipo intoxicação diagnosticadas no período sintomático

Esmeralda Martins¹, Clara Barbot¹, Maria Luís Cardoso², Ermelinda Silva³, Laura Vilarinho²

1 - Unidade Metabolismo, Centro Hospitalar do Porto, Unidade Maria Pia, Porto

2 - Centro de Genética Médica, INSA, Porto

3 - Centro Hospitalar do Porto, Unidade Maria Pia, Porto

Resumo

Objetivos: Avaliar a efectividade do tratamento nas doenças hereditárias do metabolismo tipo intoxicação diagnosticadas em crianças sintomáticas.

Método: Avaliação clínica e bioquímica retrospectiva dos doentes com aminoacidopatias e acidúrias orgânicas, mais frequentemente diagnosticadas no Norte de Portugal, entre Janeiro 1990 e Dezembro 2006, através de recolha de dados registados nos processos clínicos. Os doentes foram divididos por grupos de patologia e idade de aparecimento. Registou-se idade de início dos sintomas, forma de apresentação, idade de diagnóstico e de início de tratamento, adesão à terapêutica, descompensações e evolução.

Resultados: Foram identificados e incluídos 22 doentes com doenças hereditárias do metabolismo nomeadamente: leucínose, homocistinúria, argininemia e acidúrias metilmalónica, propiônica e 3-hidroxi-3-metilglutárica. Em oito casos a apresentação foi neonatal (início de sintomas entre o terceiro e o 13º dias de vida) com diagnóstico e respectivo início de tratamento dois a cinco dias após. Nas formas de apresentação tardia os sintomas surgiram entre o mês e os 16 anos de idade com diagnóstico e início de tratamento em média 2,8 anos mais tarde. A adesão à terapêutica foi adequada nas duas formas de apresentação. No total de doentes avaliados há a salientar que dois doentes faleceram, que um tem má evolução estado-ponderal e sequelas neurológicas graves e que onze apresentam atraso cognitivo ligeiro a moderado.

Conclusões: O período de tempo que decorreu entre a apresentação clínica sintomática e o início do tratamento foi excessivamente longo, sobretudo para as formas tardias, levando ao aparecimento de lesões que mesmo um tratamento correctamente efectuado não conseguiu regredir.

Palavras-chave: Doenças hereditárias do metabolismo, aminoacidopatias, acidúrias orgânicas, diagnóstico sintomático, avaliação da efectividade do tratamento

Acta Pediatr Port 2008;39(6):233-9

Recebido: 05.07.2007

Aceite: 14.11.2008

Evaluation of treatment effectiveness in intoxication type inborn errors of metabolism diagnosed in symptomatic state

Abstract

Aims: Evaluation of treatment effectiveness in inborn errors of metabolism, intoxication type, diagnosed in symptomatic children.

Methods: The authors present a retrospective clinical and biochemical evaluation of patients with the more frequently diagnosed amino acid metabolism and organic acid disorders. The study was performed in North of Portugal, from January 1990 to December 2006, and the data was obtained from consultation of the clinical files. The patients were divided by groups of pathology and age of presentation. The age of beginning of the symptoms, presentation from age of diagnosis and of beginning of handling, adherence to the therapeutic, decompensations and clinical course were registered.

Results: In this study 22 patients were identified and included with inborn errors of metabolism, namely: MSUD, homocystinuria, argininemia, methylmalonic, propionic and 3-hydroxy-3-methylglutaric acidurias. Eight cases had neonatal presentation (first symptoms between the 3rd and the 13th days of life) with diagnosis and therapeutic approach 2 to 5 days later. In the late-onset presentation the symptoms appeared between one month and 16 years of age with diagnosis and beginning of handling on average 2.8 years after. Therapeutic adherence was good in the two clinical forms of presentation. Presently, in this cohort of patients, two deceased, one has failure to thrive and severe neurological disease, eleven present slight to moderate mental retardation and the remaining are normal.

Conclusions: The elapsed time between the symptomatic clinical presentation and the beginning of the handling was too long, mainly for the late-onset cases, leading to the

Correspondência:

Esmeralda Martins
 Unidade Metabolismo
 Centro Hospitalar do Porto, Unidade Maria Pia
 Rua da Boavista, n.º 87, 4050-111 Porto
 Telefone: 226089900
 esmeraldamartins@portugalmail.pt

appearance of disabilities that otherwise would have been avoided.

Key Words: Inborn errors of metabolism, amino acid metabolism disorders and organic acid disorders, symptomatic diagnosis, effectiveness evaluation

Acta Paediatr Port 2008;39(6):233-9

Introdução

Ao longo dos últimos 50 anos, o desenvolvimento científico e tecnológico permitiu o reconhecimento de um grande número de doenças hereditárias do metabolismo (DHM). Embora todos os diagnósticos sejam importantes, a identificação de doenças metabólicas tratáveis assume a maior relevância devido à necessidade de se dar início urgente a uma terapêutica adequada ^{1,2}.

Na área do metabolismo após o êxito que foi o tratamento pré-sintomático da fenilcetonúria, novas terapêuticas têm vindo a ser testadas para as DHM, umas com sucesso efectivo salvando a vida a centenas de doentes, outras com carácter mais experimental e menos promissoras ².

Actualmente, são cada vez em maior número, os doentes metabólicos que atingem a idade adulta, levantando-se novas questões sobre os métodos actuais de diagnóstico, tratamento e seguimento. A avaliação da história natural de grandes séries de doentes, envolvendo estudos multicêntricos, é fundamental porque nos permite avaliar quais os factores do tratamento e seguimento que são efectivamente importantes a longo prazo ^{2,3}.

Fazem do grupo das doenças metabólicas tratáveis, as aminoacidopatias, as acidúrias orgânicas, as do ciclo da ureia e as devidas à intolerância aos açúcares. Neste primeiro grupo de doenças (referidas como tipo intoxicação na classificação fisiopatológica, o tratamento requer a remoção imediata dos metabolitos tóxicos para o doente através da utilização de dietas específicas, técnicas de remoção extra corporal, fármacos depuradores ou vitaminas que são cofactores enzimáticos. O outro grande grupo de patologias metabólicas tratáveis integra parte das doenças com alteração do metabolismo energético como os defeitos da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos, glicólise, neoglicogénese, cetogénese e cetólise, glicogenoses e hiperinsulinismo. Neste segundo grupo, o tratamento consiste em evitar períodos de jejum e aumentar o aporte de hidratos de carbono particularmente durante intercorrências infecciosas ¹.

Neste estudo é feita a avaliação de doentes com DHM tipo intoxicação, sendo incluídas as patologias que foram diagnosticadas com maior frequência nomeadamente leucínose, homocistinúria e argininemia e ainda as acidúrias metilmalónica, propiónica e 3-hidroxi-3-metilglutárica.

Em termos bioquímicos a leucínose (*Mendelian Inheritance in Man* - MIM # 248600) e as acidúrias metilmalónica (MIM # 251000) e propiónica (MIM # 232000) resultam de um bloqueio enzimático no catabolismo dos aminoácidos ramificados (leucina, valina e isoleucina). A clínica pode surgir no período neonatal com recusa alimentar, letargia progressiva e

evolução para coma após um intervalo livre de sintomas ou manifestar-se mais tardiamente quer por episódios de descompensação aguda intermitente, quer de forma crónica e progressiva com hipotonia, má evolução estatoponderal e atraso de desenvolvimento psicomotor ^{4,5}.

A acidúria 3-hidroxi-3-metilglutárica (MIM # 246450) é também uma doença que afecta o catabolismo da leucina e simultaneamente a produção de corpos cetónicos (cetogénese). Esta patologia tem um mecanismo misto com uma fisiopatologia de doença tipo intoxicação e de defeito do metabolismo energético. Clinicamente caracteriza-se por episódios de vómitos e letargia com evolução para coma. Cerca de metade dos casos têm início neonatal com episódios de hipoglicemia sintomática ^{6,7}.

A homocistinúria (MIM # 236200) por défice de cistationina β - sintetase é a alteração mais frequente do metabolismo da metionina. A clínica é caracterizada pelo envolvimento dos órgãos alvo, nomeadamente olho (luxação do cristalino), esqueleto (dolicoestenomegalia e aracnodactilia), sistema vascular (tromboembolismo) e sistema nervoso central (atraso cognitivo e acidentes vasculares cerebrais) ^{8,9}.

A argininemia (MIM # 207800) é uma doença do ciclo da ureia causada pelo défice em arginase I. Tipicamente apresenta-se com um quadro de paraparesia espástica progressiva e atraso mental, sendo o envolvimento hepático menos grave comparativamente com as outras doenças do ciclo da ureia ^{10,11}.

Pretende-se com este estudo, avaliar a evolução dos doentes diagnosticados no estado sintomático, quer no período neonatal ou mais tardiamente, realçando a heterogeneidade clínica das patologias referidas anteriormente.

População e métodos

Local: Hospital Pediátrico de nível III

Crítérios de inclusão: doentes com DMH passíveis de tratamento que foram diagnosticados no estado sintomático entre 1990 e 2006. Consideramos as aminoacidopatias e as acidúrias orgânicas diagnosticadas com maior frequência na Região Norte antes do início do rastreio neonatal alargado integrado no Programa Nacional de Diagnóstico Precoce. Assim, foram incluídos 17 doentes com aminoacidopatias (6 leucínoses, 7 homocistinúrias clássicas e 4 argininemias) e 5 acidúrias orgânicas (2 acidúrias metilmalónicas, 1 acidúria propiónica, 2 acidúrias 3-hidroxi-3-metilglutáricas).

Todos os casos em seguimento que cumpriam os critérios estabelecidos foram incluídos no estudo.

Métodos: Estudo retrospectivo com recolha de dados a partir do processo clínico. Em todos os doentes foi avaliada a história familiar, idade de início dos sintomas, forma de apresentação, idade de diagnóstico e de início de tratamento, adesão à terapêutica, descompensações e evolução.

A avaliação metabólica que permitiu o diagnóstico (em 21/22 doentes), e os controlos bioquímicos posteriores foram efectuados no centro de referência para o diagnóstico de doenças metabólicas na Região Norte.

Foram considerados como critérios de sucesso o crescimento e desenvolvimento cognitivo normais (avaliados respectivamente por tabelas de peso - estatura e escalas de desenvolvimento: Griffiths até aos 6 anos e Wisc III posteriormente), associados a um bom controlo nutricional e metabólico com marcadores bioquímicos dentro de limites considerados para as patologias.

A adesão à terapêutica foi avaliada pelo crescimento e desen-

volvimento, controlos bioquímicos e episódios de descompensação não relacionados com doenças agudas desencadeantes.

Resultados

Os resultados globais são apresentados de forma sumária para as aminoacidopatias no Quadro I e para as acidúrias orgânicas no Quadro II.

Quadro I - Manifestações clínicas, diagnóstico e evolução de 17 doentes com aminoacidopatias

DOENÇA	Doente	Sexo	Idade Início		Idade	Diagnóstico	Diagnóstico	Idade	Evolução
			Sin-tomas	Sintomas					
Leucinoze	1	M	6 D	Recusa alimentar Letargia	8 D	↑ Val e Ile Leu 3167 µmol/L (VR 68-158)	Q267X / Q267X	12 A	Dificuldades de aprendizagem (QG 80)
	2	F	8 D	Má evolução ponderal Coma - convulsões	13 D	↑ Val e Ile Leu 3283 µmol/L	P200X / P356L	13 A	QG 93
	3	F	5 D	Recusa alimentar Coma - convulsões	8 D	↑ Val e Ile Leu 3287 µmol/L	P200X / I214K	—	Sequelas neuroológicas Morte aos 7 anos
	4	M	7 D	Letargia	9 D	↑ Val e Ile Leu 1889 µmol/L	H37VfsX3 / H37VfsX3	2 A	Desenvolvimento psicomotor normal
	5	M	20 M	Episódios de distonia e sonolência	27 M	↑ Val e Ile Leu 495 µmol/L	A220V / y413H	8 A	Dificuldades de aprendizagem (QG 76)
	6	M	33 M	Episódios de ataxia recorrente	3 A	↑ Val e Ile Leu 314 µmol/L	D152N /D152N	16 A	Dificuldades escolares após adolescência (QG 96)
Homocistinúria	7	M	1 A	Hipotonia Atraso no desenvolvimento	4 A	↑ Met, ↓ Cys Homocisteína 240 µmol/L (VR 4,2-14,6)	T191M / T191M	12 A	Atraso cognitivo Defice visual Alterações esqueléticas
	8	M	6 A	Fenotipo marfanóide Atraso cognitivo Luxação do cristalino	13 A	↑ Met, ↓ Cys Homocisteína 240 µmol/L	T191M / T191M	18 A	Atraso cognitivo Defice visual Alterações esqueléticas
	9	F	6 A	Fenotipo marfanóide Atraso cognitivo	15 A	↑ Met, ↓ Cys Homocisteína 215 µmol/L	T191M / T191M	20 A	Atraso cognitivo Defice visual Alterações esqueléticas
	10	F	16 A	Trombose venosa cerebral	16 A	↑ Met, ↓ Cys Homocisteína 280 µmol/L	T191M / T191M	21 A	Epilepsia
	11	F	6 A	Atraso cognitivo	10 A	↑ Met, ↓ Cys Homocisteína 188 µmol/L	T191M / T191M	17 A	Atraso cognitivo
	12	M	5 A	Atraso cognitivo Luxação do cristalino	14 A	↑ Met, ↓ Cys Homocisteína 216 µmol/L	T191M / T191M	20 A	Atraso cognitivo Defice visual
	13	F	6 A	Defice visual Luxação do cristalino	7 A	↑ Met, ↓ Cys Homocisteína 179 µmol/L	N D	8 A	Sem defice cognitivo
Argininemia	14	F	1 M	Colestase neonatal	2 M	Arg 1756 µmol/L (VR 20-140) NH ₄ 180 µmol/L (VR 45-80)	R21X / R21X	15 A	Transplante hepático Exame neurológico e Desenvolvimento cognitivo normais
	15	F	9 M	Elevação das transaminases	18 M	Arg 485 µmol/L NH ₄ 90 µmol/L	R21X / R21X	15 A	Transplante hepático Paraparesia estável
	16	M	3 A	Alteração na marcha	4 A	Arg 560 µmol/L NH ₄ 80 µmol/L	R21X / ?	16 A	Paraparesia progressiva Atraso cognitivo
	17	M	4 A	Letargia Convulsões	5 A	Arg 923 µmol/L NH ₄ 196 µmol/L	R21X / ?	23 A	Paraparesia progressiva Atraso cognitivo

Legenda: Arg - Arginina / Cys - Cistina / Hom - Homocistina / Ile - Isoleucina / Leu - Leucina / Met - Metionina / NH₄ - Amónia / Val - Valina / D - Dias / M - Meses / A - Anos / VR - Valor de Referência

Quadro II - Manifestações clínicas, diagnóstico e evolução de 5 doentes com acidúrias orgânicas

DOENÇA	Doente	Sexo	Idade Início		Idade	Diagnóstico		Idade	Evolução
			Sin-tomas	Sintomas		Diag-nóstico	Bioquímico		
Acidúria Metilmalónica	18	F	6 D	Desidratação Letargia, Hipotonia	8 D	AMM 10.250 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creat (VR-n.d)	V399FsX24/R31X	20 meses	Desenvolvimento psicomotor normal QG 98
	19	F	6 M	Má evolução ponderal Hipotonia	9 M	AMM 30.550 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creat	ND	8 anos	Desenvolvimento e crescimento normais (QG 105)
Acidúria Propiónica	20	M	3 D	Letargia - coma Hipotermia	4 D	3-OH-propiónico 9.965 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creat (VR-n.d) propionilglicina 193 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creat (VR-n.d)	ND	6 anos	Sequelas neuroológicas graves
Acidúria 3-Hidroxi 3-Metilglutárica	21	F	2 D	Hipotonia Convulsões	3 D	3HMG 4.250 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creat (VR-n.d)	E37X / E37X	4 anos	Desenvolvimento e crescimento normais (QG 95)
	22	M	4 D	Coma Convulsões Morte aparente	5 D	3HMG 5.430 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creat	E37X / E37X	—	Sequelas neuroológicas graves Morte aos 5 meses

Legenda: AMM - Ácido metilmalónico / 3HMG - Ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico / Creat - Creatinina / D - Dias / M - Meses / VR - Valor de Referência / ND - Não Determinado

Aminoacidopatias

Leucínose: Dos 6 doentes estudados, quatro tiveram revelação neonatal e dois, apresentação tardia. A história familiar era irrelevante havendo a referir consanguinidade apenas num caso.

Clínica – Nas formas de apresentação neonatal a clínica surgiu entre o 5 e 8º dias de vida com recusa alimentar, letargia, hipotonia e convulsões. Nas formas de apresentação tardia as manifestações clínicas foram distintas: um caso apresentou-se com episódios de distonia aos 20 meses (Doente 5) e o outro com episódios de ataxia recorrente aos 33 meses (Doente 6). A pesquisa de corpos cetónicos foi positiva em três das formas neonatais e numa das tardias.

Tratamento – Em dois dos casos de apresentação neonatal, pela maior deterioração neurológica e intolerância digestiva foram efectuadas técnicas de depuração exógena (diálise peritoneal). Os restantes doentes fizeram depuração endógena com administração a débito contínuo, por via oral de uma mistura com carga calórica elevada associada a perfusão endovenosa de insulina endovenosa. Em todos os casos a resposta ao cofactor enzimático, tiamina, foi negativa.

Actualmente cumprem uma dieta restrita em proteínas, enriquecida com uma mistura de aminoácidos essenciais isenta em aminoácidos ramificados.

Evolução – Os doentes com apresentação neonatal tiveram mais episódios de descompensação, todos de curta duração e com valores de leucina inferiores a $1000\mu\text{mol}/\text{L}$, excepto o Doente 1 com dois episódios de coma e valores superiores a $1500\mu\text{mol}/\text{L}$. Nas formas de apresentação tardia, após diagnóstico não houve novos episódios de descompensação com alterações neurológicas.

A Doente 3 (que sofreu peritonite no período neonatal) ficou com sequelas neurológicas graves e faleceu aos sete anos de

idade. Os outros doentes têm actualmente idades compreendidas entre os dois e os quinze anos de idade. Todos têm um crescimento normal e um QI entre 79 e 93 para as formas de apresentação neonatal e de 76 e 96 para os casos de revelação tardia.

Homocistinúria: Dos sete doentes diagnosticados, três são do sexo masculino, havendo a referir consanguinidade em três casos e, num caso, um irmão falecido, na sequência de uma hemorragia cerebral.

Clínica – Os doentes foram diagnosticados tardiamente, com idades compreendidas entre os quatro e os dezasseis anos. À data do diagnóstico a maioria apresentava atraso mental (cinco doentes com QI entre 54 e 75), alterações esqueléticas (quatro doentes, três com fenótipo marfanóide), luxação bilateral do cristalino (seis doentes) e num caso (Doente 10) tromboembolismo cerebral.

Tratamento – Todos os doentes foram submetidos a prova terapêutica com piridoxina (300 a 900mg/dia) e ácido fólico (10mg/dia), com ausência de resposta generalizada. Seguidamente iniciaram uma dieta hipoproteica restrita em metionina, citrato de betaína (100mg/kg/dia) e suplementos em L-cistina (200mg/kg/dia) e vitamina B12 (1mg/dia). A doente que teve o episódio tromboembólico iniciou também terapêutica com antiagregante plaquetar.

Evolução – Quatro dos doentes mantiveram-se estáveis e com valores de homocisteína total entre 50 - 60 $\mu\text{mol}/\text{L}$ e em três casos registaram-se valores superiores a 80 $\mu\text{mol}/\text{L}$ (Doentes 8 e 9). A idade actual varia entre os sete e os vinte anos de idade.

Argininemia: Nos quatro doentes, dois dos quais do sexo masculino, a história familiar é irrelevante.

Clínica – As idades de diagnóstico oscilaram entre os dois meses e os quatro anos de idade. As manifestações que leva-

ram ao diagnóstico foram: alterações da função hepática (Doentes 14 e 15), paraprésia espástica (Doente 16) e convulsões (Doente 17).

Tratamento – Dieta hipoproteica suplementada em aminoácidos essenciais e benzoato de sódio 250 a 300mg/kg/d.

Evolução – Três doentes têm paraprésia espástica (Doentes 15, 16 e 17) e destes, dois (Doente 16 e 17) têm atraso cognitivo que se tem vindo a tornar mais evidente com a idade. A doente 14, que foi diagnosticada aos 2 meses de idade, nunca teve clínica neurológica.

Foi efectuado o transplante hepático com evolução positiva em dois casos: na doente 14 (pela doença hepática terminal) e na doente 15 (pela paraprésia moderada que estabilizou após o transplante).

Têm actualmente idades compreendidas entre os quinze e os vinte e três anos de idade.

Acidúrias orgânicas

- **Acidurias metilmalónica e propiónica:** Foram identificadas em três doentes, dois casos de apresentação neonatal (uma acidúria metilmalónica e uma propiónica) e um caso de apresentação tardia (acidúria metilmalónica). No doente 19 os pais são primos em primeiro grau.

Clínica – Nos doentes com apresentação neonatal, a clínica teve início ao 3º e 6º dias de vida com recusa alimentar, hipotonia e coma associado a hipoglicémia, acidose metabólica e desidratação. Num caso mais grave (Doente 20) ocorreu hipotermia (temp. rectal 32º) e hipotensão. A forma de apresentação tardia (Doente 19) tinha rejeição electiva para alimentos ricos em proteínas, e má evolução ponderal a partir da data da diversificação alimentar, associada a hipotonia e apatia.

Tratamento – As formas neonatais fazem dieta restrita em proteínas naturais e enriquecida com uma mistura de aminoácidos essenciais suplementada com carnitina e ciclos de antibiótico oral com metronidazol. A acidúria metilmalónica de apresentação tardia teve uma resposta favorável à suplementação em vitamina B12 estando com uma restrição proteica ligeira.

Evolução – Os dois casos de acidúria metilmalónica (Doentes 18 e 19), evoluíram favoravelmente. Têm crescimento e desenvolvimento cognitivo normal, e até ao momento não se registou patologia renal. Os internamentos durante intercorrências infecciosas com vómitos ou recusa alimentar têm sido raros e sem clínica neurológica.

O doente com acidúria propiónica (Doente 20) actualmente com 7 anos, apresenta sequelas neurológicas graves, microcefalia e má evolução ponderal (faz alimentação nocturna a débito contínuo). Durante os três primeiros anos de vida teve múltiplos internamentos com infecções bacterianas e fúngicas associadas a anemia, neutropenia e hiperamoniémia nos períodos de descompensação.

- **Acidúria 3 hidroxi-3-metilglutárica:** Foi identificada em dois doentes com história familiar irrelevante.

Clínica – Dois casos de apresentação neonatal com hipoglicémia marcada (glicémia capilar não mensurável), sonolência

e convulsões. Um dos RN estava ainda internado e o quadro foi rapidamente revertido com glicose endovenosa, o outro estava no domicílio tendo dado entrada em coma profundo com hipotermia, hipotensão, acidose metabólica e hiperamoniémia.

Tratamento – Dieta com restrição lipídica e proteica com suplementos de carnitina e sobretudo evicção de períodos de jejum.

Evolução – Um dos doentes, actualmente com quatro anos de idade, tem crescimento e desenvolvimento cognitivo normais. O que foi diagnosticado em morte aparente (Doente 22) ficou com sequelas neurológicas e faleceu aos 5 meses durante uma intercorrência infecciosa.

Discussão

O diagnóstico clínico das DHM nem sempre é fácil devido à sua grande diversidade e raridade. Nas patologias com tratamento eficaz, a sua identificação tem uma importância acrescida pela necessidade imediata de início da terapêutica.

Neste trabalho, apenas consideramos as doenças tipo intoxicação e dentro destas as que são actualmente susceptíveis de serem detectadas no rastreio neonatal alargado por *tandem mass*¹².

Aminoacidopatias

Leucínose: Nos nossos doentes há um predomínio das formas de apresentação neonatal, dois terços, de acordo com o que está descrito na literatura⁴.

As manifestações clínicas são principalmente neurológicas com encefalopatia progressiva durante a primeira semana de vida. Há uma recusa alimentar com letargia evolução para coma que foi observada em todos os doentes. As formas tardias podem surgir de forma crónica com má evolução estado ponderal ou manifestar-se por episódios recorrentes de ataxia e alterações de consciência^{3,13}. Esta, foi a forma de apresentação de um dos casos tendo o outro apresentado um quadro atípico de episódios recorrentes de distonia, que ainda não tinha sido descrito previamente associado a leucínose¹⁴.

A RMN cerebral efectuada em alguns destes doentes, apresenta as alterações típicas descritas, edema cerebral, alterações de sinal nos *globus pallidus* e *thalamus*, quando efectuada em pré-tratamento ou nas fases de descompensação aguda com coma, havendo normalização da imagem cerca de um ano após^{4,14}.

Trabalhos retrospectivos de grandes casuísticas efectuados recentemente, alguns com doentes adultos com leucínose, indicam que para um desenvolvimento cognitivo normal, mais importante do que os valores de controlo a longo prazo (que se pretendem inferiores a 300µmol/L), é a precocidade de diagnóstico e o início do tratamento³. Os dois casos com pior evolução foram uma das formas de apresentação neonatal, que fez uma peritonite ao 19º dia de vida evoluindo para um segundo coma com valores de leucina de 1500µmol/L, e que viria a desenvolver um quadro de tetraparésia e atraso grave (Doente 3). O outro caso foi diagnosticado aos 2 anos e, apesar de progressos favoráveis após o início de tratamento

mantêm dificuldades de aprendizagem significativas (Doente 5). Estas crianças poderiam ter ganho com um diagnóstico mais precoce e início imediato do tratamento, sobretudo as formas tardias.

Homocistinúria: Praticamente a totalidade dos autores refere que cerca de 50% dos doentes respondem à piridoxina^{8,15}. Contudo nesta série a resposta à piridoxina foi nula. Todos os doentes estudados têm a mutação T191M em homozigotia no gene *CBS* que está associada a uma actividade enzimática praticamente nula¹⁶. O diagnóstico foi tardio em todos os casos, quando já se tinham instalado manifestações irreversíveis secundárias à hiperhomocisteinemia. De referir que em três casos (Doentes 8, 10 e 12) a detecção da luxação do cristalino tinha sido feita muitos anos antes da homocistinúria ter sido equacionada e esta não tinha sido considerado como diagnóstico diferencial.

De acordo com o que se verificou na Irlanda, onde se faz o rastreio neonatal da homocistinúria desde 1971, o tratamento precoce da doença, com controlo dos níveis plasmáticos de homocisteína, parece proteger contra as complicações associadas¹⁵.

Assim, será benéfico que seja efectuado o diagnóstico precoce para esta doença tratável que pela nossa experiência, parece estar associada a um genótipo particularmente grave, em Portugal¹⁶.

Argininemia: A apresentação típica com paraparesia espástica e atraso mental progressivo^{10,11,17} foi observada apenas num doente. Os três restantes casos foram diagnosticados sem paraparesia^{18,19} mas em dois o envolvimento neurológico progrediu neste sentido apesar do tratamento correctamente efectuado. Uma das crianças estava em tratamento desde os 10 meses de idade quando surgiram aos 32 meses as primeiras alterações neurológicas (Doente 15). A possível benignidade desta doença é refutada em trabalhos retrospectivos efectuados^{11,20}. Esta evolução desfavorável verifica-se sobretudo quando há um genótipo associado a um mau prognóstico, que é o caso dos doentes que são portadores da mutação R21X no gene *ARG 1* em que a actividade enzimática é nula¹⁷.

A única doente que não tem clínica neurológica, tem a mutação R21X em homozigotia, mas começou o tratamento aos dois meses de idade. Esta evolução está de acordo com o referido em trabalhos recentes²¹, que afirmam que um início de tratamento após um diagnóstico precoce protege das lesões cerebrais.

Embora o transplante hepático seja tratamento eficaz para as doenças do ciclo da ureia, nunca tinha sido efectuado na argininemia. O primeiro transplante hepático foi efectuado na doente 14, que aos 7 anos apresentava uma insuficiência hepática terminal, sem clínica neurológica²². Após o transplante verificou-se uma rápida normalização da amónia, arginina e compostos guanídínicos que se manteve com uma dieta proteica normal. Sete anos após a doente continua sem clínica neurológica. Posteriormente, há cinco anos, uma doente de 10 anos com paraparesia espástica progressiva e desenvolvimento cognitivo normal foi também submetida a transplante hepático com estabilização da clínica neurológica²³.

Assim, o transplante hepático deverá ser considerado um tra-

tamento alternativo na argininemia e deve ser executado precocemente quando há uma progressão da doença neurológica com o tratamento convencional ou insuficiência hepática severa.

Acidúrias orgánicas

Acidúrias metilmalónica e propiónica: Está descrito que na acidúria metilmalónica e propiónica o prognóstico é mais grave nas formas de apresentação neonatal com maior número de mortes e complicações a nível do desenvolvimento psicomotor²⁴. Nos doentes com esta forma de apresentação, um (acidúria propiónica) ficou com sequelas neurológicas graves, o outro (acidúria metilmalónica) tem um desenvolvimento e crescimento normais sendo de vigiar particularmente o envolvimento renal, a nível das complicações tardias, devido à elevada excreção urinária de ácido metilmalónico desta doente. As complicações infecciosas tal como está descrito foram também mais graves na acidúria propiónica nos primeiros anos de vida. Todos os três doentes fazem também um *follow-up* dos órgãos alvo que podem ter atingimento tardio (rim, coração, pâncreas e cérebro)²⁵.

Acidúria 3-hidroxi-3-metilglutárica: É uma das acidurias orgánicas mais frequentes na população portuguesa^{7, 26}, havendo um predomínio da mutação E37X no gene *HMGL*, que estes doentes apresentam em homozigotia. É uma doença com evolução favorável quando são evitados os episódios de descompensação aguda que podem ser fatais ou deixar sequelas graves⁷. Os casos referidos foram de apresentação neonatal e o rápido início de tratamento no doente 21, foi fundamental para uma evolução clínica favorável.

Na avaliação global desta série, constatou-se que as aminoacidopatias são mais frequentes que as acidurias orgánicas o que está de acordo com o descrito na literatura.

Dos 22 doentes avaliados cerca de 10% faleceram e 55% apresentam défices cognitivos mais ou menos graves. As manifestações clínicas neonatais observaram-se em 28% dos casos dos quais quatro são leucinoses e quatro integram o grupo das acidurias orgánicas e surgem muitas vezes na primeira semana de vida **podendo antecipar-se ao resultado do diagnóstico precoce**. Contudo, a disponibilidade de um resultado rápido que é possível pelas determinações em espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS) actualmente utilizado no rastreio neonatal permitirá uma orientação mais rápida do tratamento evitando sequelas irremediáveis e graves.

Para os casos de apresentação mais tardia, as revisões das grandes casuísticas para as patologias abordadas, são também consensuais da importância de um diagnóstico precoce para um prognóstico mais favorável^(3,10,15).

A reflexão sobre os números e as patologias diagnosticadas nos últimos 16 anos, permite-nos verificar que determinadas doenças têm indicação inequívoca para integração no Programa Nacional para o Diagnóstico Precoce como aliás se verifica actualmente. Durante o estudo piloto do rastreio neonatal alargado, a homocistinúria e a argininemia não faziam parte do bloco de patologias propostas e a nossa casuística foi importante no sentido de alterar, alargar e proporcionar um diagnóstico pré-sintomático para estas doenças.

Conclusão

Nas DMH tipo intoxicação o início de uma terapêutica adequada tem de ser precoce e prévio ao aparecimento de sintomas que muitas vezes estão associados a lesões irreversíveis. O sucesso do tratamento é determinado à partida, pelas alterações que o doente apresenta ao diagnóstico e que podem afectar negativamente toda a sua vida. O rastreio neonatal alargado implementado no nosso país desde 2005/06 é fundamental para a diminuição da morbilidade e mortalidade nestas patologias.

Referências

- Saudubray JM, Sedel F, Walter JH. Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: an introduction. *J Inherit Metab Dis* 2006; 29:261-74.
- Leonard JV. Komrower lecture: Treatment of inborn errors of metabolism: a review. *J Inherit Metab Dis* 2006; 29:275-8.
- le Roux C, E Murphy, Hallam P, Lilburn M, Orlowska D, Lee P. Neuropsychometric outcome predictors for adults with maple syrup urine disease. *J Inherit Metab Dis* 2006; 29:201-2.
- Wendel U, Ogier de Baulny H. Branched-chain organic acidurias. In: Fernandes J, Saudubray JM, van den Berghe G, Walter JH, editors. *Inborn Metabolic Diseases*. 4th ed. Berlin Heidelberg: Springer; 2006; 245-60.
- Gibson KM, Elpeleg ON, Morton DH, Wappner RS. Disorders of Leucine Metabolism. In: Blau N, Duran M, Blaskovics M, Gibson KM editors. *Physicians's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases*. 2th ed. Berlin Heidelberg: Springer; 2003; 165-89.
- Gibson KM, Breuer J, NyhanWL. 3-Hydroxy-3-methylglutaric CoA lyase deficiency: review of 18 reported patients. *Eur J Pediatr* 1998; 148:180-6.
- Cardoso ML, Leão E, Rodrigues E, Martins E, Vilarinho L. Aciduria 3-hidroxi-3-metilglutárica na população portuguesa. *Arqui Med* 2000; 14:202-6.
- Couce Pico ML, Fraga Bermidez JM. Homocistinuria y alteraciones del metabolismo de float e vitamina B12. In: P. Sanjurjo, A. Baldellou, editors. *Diagnostico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias*. 4th ed. Madrid: Ergon; 2006; 357-75.
- Skovby F. Disorders of Sulfur Amino Acids. In: Blau N, Duran M, Blaskovics M, Gibson KM editors. *Physicians's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases*. 2th ed. Berlin Heidelberg: Springer; 2003; 243-60.
- Bachmann C. Outcome and survival of 88 patients with urea cycle disorders: a retrospective evaluation. *Eur J Pediatr* 2003;162:410-6.
- De Deyn PP, Marescau B, Qureshi IA. Hyperargininemia: A treatable inborn error of metabolism? In: De Deyn PP, Marescau B, Qureshi IA, Mori A, editors. *Guanidino Compounds in Biology and Medicine*. London: Jonh Libbey &Company Ltd 1997: 53-9.
- Vilarinho L, Rocha H, Marcão A, Sousa C, Fonseca H, Bogas M, Vaz Osório R. Diagnóstico Precoce: resultados preliminares do rastreio metabólico alargado. *Acta Paediatr Port* 2006; 37:186-91.
- Norton H, Strauss K, Robinson D. Diagnosis and treatment of maple syrup disease: a study of 36 patients. *Pediatrics* 2002; 109: 99-108
- Temudo T, Martins E, Poças F, Cruz R, Vilarinho L. Maple syrup disease presenting as paroxysmal dystonia. *Ann Neurol* 2004; 56:749-50.
- Yap S, Naughten E. Homocystinuria due to cystationine β -synthetase deficiency in Ireland: 25 years of experience in newborn screened and treated population with reference to clinical outcome and biochemical control. *J Inherit Metab Dis* 1998; 21:738-47.
- Urreiziti R, Balcells S, Rodes M, Vilarinho L, Balbellou A, Couce ML et al. Spectrum of CBS mutations in 16 homocystinuric patients from the Iberian Peninsula: high prevalence of T191M and absence of 1278T or G307S. *Hum Mutat* 2003; 22: 103- 11
- Cardoso M.L., Martins E, Vasconcelos R, Vilarinho L., Rocha J. Identification of a novel R21X mutation in the liver-type arginase gene (ARG1) in four Portuguese patients with argininemia. *Hum Mutat*. 2001;14: 355-6.
- Braga AC, Vilarinho L, Ferreira E, Rocha H. Hyperargininemia presenting as persistent neonatal jaundice and hepatic cirrhosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997; 24:218-21.
- Vilarinho L, Senra V, Barbosa C, Parvy P, Rabier D, Kamoun P. A new case of argininaemia without spastic diplegia in a Portuguese male. *J Inherit Metab Dis* 1990; 13:751-2.
- Fidalgo A, Eusébio F, Tasso T, Pedroso H, Tavares de Almeida I, Cabral A. Hiperargininemia. A propósito de 3 casos clínicos. *Acta Paediatr Port* 1997; 28:231-5.
- Scaglia F, B Lee. Clinical, biochemical and molecular spectrum of hyperargininemia due to arginase I deficiency. *Am J Med Genetic* 2006;142:113-20.
- Santos Silva E, Martins E, Cardoso ML, Barbot C, Vilarinho L, Medina M. Liver transplantation in a case of argininemia. *J Inherit Metab Dis* 2001;24:885-7.
- Martins E, Santos Silva E, Cardoso ML, Barbot C, Medina M, Vilarinho L. Follow-up of two cases of hyperargininemia after liver transplantation. *J Inherit Metab Dis* 2005; 28:64.
- Cabral A, Portela R, Tasso T, Eusébio F, Tavares de Almeida I, Silveira C. Doenças dos aminoácidos de cadeia ramificada. *Acta Med Port* 1998; 11: 659-65.
- Touati G, Valayannopoulos V, Mention K, de Lonlay P, Jouvett P, Depondt E et al. Methylmalonic and propionic acidurias: management without or with a few supplements of specific amino acid mixture. *J Inherit Metab Dis* 2006;29:268-74.
- Cardoso ML, Rodrigues MR, Leão E, Martins E, Diogo L, Rodrigues E et al. The E37X is a common HMGCL mutation in Portuguese patients with 3-hydroxy-3-methylglutaric CoA lyase deficiency. *Mol Gen Metab* 2004; 82:334-8.



Consenso para o tratamento nutricional da leucínose

Sociedade Portuguesa de Doenças Metabólicas

Resumo

A leucínose é uma doença hereditária do metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada resultante de um défice ao nível do complexo enzimático de descarboxilação da leucina, isoleucina e valina. Trata-se de uma doença de transmissão autossómica recessiva, estando já descritas mais de 150 mutações. São conhecidas várias formas de apresentação da doença, sendo que, a maioria dos doentes é portador da forma clássica. O marcador bioquímico de excelência é a elevação das concentrações sanguíneas e urinárias dos aminoácidos de cadeia ramificada e dos respectivos ácidos α -cetónicos. O diagnóstico precoce é fundamental na prevenção da deterioração neurológica que se instala na ausência da implementação do tratamento nutricional adequado. Este consiste na prescrição de uma dieta restrita nos aminoácidos de cadeia ramificada, suplementada com uma mistura de aminoácidos isenta dos mesmos, de modo a poder satisfazer as necessidades em azoto. O risco de descompensação metabólica é elevado nestes doentes, pelo que o equilíbrio entre as necessidades e a toxicidade deve constituir um dos princípios mais importantes do seu tratamento.

Palavras-chave: leucínose, leucina, valina, isoleucina, dieta, tratamento nutricional.

Acta Paediatr Port 2007;38(3):120-8

Consensus for the nutritional treatment of maple syrup urine disease

Abstract

Maple Syrup Urine Disease is an inborn metabolic disease of branched chain amino acid metabolism, resulting from a deficiency of the enzymatic complex of decarboxylation of the branched chain amino acids leucine, isoleucine and valine. This disorder has an autosomal recessive transmission, with more than 150 mutations already described. There are several forms of clinical presentation, although the majority of the patients have the classical form of the disease. The main biochemical marker of the disease is blood and urinary eleva-

tion of the branched chain amino acids and the corresponding 2-oxo acids concentrations. Rapid diagnosis is crucial to prevent neurological impairment occurring in untreated patients. Treatment is based on a branched chain amino acids restricted diet supplemented with an amino acid mixture free of them in order to allow the satisfaction of the nitrogen needs. Taking into account the elevated risk of acute metabolic derangement, it is advisable to balance amino acid needs with toxicity, this constituting one of the most important aspects of treatment.

Keywords: Maple Syrup Urine Disease, leucine, valine, isoleucine, diet, nutritional treatment.

Acta Paediatr Port 2007;38(3):120-8

Definição

A leucínose (MSUD; MIM # 248600) é uma doença hereditária do metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) primeiramente descrita por Menkes, Hurst e Craig em 1954^{1,2}. O tratamento dietético foi implementado dez anos mais tarde por Snyderman *et al.*^{3,4}. A MSUD é causada pelo défice de actividade do complexo enzimático responsável pela descarboxilação oxidativa dos ácidos α -cetónicos de cadeia ramificada (A- α -CCR). O bloqueio enzimático resulta na acumulação dos AACR, bem como dos respectivos A- α -CCR^{3,4,5}.

Genética

A MSUD é uma doença de transmissão autossómica recessiva². O complexo multienzimático, existente na mitocôndria de todas as células do organismo, é composto por quatro subunidades: E1 α , E1 β , E2 e E3². Os genes responsáveis pela sua codificação encontram-se localizados em diferentes cromossomas, o que em parte explica a elevada variabilidade genética da doença, estando já descritas mais de 150 mutações^{5,6}. A prevalência estimada da MSUD em todo o Mundo é de 1:185.000², variando entre 1:120.000 (Europa) e 1:500.000^{4,5,7}. A prevalência é superior nas comunidades onde a consanguinidade é frequente⁵.

Recebido: 06.06.2007

Aceite: 06.06.2007

Correspondência:

Manuela Ferreira de Almeida
Instituto de Genética Médica Jacinto de Magalhães
Praça Pedro Nunes, N.º 88
4099-028 Porto, Portugal
Telf. (+351) 226 070 339
manuela.almeida@igm.min-saude.pt

Metabolismo

Os aminoácidos leucina (LEU), isoleucina (ISOL) e valina (VAL) são essenciais, constituindo cerca de 35% dos aminoácidos essenciais (AAE) a nível muscular². Cerca de 75% dos aminoácidos veiculados pela alimentação são utilizados pelo recém-nascido para a síntese proteica. A LEU possui um papel crucial nestes processos de síntese³, inibindo os estados catabólicos e promovendo a secreção de insulina por via da estimulação das células β do pâncreas. Após ingestão proteica, a subida das concentrações plasmáticas de aminoácidos fica a dever-se, em cerca de 60%, aos AACR. Estes, são metabolizados no músculo esquelético como fonte de energia alternativa, embora possam ser oxidados em órgãos como o rim, coração, tecido adiposo e cérebro. A sua oxidação pressupõe, inicialmente, o seu transporte para o interior da célula, através de um transportador de membrana independente do sódio. Seguidamente, ocorrerão, na célula, pela seguinte ordem, reacções de transaminação, descarboxilação oxidativa e desidrogenação. A primeira etapa, uma transaminação, é catalisada pelas aminotransferases dos aminoácidos LEU, ISOL e VAL, dando origem aos respectivos A- α -CCR (ácido α -cetoisocapróico, ácido α -ceto- β -metilvalérico e ácido α -cetoisovalérico)⁴. Posteriormente, estes são transportados através da membrana mitocondrial, sofrendo a descarboxilação oxidativa mediante a acção do complexo enzimático responsável pela desidrogenação dos A- α -CCR. Esta reacção permite obter isovaleril-CoA, α -metilbutiril-CoA e isobutiril-CoA, partindo respectivamente dos aminoácidos LEU, ISOL e VAL. A terceira etapa diz respeito a uma desidrogenação catalisada por enzimas específicas. Numa fase posterior, verifica-se uma divergência na via de degradação dos três aminoácidos, sendo que a LEU origina acetil-CoA e acetoacetato, sendo considerada como tal um aminoácido cetogénico. A ISOL é lipogénica e glicogénica uma vez que a sua metabolização origina acetil-CoA e succinil-CoA. A VAL produz succinil-CoA, o qual poderá eventualmente entrar no ciclo de Krebs, originando glicose pela gliconeogénese; é como tal um aminoácido glicogénico (Figura 1)².

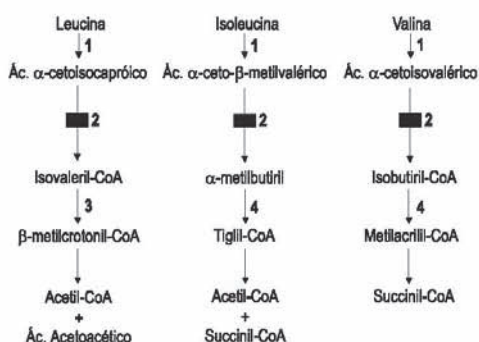


Figura 1 – Vias de degradação dos AACR. Adaptado de Chuang et Shih². Legenda: 1 - Aminotransferases dos AACR; 2 - Complexo multienzimático responsável pela descarboxilação oxidativa dos A- α -CCR; 3 - Desidrogenase do isovaleril-CoA; 4 - Desidrogenase do α -metil acil-CoA.

A nível central, os AACR assumem também funções importantes, na medida em que atravessam a barreira hematoencefálica mais rapidamente do que quaisquer outros aminoácidos, constituindo a principal fonte de azoto para a síntese do neurotransmissor glutamato⁵. Na MSUD, a diminuição das concentrações cerebrais de aminoácidos essenciais poderá estar na base da redução da síntese proteica e de neurotransmissores. Tendo por base os mecanismos de competição através da barreira hematoencefálica⁶, foi possível constatar uma diminuição nas concentrações cerebrais de glutamato, glutamina, aspartato e alanina, com impacto negativo no metabolismo energético e diminuição das taxas de síntese proteica¹¹.

Na MSUD, os estados convulsivos parecem ser causados pelas concentrações elevadas de α -cetoisovalérico⁹. No entanto, a LEU¹² e o ácido α -cetoisocapróico, constituem os compostos mais agressivos para o sistema nervoso central (SNC)^{13,14}, interferindo com o metabolismo dos neurónios e astrócitos. Embora saibamos que a LEU é o aminoácido mais tóxico, será importante manter as concentrações dos outros AACR perto dos valores normais⁸.

Apresentação Clínica e Evolução

No que respeita à apresentação clínica há a considerar a forma neonatal grave, a forma de início tardio com sintomatologia intermitente e a forma crónica progressiva. Tendo em conta a apresentação clínica e a resposta bioquímica à tiamina, identificam-se cinco fenótipos: a forma clássica, a intermédia, a intermitente, a sensível à tiamina e a deficiente na subunidade E3 (forma com hiperlactacidemia)².

A **forma clássica** é de apresentação habitualmente na primeira semana de vida¹⁵, caracterizando-se por recusa alimentar, letargia, alterações do tónus, movimentos de *boxage*, alterações neurológicas, convulsões¹⁶, soluços, hipotermia e coma^{2,16}. A morte pode surgir caso o tratamento não seja instituído¹³. De realçar igualmente a presença de hipotonia axial e hipertonia periférica e por vezes *opisthotonus*⁵. Verificam-se cetose¹⁶ e concentrações plasmáticas de LEU superiores a 2.000 μ mol/L. Normalmente trata-se de um bebé de termo, com parto e aspecto inicial normais, surgindo os sintomas entre o quarto e o sétimo dias de vida. É conveniente ter em atenção que o aleitamento materno pode retardar ligeiramente o aparecimento dos sintomas para a segunda semana de vida². Esta forma da doença caracteriza-se por uma actividade enzimática inferior a 2%¹⁷⁻¹⁹.

A **forma intermédia** é de apresentação no lactente e infância, sendo caracterizada por atraso de desenvolvimento psicomotor, má evolução estatura-ponderal, convulsões e ataxia. Verificam-se cetose e concentrações plasmáticas de LEU inferiores a 2.000 μ mol/L. Embora as elevações dos AACR sejam persistentes, bem como o atingimento neurológico, não se verificam as descompensações graves típicas no período neonatal das formas clássicas^{2,20}. A actividade enzimática nestes doentes é de 3 a 30%^{2,24}.

A **forma intermitente** é de apresentação no lactente e infância verificando-se crescimento e desenvolvimento normais, com crises de ataxia que poderão ser acompanhadas de cetose^{2,20}. O aumento dos AACR apenas se verifica nas des-

compensações, as quais podem ser fatais ¹⁶. A actividade do complexo enzimático varia entre 5 e 20% do normal ².

A **forma sensível à tiamina** tem uma apresentação clínica semelhante à forma intermédia ou intermitente ²⁰, não manifestando descompensação aguda inicial ². A tiamina é o cofactor da subunidade E1 α , regulando a actividade de todo o complexo enzimático ^{2,21}. Assim, a administração de tiamina, permite diminuir os níveis séricos de AACR ². As doses de tiamina usadas podem variar de 10 a 1.000mg por dia ^{14,19,21}. A actividade enzimática poderá variar entre 2 e 40% ¹⁴.

A **forma deficiente na subunidade E3** possui igualmente um quadro de apresentação clínica semelhante à forma intermédia, embora a elevação dos AACR se faça acompanhar de acidose láctica e α -cetoglutárica. Esta forma de apresentação é muito rara, tendo sido descritos cerca de 20 casos em todo o mundo ². O prognóstico desta forma da doença parece estar associado à actividade enzimática residual, compreendida entre 0 e 25% ¹⁴.

É de referir que 75% ^{4,5,19,20} a 80% ^{15,17,18,22} dos indivíduos afectados apresenta a forma clássica da doença. Os restantes 20% ¹⁷ a 25% ^{4,5} apresentam formas intermitentes ou intermédias ^{4,5}.

Tal como na fenilcetonúria, ainda não são totalmente conhecidas as causas da desmielinização e das alterações na substância branca observadas nos doentes com MSUD, embora a toxicidade crónica pela LEU possa estar na sua origem ^{14,19,22}. Existe evidência de que o limite superior da concentração plasmática de LEU, condizente com alterações clínicas menores, será de 1.000 a 1.200 μ mol/L para a uma exposição aguda e de 400 a 500 μ mol/L para uma exposição crónica ¹⁴. No entanto, em contraste com a elevação das concentrações dos AACR no sangue e nos tecidos, pode verificar-se um eventual défice destes a nível cerebral. Esta eventual diminuição, para cerca de um terço das encontradas a nível sérico, pode prejudicar a síntese de determinadas proteínas, bem como de certos neurotransmissores ²². Não podemos esquecer que uma das funções fundamentais da LEU é a regulação da síntese do glutamato ¹⁹.

Cerca de um quinto dos doentes com MSUD clássica acabam por morrer no decurso de complicações agudas precipitadas por infecção. O edema cerebral pode ocorrer nas descompensações metabólicas, ou na sua fase de recuperação, podendo revelar-se fatal ^{2,14,19}. Para além deste são de enumerar a hipertensão intracraniana, a pancreatite, as alterações epiteliais da córnea e a dermatite eruptiva, todas elas relacionadas com o mau controlo metabólico. É igualmente de realçar a possibilidade de compressão do tronco cerebral com morte inesperada, após reidratação intensiva e mal orientada.

Nos parâmetros analíticos realizados de rotina podemos encontrar hipoglicémia, acidose metabólica e hiperamoniémia, embora a alteração mais típica seja a presença de cetonúria. A individualização dos cuidados prestados a estes doentes assenta principalmente no facto de não se verificar boa correlação entre o fenótipo molecular e o fenótipo clínico ²³.

Diagnóstico

Um diagnóstico precoce é fundamental para o prognóstico ^{14,24,27} na medida em que a rápida implementação do tratamento, po-

derá impedir a deterioração neurológica, caracterizada imagiologicamente por redução da densidade da substância branca, com hipomielinização/desmielinização, atrofia e edema cerebral ⁹. Na forma clássica a sintomatologia surge nos primeiros dias de vida, com alterações neurológicas graves e cheiro açucarado característico na urina, bem como nos restantes fluidos orgânicos ²⁸. Nas restantes formas, esta pode começar a surgir apenas por volta dos 2 anos de idade ou mesmo mais tarde ²⁸. O diagnóstico efectua-se através da elevação dos AACR e A- α -CCR no sangue, plasma ou urina, bem como através da detecção sérica de alo-isoleucina ²⁹. Este último constitui um aminoácido não proteico sintetizado *in vivo* a partir da ISOL. Concentrações plasmáticas de alo-isoleucina superiores a 5 μ mol/L constituem um marcador específico muito sensível para o diagnóstico de todas as formas de MSUD ²⁹. Do mesmo modo, a relação alo-isoleucina/ISOL superior a 0,6 será característica da doença, bem como a relação plasmática LEU/alanina, a qual constitui um marcador sensível e precoce, com valores normais entre 0,1 e 0,5 ³⁰. Em oposição à elevação plasmática dos AACR, pode verificar-se uma diminuição de outros aminoácidos neutros como o triptofano, a tirosina, a metionina e a fenilalanina ¹³.

Não será de esquecer o teste urinário da DNP (2,4-dinitrofenilhidrazina), na medida em que se revela positivo, principalmente com concentrações de LEU de pelo menos 700 μ mol/L ². Desde 2005, é já possível a realização do diagnóstico precoce da MSUD por recurso à espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS) ³¹.

A confirmação do diagnóstico deverá ser feita com recurso a estudos enzimáticos e moleculares.

Tratamento

a) Princípios gerais do tratamento

O tratamento das doenças hereditárias do metabolismo causadas por défices no catabolismo dos AAE obriga à restrição do seu aporte através da dieta, no sentido de evitar a acumulação de intermediários tóxicos para os órgãos, particularmente o SNC ². Assim, os princípios gerais do tratamento consistem no controlo do aporte de proteína natural, na diminuição do catabolismo proteico e na promoção do anabolismo ¹⁴. Como objectivos mais concretos temos a normalização das concentrações plasmáticas dos AACR e dos seus metabolitos, mantendo o seu aporte adequado bem como de outros nutrientes necessários e fundamentais para um bom desenvolvimento e maturação ^{2,4,5,7,21,28}. Paralelamente, pretende-se prevenir ou minimizar a disfunção cerebral ²², já que há indícios de que o bom controlo metabólico se relaciona favoravelmente com um bom desenvolvimento intelectual ².

b) Recomendações Nutricionais

As várias formas de apresentação da MSUD condicionam estados de gravidade distintos. O diagnóstico atempado e o bom controlo metabólico são cruciais para assegurar um prognóstico favorável. Para tal, o tratamento nutricional assume um papel importante no garante destes objectivos. Assim, como referência, apresentam-se as recomendações nutricionais que poderão servir de guia para a instituição do plano alimentar (Quadro I) ³². É sempre conveniente ter em conta

Quadro I – Recomendações nutricionais para o tratamento da MSUD. Adaptado de *Elsas et Acosta* ⁴².

		< 6 meses	6-12 meses	1-4 anos	4-7 anos	7-11 anos	11-15 anos	15-19 anos
Energia	kcal.kg ⁻¹ .d ⁻¹ kcal/d	150-95 -	135-80 -	- 1300	- 1700	- 2400	- 2200-2700	- 1800-2100
Proteínas totais	g.kg ⁻¹ .d ⁻¹ g.d ⁻¹	3.0-3.5	2.5-3.0	30	35	40	50-55	50-65
Glicídios	g.d ⁻¹	30-35% VET			50-60% VET			
Lípidos	g.d ⁻¹	50% VET			35% VET			
Leucina	mg.kg ⁻¹ .d ⁻¹	60-100	40-75	40-70	35-63	30-60	30-50	15-40
Isoleucina	mg.kg ⁻¹ .d ⁻¹	30-90	30-90	20-85	20-80	20-30	20-30	10-30
Valina	mg.kg ⁻¹ .d ⁻¹	40-95	30-60	30-85	30-50	25-30	20-30	15-30
Água	mL.kg ⁻¹ .d ⁻¹	135-160	120-145	95	90	75	50-55	50-65

*VET - valor energético total

que as necessidades de cada doente estarão dependentes de diversos factores, entre os quais o genótipo. Deste modo, as necessidades nutricionais poderão estar relativamente afastadas das recomendações apresentadas, sem que tal acarrete prejuízos para o doente, desde que o controlo metabólico e a evolução se mantenham dentro de parâmetros aceitáveis.

De todas as recomendações existentes, são de particular importância as relativas aos AAE. Particularmente, as necessidades em AACR são muito variáveis em função da idade, da taxa de crescimento e do défice enzimático ². Nos recém nascidos portadores da forma clássica da doença, o aporte diário em LEU deverá rondar 80 a 110mg/kg, o que em média traduz cerca de 50 a 60% das necessidades de uma criança normal ⁵. As necessidades em LEU são maiores durante os primeiros 6 meses, estabilizando depois por volta do segundo ou terceiro anos de vida, mantendo-se relativamente estáveis até ao final da primeira década de vida ². No que respeita à VAL e à ISOL, as suas necessidades mínimas diárias são de 200 a 250mg ⁵.

Como já referido antes, a LEU assume a maior importância de todos os AACR, pela sua toxicidade mais marcada ¹², dado que o respectivo ácido α -cetónico (encontrado em equilíbrio isomolar) parece estar na origem das crises encefalopáticas ²². Deste modo, a tolerância do doente, definida como o aporte máximo de LEU que o doente suporta, mantendo simultaneamente um controlo metabólico dentro dos parâmetros desejáveis, será então aferida através do aporte do referido aminoácido. Em termos globais, nas formas clássicas, essa tolerância pode variar entre 300 e 400mg/dia no recém-nascido e entre 500 e 700mg/dia nas restantes idades ^{2,5,28}. Em todo o caso, o aporte correspondente à tolerância do doente não será suficiente para satisfazer as necessidades proteicas totais. Para tal, é necessário recorrer a uma fonte proteica isenta de AACR (mistura de aminoácidos). Nesse sentido, não está completamente definido se as necessidades proteicas da criança serão superiores, tendo por base particularidades na digestão, absorção e utilização dos diversos aminoácidos ³³. É fundamental deixar bem claro que a mistura de aminoácidos é de importância crucial para estes doentes. Todavia, nas dietas demasiado restritivas, existe alguma evidência de que a mistura possa não ter os efeitos desejados nas taxas de cresci-

mento, uma vez que os aminoácidos são largamente oxidados e excretados sob a forma de ureia ⁴⁵. Neste sentido, deve dedicar-se especial atenção à forma como esta mistura de aminoácidos é administrada. Será importante ter em conta o número de tomas diárias (pelo menos três) e a presença de quantidades adequadas de energia sob a forma glicídica e lipídica, bem como de proteína natural. De igual modo, é conveniente tentar encontrar estratégias de melhoria do seu sabor, bem como esta ser ingerida em simultâneo com outros alimentos prescritos no plano alimentar, de modo a permitir que o organismo utilize preferencialmente o azoto para finalidades anabólicas. Ficam como orientação as seguintes recomendações para a administração da mistura de aminoácidos (esta deve ser dada tendo por base a quantidade de aminoácidos/100g de pó):

- 3g.kg⁻¹.dia⁻¹ de aminoácidos até aos 2 anos de idade ²;
- 2g.kg⁻¹.dia⁻¹ de aminoácidos acima dos 2 anos de idade ^{2,28}.

Tais quantidades correspondem a um equivalente proteico da ordem de 2,5g.kg⁻¹.dia⁻¹ e 1,7g.kg⁻¹.dia⁻¹, respectivamente ²⁸. Na idade adulta, com a tolerância à LEU próxima de 10mg.kg⁻¹.dia⁻¹ (7 a 9g de proteína natural), a mistura de aminoácidos pode mesmo representar cerca de 90% do aporte proteico total ³⁴.

c) Tratamento na fase aguda

Com o intuito de proteger o cérebro de danos permanentes, o tratamento na fase aguda, deve consistir na pronta eliminação dos metabolitos tóxicos ⁷, combatendo o catabolismo e promovendo o anabolismo ¹⁶. A ausência de intervenção precoce e eficaz irá seguramente conduzir a danos cerebrais irreversíveis ou mesmo à morte ³⁰. Esta eliminação dos metabolitos pode ser concretizada através da depuração exógena (exsanguíneo transfusão prolongada, diálise peritoneal, hemodiafiltração, hemodilise intermitente, hemofiltração) e/ou endógena, induzindo o anabolismo, com início imediato de nutrição entérica rica em glicídios, lípidos e com uma fórmula isenta de AACR ou introduzindo um suporte nutricional parentérico ³⁵⁻³⁷. No entanto, convém referir que, muitas vezes, o suporte nutricional, seja entérico ou parentérico, mesmo em combinação com insulino terapia, revela-se muito lento na normalização dos valores dos AACR plasmáticos, o que determina que sejam privilegiadas as medidas de depuração

exógena ^{7,25}. A urgência da intervenção é máxima dado que a duração da manutenção de valores sistematicamente superiores a 1.000 µmol/L se correlaciona positivamente com um impacto negativo no desenvolvimento intelectual ^{26,28,29}. A criança terá indicação para a realização de uma depuração exógena sempre que se verifique sintomatologia neurológica grave, deterioração clínica, concentrações de LEU superiores a 1.500 µmol/L, intolerância à nutrição entérica ou diminuição das concentrações de LEU inferior a 500 µmol/L nas primeiras 24 horas de dieta.

A diálise peritoneal foi inicialmente usada em 1969, com melhorias significativas do estado neurológico em algumas horas. No entanto, embora relativamente simples de implementar, não se demonstra tão eficaz na remoção dos metabolitos tóxicos acumulados comparativamente a outros métodos como a hemofiltração contínua ². Mais ainda, convém ter em conta que pode agravar o grau de intolerância gastrointestinal ³⁵. A hemodálise intermitente é mais difícil de implementar em recém-nascidos estando por vezes associada a hipotensão e aumento do edema cerebral ³⁵. A hemodiafiltração também apresenta efeitos laterais, nomeadamente a sépsis, derivada de infecções de cateter, a hipotensão se não houver controlo do balanço hídrico e o défice em AAE ³⁵. A escolha da técnica vai depender também da disponibilidade e experiência de cada centro de tratamento ². A velocidade de descida da LEU deve exceder 750 µmol/L a cada 24 horas, permitindo atingir uma concentração final de LEU inferior a 400 µmol/L, cerca de 2 a 4 dias após o diagnóstico ¹⁴.

A combinação dos métodos dialíticos e da nutrição entérica parece oferecer largas vantagens, na medida em que garante uma descida rápida e eficaz das concentrações de LEU ^{40,41}. No entanto, para tal é necessário garantir óptimas taxas de fluxo sanguíneo para que a técnica possa ser levada a cabo ⁴⁰.

Apesar de tudo, desde que o grau de intoxicação não seja muito elevado ¹⁵, a escolha pela promoção do anabolismo dos AACR em excesso deve ser a medida de eleição ^{35,42}, permitindo evitar os custos e os riscos associados às medidas de depuração ¹⁵. Para tal será necessária a detecção precoce da doença, para que o tratamento possa ser iniciado numa fase assintomática, permitindo uma descida gradual da LEU em 2 a 3 dias ²⁷. A nutrição entérica contínua deve ser composta por uma mistura de aminoácidos isenta de AACR, acrescida de uma fonte glicídica e lipídica e com uma concentração final entre 0,7-0,9 kcal/mL. Esta deve ser iniciada a um débito de 5 mL/h durante 6 horas, aumentando 5 mL cada 6 horas, o que permitirá um aporte de cerca de 300 mL nas primeiras 24 horas. Os suplementos de VAL e ISOL serão administrados 24 a 48 horas após o início do suporte nutricional, uma vez que os seus níveis plasmáticos podem baixar em demasia ². Assim, para evitar que se tornem limitativos para a síntese proteica ², deve recorrer-se a uma suplementação de cada um na ordem dos 80 a 120 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ ¹⁴, podendo resultar em valores em torno de 300 a 400 mg/dia ². Por outro lado, convém evitar desequilíbrios plasmáticos na relação LEU/ISOL, os quais se parecem relacionar com alterações dermatológicas ². Quando a relação entre a LEU e a ISOL é demasiado elevada, a resposta ao tratamento revela-se menos efectiva. Concomitantemente, elevando as concentrações de ISOL e

também de VAL, será mais fácil normalizar as concentrações de LEU ² quando se está com restrição de proteína e de LEU.

Em alternativa à nutrição entérica, a via parentérica pode constituir uma opção para doentes com descompensações moderadas e algum estado de anorexia, ou mesmo em situações mais graves, em combinação com outras estratégias ². A nutrição parentérica é normalmente constituída por uma solução de AA isenta de AACR, associada a soluções de glicose (8 a 15 mg⁻¹.kg⁻¹.m⁻¹), lípidos (2.5 g.kg⁻¹.dia⁻¹), electrólitos e vitaminas. A carga hídrica deverá ser calculada na base de 130 a 160 mL.kg⁻¹.dia⁻¹. É aconselhada a monitorização das glicemias, que se pretende estejam entre 100 a 130 mg/dL, sendo que para tal poderá ser necessário o recurso à insulina nas doses de 0.1 U.kg⁻¹.h⁻¹. A administração de largas doses de glicose com a associação da terapêutica insulínica parece ter efeitos favoráveis na estimulação do anabolismo e na normalização das concentrações de LEU ².

d) Tratamento a longo prazo

O controlo metabólico é um dos principais objectivos no tratamento a longo prazo. É fundamental otimizar a utilização proteica de modo a garantir um bom crescimento e maturação. A concretização destes objectivos irá depender da, já referida, tolerância do doente o que, em última instância, terá relação com o genótipo do mesmo ⁴. As formas intermédias devem ser tratadas do mesmo modo que as clássicas, embora nos indivíduos com razoável actividade enzimática residual possa bastar uma restrição proteica, nos momentos de maior stress metabólico ². Para além das variações interindividuais, temos também relações intraindividuais relacionadas com factores como a taxa de crescimento, o estado de saúde e as dificuldades encontradas no processo de alimentação ⁴.

O aporte proteico destes doentes deve maioritariamente ser feito através de uma mistura de aminoácidos isenta de AACR, na quantidade mínima de, como já citado, 2 g.kg⁻¹.dia⁻¹ em aminoácidos. O papel assumido pelas misturas de aminoácidos é bem mais importante do que apenas prevenir ou minimizar as deficiências em aminoácidos essenciais. A entrada de LEU no cérebro e noutros órgãos é mediada por um transportador comum de aminoácidos neutros (L1-NAA-t). Este transportador é inespecífico permitindo a passagem da fenilalanina, triptofano, LEU, metionina, ISOL, tirosina, histidina, VAL e treonina para o meio cerebral ³⁰. A LEU possui uma elevada afinidade para este transportador pelo que, quando as suas concentrações se encontram elevadas, poderemos assistir a um défice central de outros aminoácidos que partilham o mesmo transportador ³⁰. Nomeadamente, a relação LEU/tirosina muito elevada parece relacionar-se com a distonia por vezes observada na síndrome neurológica aguda de alguns doentes com MSUD. Para esta situação, podem concorrer factores como a baixa afinidade da tirosina para o referido transportador, ou mesmo a sua baixa disponibilidade nas fórmulas das misturas de aminoácidos devido à sua baixa solubilidade ³⁰. Assim, neurotransmissores que derivem da TIR, triptofano e histidina podem ser afectados com alterações no transporte dos aminoácidos ³⁰.

A forma de apresentação clássica da mistura de aminoácidos é em pó. Já se encontram disponíveis, noutros países euro-

peus, outras formas de apresentação, nomeadamente em saquetas. Estas novas formas de apresentação têm boa aceitação pelos doentes, favorecendo a sua adesão continuada à dieta. Segundo Hallam *et al.*, nos doentes que cumpram as quantidades prescritas da mistura de aminoácidos será de esperar um aumento da tolerância à LEU⁴³. Paralelamente, embora neste estudo, o número de doentes tenha sido reduzido, é de realçar uma melhoria nas concentrações de vitamina B₁₂. Tal poder-se-á justificar pela presença de micronutrientes (vitaminas e minerais) nestas novas formas de apresentação da mistura ou por alguma má adesão à dieta prescrita com a tradicional mistura de aminoácidos⁴³. De notar que se verificou ainda uma manutenção das concentrações de hemoglobina bem como de ácido fólico a nível eritrocitário⁴³.

As proteínas naturais poderão ser contabilizadas de acordo com a tolerância verificada em cada situação, de modo a permitir a manutenção dos valores analíticos desejáveis, tentando igualmente assegurar as necessidades indispensáveis à realização da síntese proteica. Em situações onde a forma da doença o permita, a tolerância poderá ser tal que o aporte de proteínas naturais poderá chegar para atingir as necessidades sem acarretar descontrolo metabólico, embora raramente⁴.

Inicialmente, o aporte em proteínas naturais é feito através do aleitamento materno ou de um leite ou fórmula adaptados⁵. Na prática, este último é normalmente adicionado à mistura de aminoácidos, numa quantidade variável de acordo com a tolerância do doente¹⁶. Esta abordagem é bastante importante, na perspectiva de garantir uma melhoria do anabolismo, uma vez que as misturas de aminoácidos não são utilizadas com a mesma eficácia pelo organismo, comparativamente a leites ou fórmulas com proteína intacta³³. No que respeita ao aleitamento materno, embora este seja mais frequentemente utilizado na fenilcetonúria, não devemos esquecer que ele terá o maior interesse para estes doentes. Assim, sugere-se a administração, em biberão, da mistura de aminoácidos com os restantes suplementos energéticos isentos de proteína, seguida da colocação do bebé ao peito. Com a variação do volume do biberão inicial, poder-se-á controlar o aporte proteico proveniente do leite materno, por variação do volume ingerido por parte da criança. Tendo em conta a gravidade da doença, alguns clínicos poderão ter receio em sugerir o aleitamento materno a estas crianças. No entanto, existem descrições de sucesso a este nível, pelo que se recomenda tentar, ainda que para tal seja necessário retirar o leite materno com bomba, juntando-o à mistura de aminoácidos⁴⁴. Todavia, esta será sempre uma alternativa de recurso.

Posteriormente, a diversificação segue as regras gerais para as crianças sem patologia, embora haja necessidade de restringir os alimentos ricos em proteínas como, os alimentos de origem animal, as leguminosas secas e os frutos secos⁵. Para otimizar o controlo metabólico da doença é conveniente utilizar uma tabela de partes em LEU, a qual permite catalogar os pesos dos alimentos, tais como, vegetais e fruta segundo os seus teores numa quantidade fixa do referido aminoácido. Na referida tabela, uma parte de LEU corresponde ao peso do alimento que fornece 50mg de LEU. Deste modo, assegura-se maior facilidade, variedade e compreensão na execução da dieta. A introdução gradual de alimentos hipoproteicos espe-

ciais [comparticipados a 100% pelo Ministério da Saúde, Despacho N.º 25822/2005 (2ª série) de 15 de Dezembro de 2005] facilitará ainda mais a exequibilidade do plano alimentar, bem como a concretização das necessidades energéticas.

A fracção correspondente aos glícidos e lípidos é administrada de acordo com as proporções recomendadas para crianças sem patologia²⁸. No entanto, será sempre importante assegurar que o aporte permite a correcta utilização dos aminoácidos administrados, ou seja, o seu encaminhamento para processos de síntese⁴⁵.

O transplante hepático tem sido realizado em alguns doentes^{34,45,46} permitindo a liberalização da dieta e evitando o surgimento de descompensações metabólicas mesmo durante as intercorrências infecciosas^{5,45,47}. Esta abordagem terapêutica permite manter concentrações estáveis de AACR, embora sempre ligeiramente aumentadas na medida em que o músculo e o rim continuam a não conseguir realizar a sua oxidação^{45,47}. Mesmo assim, é de referir que o fígado transplantado poderá oxidar cerca de 90% dos AACR¹⁹. As concentrações de alo-isoleucina também não normalizam, mantendo-se bastante elevadas⁴⁵.

A gravidez na MSUD é um assunto pouco explorado², estando descritos poucos casos de sucesso^{48,49}. Desconhecem-se os efeitos potencialmente tóxicos dos AACR para o feto⁴⁹. Nesse sentido é desejável manter as concentrações maternas de AACR próximo dos intervalos da normalidade, nomeadamente entre 100 e 300µmol/L⁴⁹. De notar que a tolerância à LEU parece aumentar após a 21ª/22ª semana de gestação, de 350 para 2.100mg/dia, devido à eventual maior capacidade de metabolismo fetal e à maior taxa de síntese proteica⁴⁹. De notar que será sempre necessário aumentar o aporte de aminoácidos provenientes da mistura de modo a manter as concentrações de AACR normais⁴⁹. A administração de carnitina (50mg.kg⁻¹.dia⁻¹) poderá ser necessária para manter os seus níveis séricos normais². Tudo indica que os obstáculos ao cumprimento da dieta nestas mulheres não sejam tão grandes como nas mulheres com fenilcetonúria. Tal prende-se com o facto de não existirem adultos que não estejam a cumprir o tratamento nutricional, não sendo, como tal, necessária a árdua tarefa de retomar a dieta⁴⁹. Apesar de todo este quadro aparentemente favorável, é necessária uma monitorização constante de modo a evitar a descompensação da mãe no período pós parto, motivada pelo aporte proteico excessivo do final da gravidez^{2,49}.

e) Descompensações metabólicas

O tratamento inicial da MSUD, nomeadamente a dieta restrita em proteínas, permite alcançar uma evolução favorável dos doentes no período neonatal, garantindo o crescimento e o desenvolvimento adequados com uma baixa taxa de hospitalizações³⁰. No entanto, mesmo nos indivíduos bem controlados podem surgir descompensações metabólicas. Estas são mediadas por processos de toxicidade promovidos pela LEU, com um impacto negativo no coeficiente de inteligência dos indivíduos, principalmente durante os primeiros cinco anos de idade. Este excesso do aminoácido poderá ter uma origem exógena ou endógena. No primeiro caso, as concentrações plasmáticas elevadas ficam a dever-se a erros alimentares,

realçando-se por isso a importância do tratamento nutricional correcto e adequado. Na segunda situação, as elevações nas concentrações de LEU e dos restantes AACR ficam a dever-se ao catabolismo dos tecidos nobres do organismo. Quando os doentes se encontram em balanço azotado positivo, os AACR libertados pelos tecidos são facilmente reutilizados na regeneração celular. Para que tal aconteça, deverá verificar-se uma total disponibilidade energética e proteica para que o metabolismo proteico e os seus processos de síntese se possam processar em pleno. A monitorização frequente do peso e da estatura serão bons indicadores de deficiência energética e proteica.

No entanto, mesmo com os aportes energético e proteico assegurados, outros factores podem desencadear a descompensação metabólica. Entre eles, infecções, vacinas, jejum, anorexia, vômitos, diarreia, anestesia e cirurgia. Em todas estas situações será importante monitorizar sinais de apatia, sonolência, perda de apetite, alterações do comportamento e de equilíbrio. A presença de cetonúria, como indicador catabólico, será uma pista importante para se providenciar medidas de urgência. Tais medidas, tendo em vista a correcção da descompensação, passam por reforçar o aporte glicídico e lipídico, restringindo ou interrompendo (temporariamente durante 24 a 48 horas) a ingestão de alimentos com proteínas naturais, mantendo a mistura de aminoácidos isenta de AACR. A manutenção da mistura é importante como garantia do aporte de outros aminoácidos neutros como o triptofano, a tirosina, a metionina e a fenilalanina. Há evidência de que se verifique uma relação inversa entre as concentrações plasmáticas destes AA e as de LEU. Deste modo, a manutenção da referida mistura permitirá que não chegue ao cérebro LEU em excesso, nem haja falta de outros aminoácidos, assegurando-se assim os processos de síntese, evitando o agravamento da disfunção neurológica ¹³.

De acordo com a gravidade da descompensação, poder-se-á adoptar uma dieta de semi-urgência ou uma dieta de urgência. Um estado de piroxia poderá, por si só, motivar a instituição de uma **dieta de semi-urgência**, sendo esta caracterizada pela restrição do aporte de proteínas naturais para metade, providenciando as refeições de modo mais frequente (cada 2 a 4 horas), retomando a dieta habitual após 2 a 3 dias em caso de boa evolução. A **dieta de urgência** é normalmente instituída sempre que necessário e aquando de uma hospitalização suscitada por anorexia grave ou vômitos, com deterioração clínica. Nestes casos, o aporte proteico é nulo (por um máximo de 48 horas), elegendo-se inicialmente a nutrição entérica a débito contínuo, embora possa ser necessário recorrer à nutrição parentérica. A fluidoterapia com glicose a 10 a 12% constitui mesmo uma mais valia para o controlo hidroelectrolítico do doente.

Nos doentes nos quais se verifica uma resposta favorável à administração de tiamina será de esperar um melhor prognóstico ^{19,21,50}, com um tratamento menos restritivo.

f) Monitorização do tratamento

A periodicidade do seguimento preconizado é, no que respeita a consultas:

- semanal até aos 2 meses;

- mensal dos 2 aos 24 meses;
- trimestral nas restantes idades.

No entanto, pode preconizar-se um seguimento semanal até ao ano de vida ², assim haja possibilidade para tal. O tratamento a longo prazo, ou de manutenção, terá como objectivo primordial a manutenção das concentrações plasmáticas dos AACR o mais próximo possível da normalidade. Assim, os valores desejáveis são os seguintes:

- LEU: 80-200 $\mu\text{mol/L}$ ³⁹;
- ISOL: 40-90 $\mu\text{mol/L}$;
- VAL: 200-425 $\mu\text{mol/L}$ ⁵.

A relação linear entre as concentrações plasmáticas dos AACR e os respectivos ácidos α -cetónicos é suficientemente boa, pelo que a monitorização é usualmente feita através dos primeiros.

Os doseamentos dos AACR devem ser realizados com uma periodicidade:

- semanal até ao ano de idade;
- quinzenal até aos 3 anos de idade;
- mensal, após os 3 anos de idade, embora a sua frequência possa aumentar em caso de intercorrência infecciosa.

Estes doseamentos constituem a base fundamental da monitorização do tratamento. No entanto, outros parâmetros são igualmente de importância primordial: hemograma, proteínas totais, albumina, ferritina, cálcio, fósforo e fosfatase alcalina. Estes devem ser monitorizados com uma periodicidade:

- semanal no primeiro mês;
- trimestral até ao ano de idade;
- semestral, após o ano de idade.

Anualmente, devem ser doseados o IGF1, a pré-albumina, as imunoglobulinas, o zinco, o selénio, as vitaminas lipossolúveis, o ácido fólico e a vitamina B₁₂. A densitometria óssea deverá ser prática corrente a partir dos 6 anos, no sentido de aferir a evolução no ganho de densidade mineral óssea.

A composição corporal, avaliada por bioimpedância eléctrica tetrapolar ⁵¹, será igualmente útil para monitorizar a evolução destes doentes, tendo para tal atenção às suas condições de preparação e realização ⁵². O ângulo de fase é um dos parâmetros indicadores do estado nutricional ao qual dedicamos maior atenção, sendo de esperar uma evolução favorável com o crescimento ⁵³.

Finalmente, é fundamental a realização do exame neurológico e a avaliação de desenvolvimento psicomotor nas idades chave.

Conclusão

A MSUD é uma doença hereditária do metabolismo dos AACR que, se não diagnosticada e tratada atempadamente, pode levar ao coma e morte. Os AACR são AAE pelo que têm de ser fornecidos pela alimentação diária sob pena de, apenas pela falta de um deles, os processos de síntese proteica fica-

rem comprometidos. Por outro lado, se administrados em excesso originam descompensações agudas graves pelo que, o equilíbrio no seu aporte será a chave para o sucesso do tratamento. Apesar do defeito no complexo enzimático ser extensível a todos os tecidos, o cérebro parece particularmente vulnerável a concentrações elevadas de AACR, particularmente da LEU e do seu respectivo A- α -CCR, embora os mecanismos justificativos para tal ainda não se encontrarem bem esclarecidos. Os diferentes factores causadores de descompensação e a susceptibilidade elevada dos doentes às descompensações, exigem uma dedicação extrema, de modo a ser possível atingir um bom controlo metabólico.

Consenso aprovado pela Sociedade Portuguesa de Doenças Metabólicas em Janeiro de 2007.

Grupo de Trabalho:

Júlio César Rocha, Instituto de Genética Médica Jacinto de Magalhães, Porto.

Esmeralda Martins, Hospital Especializado de Crianças Maria Pia, Porto.

Aguinaldo Cabral, Presidente da Sociedade Portuguesa de Doenças Metabólicas.

Manuela Ferreira de Almeida, Instituto de Genética Médica Jacinto de Magalhães, Porto.

Referências

- Menkes JH, Hurst PL, Craig JM. A new syndrome: progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance. *Pediatrics* 1954;14:462-7.
- Chuang DT, Shih VE. Maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria). In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. 8^a ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p1971-2005.
- Snyderman SE, Norton PM, Roitman E, Holt LE Jr. Maple syrup urine disease, with particular reference to dietotherapy. *Pediatrics* 1964;34:454-72.
- Ogier de Baulny H, Saudubray JM. Branched-chain organic acidurias. In: Fernandes J, Saudubray J-M, van den Berghe G, editors. *Inborn Metabolic Diseases*. 3^a ed. Heidelberg: Springer; 2000. p195-212.
- Wendel U, Ogier de Baulny H. Branched-chain organic acidurias/acidemias. In: Fernandes J, Saudubray J-M, van den Berghe G, Walter JH, editors. *Inborn Metabolic Diseases*. 4^a ed. Heidelberg: Springer; 2006. p245-62.
- Nellis MM, Kasinski A, Carlson M, Allen R, Schaefer AM, Schwartz EM, et al. Relationship of causative genetic mutations in maple syrup urine disease with their clinical expression. *Mol Genet Metab* 2003; 80:189-95.
- Ogier de Baulny H, Saudubray JM. Branched-chain organic acidurias. *Semin Neonatol* 2002;7:65-74.
- Harris RA, Joshi M, Jeoung NH. Mechanisms responsible for regulation of branched-chain amino acid catabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;313:391-6.
- Sgaravatti AM, Rosa RB, Schuck PF, Ribeiro CA, Wannmacher CM, Wyse AT, et al. Inhibition of brain energy metabolism by the alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease. *Biochim Biophys Acta* 2003;1639:232-8.
- Zielke HR, Zielke CL, Baab PJ, Collins RM. Large neutral amino acids auto exchange when infused by microdialysis into the rat brain: implication for maple syrup urine disease and phenylketonuria. *Neurochem Int* 2002;40:347-54.
- Yudkoff M, Daikhin Y, Nissim I, Horyn O, Luhovyy B, Lazarow A, et al. Brain amino acid requirements and toxicity: the example of leucine. *J Nutr* 2005;135:S1531-8.
- Kasinski A, Doering CB, Danner DJ. Leucine toxicity in a neuronal cell model with inhibited branched chain amino acid catabolism. *Brain Res Mol Brain Res* 2004;122:180-7.
- Wajner M, Coelho DM, Barschak AG, Araujo PR, Pires RF, Lulhier FL, et al. Reduction of large neutral amino acid concentrations in plasma and CSF of patients with maple syrup urine disease during crises. *J Inher Metab Dis* 2000;23:505-12.
- Mitsubuchi H, Owada M, Endo F. Markers associated with inborn errors of metabolism of branched-chain amino acids and their relevance to upper levels of intake in healthy people: an implication from clinical and molecular investigations on maple syrup urine disease. *J Nutr* 2005;135:S1565-70.
- Simon E, Fingerhut R, Baumkötter J, Konstantopoulou V, Ratschmann R, Wendel U. Maple syrup urine disease: favourable effect of early diagnosis by newborn screening on the neonatal course of the disease. *J Inher Metab Dis* 2006;29:532-7.
- Cabral A, Portela R, Tasso T, Eusébio F, Tavares de Almeida I, Silveira C. Doenças dos aminoácidos de cadeia ramificada. *Acta Med Port* 1998;11:659-65.
- Henneke M, Flaschker N, Helbling C, Müller M, Schadowaldt P, Gartner J, et al. Identification of twelve novel mutations in patients with classic and variant forms of maple syrup urine disease. *Hum Mutat* 2003;22:A17.
- Ben-Omran TI, Blaser S, Phillips H, Callahan J, Feigenbaum A. Atypical phenotype in a boy with a maple syrup urine disease. *J Inher Metab Dis* 2006;29:195-200.
- Chuang DT, Chuang JL, Wynn RM. Lessons from genetic disorders of branched-chain amino acid metabolism. *J Nutr* 2006;136:S243-9.
- Chuang JL, Wynn RM, Moss CC, Song JL, Li J, Awad N, et al. Structural and biochemical basis for novel mutations in homozygous Israeli maple syrup urine disease patients: a proposed mechanism for the thiamin-responsive phenotype. *J Biol Chem* 2004;279:17792-800.
- Prasad C, Dalton L, Levy H. Role of diet therapy in management of hereditary metabolic diseases. *Nutr Res* 1998;18:391-402.
- Schonberger S, Schweiger B, Schwahn B, Schwarz M, Wendel U. Dismyelination in the brain of adolescents and young adults with maple syrup urine disease. *Mol Genet Metab* 2004;82:69-75.
- Chuang DT. Maple syrup urine disease: it has come a long way. *J Pediatr* 1998;132:S17-23.
- Clow CL, Reade TM, Scriver CR. Outcome of early and long-term management of classical maple syrup urine disease. *Pediatrics* 1981; 68:856-62.
- Kaplan P, Mazur A, Field M, Berlin JA, Berry GT, Heidenreich R, et al. Intellectual outcome in children with maple syrup urine disease. *J Pediatr* 1991;119:46-50.
- Snyderman SE. Treatment outcome of maple syrup urine disease. *Acta Paediatr Jpn* 1988;30:417-24.
- Heldt K, Schwahn B, Marquardt I, Grotzke M, Wendel U. Diagnosis of MSUD by newborn screening allows early intervention without extraneous detoxification. *Mol Genet Metab* 2005;84:313-6.
- Thompson S. Protocol for the use of MSUD Maxamaid in the Dietary Management of Maple Syrup Urine Disease. *The Children's Hospital at Westmead Sydney* 2003.
- Schadowaldt P, Bodner-Leidecker A, Hammen HW, Wendel U. Significance of L-alloisoleucine in plasma for diagnosis of maple syrup urine disease. *Clin Chem* 1999;45:1734-40.

Acta Paediatr Port 2007;38(3):120-8

SPDM – Tratamento nutricional da leucinoase

30. Morton DH, Strauss KA, Robinson DL, Puffenberger EG, Kelley RI. Diagnosis and treatment of maple syrup disease: a study of 36 patients. *Pediatrics* 2002;109:999-1008.
31. Vilarinho L, Rocha H, Marcão A, Sousa C, Fonseca H, Bogas M, et al. Diagnóstico precoce: resultados preliminares do rastreio metabólico alargado. *Acta Paediatr Port* 2006;37:186-91.
32. Elsas II LJ, Acosta PB. Nutritional support of inherited metabolic disease. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC, editors. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1999. p1003-56.
33. Gropper SS, Gropper DM, Acosta PB. Plasma amino acid response to ingestion of L-amino acids and whole protein. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993;16:143-50.
34. Strauss KA, Mazariegos GV, Sindhi R, Squires R, Finegold DN, Vockley G, et al. Elective liver transplantation for the treatment of classical maple syrup urine disease. *Am J Transplant* 2006;6:557-64.
35. Jouvett P, Jugie M, Rabier D, Desgres J, Hubert P, Saudubray JM, et al. Combined nutritional support and continuous extracorporeal removal therapy in the severe acute phase of maple syrup urine disease. *Intensive Care Med* 2001;27:1798-806.
36. Jouvett P, Poggi F, Rabier D, Michel JL, Hubert P, Sposito M, et al. Continuous venovenous haemodiafiltration in the acute phase of neonatal maple syrup urine disease. *J Inherit Metab Dis* 1997;20:463-72.
37. Jouvett P, Poggi F, Saudubray JM. Continuous venovenous haemofiltration in the acute treatment of inborn errors of metabolism. *Pediatr Nephrol* 1995;9:127.
38. Hilliges C, Awiszus D, Wendel U. Intellectual performance of children with maple syrup urine disease. *Eur J Pediatr* 1993;152:144-7.
39. Hoffmann B, Helbling C, Schadewaldt P, Wendel U. Impact of longitudinal plasma leucine levels on the intellectual outcome in patients with classic MSUD. *Pediatr Res* 2006;59:17-20.
40. Schaefer F, Straube E, Oh J, Mehls O, Mayatepek E. Dialysis in neonates with inborn errors of metabolism. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:910-8.
41. Puliyaanda DP, Harmon WE, Peterschmitt MJ, Irons M, Somers MJ. Utility of hemodialysis in maple syrup urine disease. *Pediatr Nephrol* 2002;17:239-42.
42. Parini R, Sereni LP, Bagozzi DC, Corbetta C, Rabier D, Nancy C, et al. Nasogastric drip feeding as the only treatment of neonatal maple syrup urine disease. *Pediatrics* 1993;92:280-3.
43. Hallam P, Lilburn M, Lee PJ. A new protein substitute for adolescents and adults with maple syrup urine disease (MSUD). *J Inherit Metab Dis* 2005;28:665-72.
44. MacDonald A, Depondt E, Evans S, Daly A, Hendriksz C, Chakrapani AA, et al. Breast feeding in IMD. *J Inherit Metab Dis* 2006;29:299-303.
45. Bodner-Leidecker A, Wendel U, Saudubray JM, Schadewaldt P. Branched-chain L-amino acid metabolism in classical maple syrup urine disease after orthotopic liver transplantation. *J Inherit Metab Dis* 2000;23:805-18.
46. Netter JC, Cossarizza G, Nancy C, Hubert P, Ogier H, Revillon Y, et al. Mid-term outcome of 2 cases with maple syrup urine disease: role of liver transplantation in the treatment. *Arch Pediatr* 1994;1:730-4.
47. Wendel U, Saudubray JM, Bodner A, Schadewaldt P. Liver transplantation in maple syrup urine disease. *Eur J Pediatr* 1999;158 Suppl 2:S60-4.
48. Van Calcar SC, Harding CO, Davidson SR, Barmess LA, Wolff JA. Case reports of successful pregnancy in women with maple syrup urine disease and propionic acidemia. *Am J Med Genet* 1992;44:641-6.
49. Grunewald S, Hinrichs F, Wendel U. Pregnancy in a woman with maple syrup urine disease. *J Inherit Metab Dis* 1998;21:89-94.
50. Scriver CR, Mackenzie S, Clow CL, Delvin E. Thiamine-responsive maple-syrup-urine disease. *Lancet* 1971;1:310-2.
51. Kyle UG, Bosaeus I, De Lorenzo AD, Deurenberg P, Elia M, Gomez JM, et al. Bioelectrical impedance analysis-part I: review of principles and methods. *Clin Nutr* 2004;23:1226-43.
52. Kyle UG, Bosaeus I, De Lorenzo AD, Deurenberg P, Elia M, Manuel Gomez J, et al. Bioelectrical impedance analysis-part II: utilization in clinical practice. *Clin Nutr* 2004;23:1430-53.
53. Nagano M, Suita S, Yamanouchi T. The validity of bioelectrical impedance phase angle for nutritional assessment in children. *J Pediatr Surg* 2000;35:1035-9.

Neonatal cholestasis: an uncommon presentation of hyperargininemia

Esmeralda Gomes Martins · Ermelinda Santos Silva ·
Sílvia Vilarinho · Jean Marie Saudubray ·
Laura Vilarinho

Received: 18 June 2010 / Revised: 14 November 2010 / Accepted: 9 December 2010
© SSIEM and Springer 2011

Abstract Hyperargininemia is a rare inborn error of metabolism due to arginase deficiency, which is inherited in an autosomal recessive manner. Arginase is the final enzyme of the urea cycle and catalyzes the conversion of arginine to urea and ornithine. This condition typically presents in early childhood (between 2 and 4 years of age) with developmental delay associated with progressive spastic paraparesis. Neonatal presentation is very uncom-

mon with a poorly described outcome. Here, we discuss two cases of neonatal cholestasis as initial clinical presentation of hyperargininemia. In case 1, diagnosis was established at 2 months of age upon investigation of the etiology of cholestatic injury pattern and hepatosplenomegaly, and treatment was then initiated at when the patient was 3 months old. Unfortunately, the patient had progressive biliary cirrhosis to end-stage liver disease complicated with portal hypertension for which she underwent successful orthotopic liver transplant at 7 years of age. In case 2, hyperargininemia was identified through newborn screening and treatment was started when patient was 21 days old. Cholestasis was only identified in the patient's further evaluation and it resolved 2 weeks into treatment. The patient is currently 18 months old and her development and neurological examination remain unremarkable. Neonatal cholestasis as first presentation of hyperargininemia is rare, but this disorder should be included in the differential diagnosis of unexplained cholestasis in the neonate. In fact, these two cases suggest that arginase deficiency may be the cause of cholestatic liver disease.

Communicated by: Johan L.K. Van Hove

Competing interests: None declared.

E. Gomes Martins (✉)
Metabolic Unit, Hospital de Crianças Maria Pia,
Rua da Boavista 827,
4050-111 Porto, Portugal
e-mail: esmeralda.g.martins@gmail.com

E. Santos Silva
Gastroenterology Unit, Hospital de Crianças Maria Pia,
Rua da Boavista 827,
4050-111 Porto, Portugal
e-mail: erssilva@gmail.com

S. Vilarinho
Department of Medicine, Yale University School of Medicine,
New Haven, CT 06520, USA
e-mail: silvilarinho@yahoo.com

J. M. Saudubray
Neuro Metabolic Unit, Fédération des Maladies du Système
Nerveux, Hôpital La Pitié Salpêtrière,
Paris, France
e-mail: jmsaudubray@orange.fr

L. Vilarinho
Newborn Screening Unit, National Institute of Health INSA,
Praça Pedro Nunes 88,
4090-028 Porto, Portugal
e-mail: laura.vilarinho@insa.min-saude.pt

Introduction

Hyperargininemia (OMMIM # 207800) is a rare autosomal recessive disorder due to deficiency in the cytosolic hepatic arginase I, which is the sixth and final enzyme of the urea cycle and catalyses the conversion of arginine to urea and ornithine (Ash 2004). This enzyme is encoded by the gene *Arg1*, located on chromosome 6q23, and it was first cloned in 1986 (Sparkes et al. 1986; Huraguchi et al. 1987). Hyperargininemia is most commonly caused by heterogeneous missense mutations that occur in highly conserved regions of the gene (Vockley et al. 1994, 1996). Interest-

Published online: 13 January 2011

 Springer

ingly, most of the Portuguese cases are quite homogeneous at genetic level for the R21X nonsense mutation (Cardoso et al. 1999).

Progressive spastic paraparesis, mental retardation and occasional episodes of hyperammonemia are the typical initial symptoms of hyperargininemia, which commonly present in early childhood, between 2 and 4 years of age (Brusilow and Horwich 2005; Scaglia and Lee 2006). Neonatal and early-onset (before 3 months of age) presentations are very rare and therefore their clinical course is still poorly characterized (Cederbaum et al. 2004).

Neonatal cholestasis is defined as impaired bilirubin excretion, resulting in jaundice and conjugated hyperbilirubinemia (20% increase of total bilirubin and higher than 5 mg/dL), detected either in a newborn or an infant up to 4 months old (Moyer et al. 2004). Cholestasis can be classified as extra-hepatic or intra-hepatic, although some conditions overlap. In general, the causes of neonatal cholestasis are encompassed in the following three major categories: metabolic, endocrine and infectious (Shah and Spivak 1994).

Neonatal cholestasis is not an uncommon presentation of several metabolic diseases, the characterization and discussion of which are beyond the scope of this report. However, neonatal cholestasis as clinical presentation of hyperargininemia challenges the current understanding of this disease.

Here, we discuss clinical, biochemical and molecular data of two cases of hyperargininemia associated with neonatal cholestasis; one who presented symptomatically with cholestasis and was found to have this disorder, and another one who was diagnosed with hyperargininemia through newborn screening prior to be found to have cholestasis.

Case reports

Case 1 This patient has been previously reported (Braga et al. 1997).

Two-month-old female, first daughter of a young, healthy, nonconsanguineous couple with uneventful pre-, peri- and neonatal periods, presented with new-onset of jaundice with no change in stool or urine color and was found to have cholestatic liver injury and hepatosplenomegaly. Biochemical data at this time showed total bilirubin 10.8 mg/dL (N<2), conjugated bilirubin 9.4 mg/dL (N<0.2), AST 800 U/L (N<56), ALT 530 U/L (N<39), γ GT 80 U/L (N<45), plasmatic arginine 1756 μ mol/L (N 22–88), urinary orotic acid 18 μ mol/mmol creatinine (N 0–20), and ammonia 84 μ mol/L (N<47), which strongly suggested hyperargininemia (Table 1). Further appropriate neonatal cholestasis workup was undertaken and the most frequent

Table 1 Clinical and biochemical data of five patients with neonatal cholestasis presentation

Patient ID	Clinical data				Analytical data				Enzymatic analysis		Molecular analysis		
	Patient/gender/reference	Age of examination	Jaundice	Hepatoomegaly	Neurological deterioration	Outcome	AST/ALT (U/L)	γ GT (U/L)	Bilirubine T/D (mg/dL)	Ammonia (μ mol/L)		Glutamine (μ mol/L)	Arginine (μ mol/L)
Case 1 / F (Braga et al. 1997)		2 months	Yes	Yes	No	Liver cirrhosis -> s/p OLT	800/530	85	10.8/9.4	84	817	1,756	0% in RBCs
Case 2 / F		21 days	Yes	No	No	Normal growth and development	51/38	1,295	5.7/1.6	155	679	1,580	ND
P1 / M (Jorda et al. 1986)		?	Yes	Yes	Yes	Died	34	73	ND	199 ?	840	170	<2% in liver
P2 / F (Pickler et al. 2003)		5 days	No	?	Yes	Died	86	ND	ND	114	909	881	<1% in RBCs
P3 / F (Schiff et al. 2009)		?	No	No	Yes	Psychomotor delay	70/45	ND	ND	250	ND	680	<1% in RBCs

OLT-Orthotopic Liver Transplantation; ND-not determined; RBCs- red blood cells

^a Arginase activity: in liver (units/g liver), in RBCs (μ mol/min/gHg)

causes of cholestasis for this age group were excluded, namely extrahepatic biliary atresia, choledochal cysts, alpha-1-antitrypsin deficiency, cystic fibrosis, Alagille syndrome, galactosaemia, tyrosinaemia type I, and infectious diseases (TORCH, syphilis and hepatitis B). The diagnosis of hyperargininemia was then confirmed by enzymatic and molecular analysis that showed no arginase I activity in the patient's red blood cells and Arg1 gene homozygous R21X mutation, respectively. At 3 months of age, she was started on a low-protein diet with essential amino acid supplementation. Liver biopsy performed at 4 months of age showed hepatic cirrhosis with formation of regenerative nodules. The patient had progression of liver cirrhosis complicated with portal hypertension, pruritus, xanthomas, and marked hypercholesterolemia, but no neurological impairment. At 3 years of age, ursodesoxycholic acid was initiated and pruritus and xanthomas resolved, total cholesterol level normalized and liver enzymes improved. As the patient was clinically improving, ursodesoxycholic acid was discontinued after 2 years of treatment, but it had to be resumed because of a rise in total cholesterol and liver function tests. At 7 years of age, she was submitted to orthotopic liver transplantation (OLT) due to end-stage liver disease secondary to deficiency in hepatic arginase A1, since OLT (containing a normal function arginase) was able to produce a complete normalization of arginine, ammonia and guanidinic compounds levels in circulation, while on an unrestricted diet (Santos Silva et al. 2001). Interestingly, pathology analysis of the explanted liver showed a pattern of liver ductopenia, which consists in a paucity of interlobular bile ducts, with no further pathological findings. She is currently 18 years old with no neurological and/or cognitive impairment.

Case 2 Asymptomatic neonate, second child of first degree consanguineous parents (first cousins), with uneventful pre- and perinatal periods who was found to have hyperargininemia through neonatal screening. On day 5 of life, arginine level was 137 μM (cut-off=37) and repeat confirmatory test revealed an arginine level of 360 μM . The patient was seen and examined at 21 days of age when she was found to have mild jaundice with no change in stool or urine color. The remaining physical examination was otherwise unremarkable. At this time, biochemical data revealed a total bilirubin 5.7 mg/dL ($N < 2$), conjugated bilirubin 1.6 mg/dL ($N < 0.2$), AST 51 UI/L ($N < 36$), ALT 38 UI/L ($N < 44$), γGT 1295 UI/L ($N < 66$), plasmatic arginine 1600 $\mu\text{mol/L}$ ($N < 140$), ammonia 264 $\mu\text{mol/L}$ ($N < 47$) and orotic acid 5.3 $\mu\text{mol/mmol creat}$ ($N = 0.1$).

The diagnosis of hyperargininemia was confirmed by molecular analysis of Arg1 gene and identified homozygosity for R21X mutation. Similar to case 1, further appropriate workup was performed and other possible

causes of cholestasis were excluded, namely alpha-1-antitrypsin deficiency and infectious diseases (TORCH, syphilis, hepatitis B). At 3 weeks old, the patient was started on a low-protein diet: natural protein 1.1g/kg/day of breast milk, with essential amino acids mixture (deprived of arginine) 1g/kg/day, and sodium benzoate 250mg/kg/day. Two weeks later, a complete normalization of arginine and ammonia levels and liver function tests were observed. She is currently 18 months old and remains asymptomatic with developmental milestones and growth within normal limits. Ammonia levels are in normal range and plasmatic arginine oscillates between 40 and 385 $\mu\text{mol/L}$ (median = 138.4).

Discussion

Hyperargininemia due to hepatic arginase I deficiency typically presents in early childhood with neurological impairment. Neonatal presentation is very rare and thus still very poorly understood. To date, only five cases of neonatal hyperargininemia have been reported (Table 1), including case 2 of this study. Table 1 summarizes clinical, analytical, enzymatic and molecular data of these five patients with clinical presentation of hyperargininemia before 3 months of age. It is noteworthy that only three of these five patients have presented with cholestasis (Braga et al. 1997; Jordá et al. 1986; Picker et al. 2003; Schiff et al. 2009).

A detailed review of the literature demonstrates that a minority of patients with a typical clinical presentation hyperargininemia had a mild transient transaminitis and coagulopathy associated with acute episodes of metabolic decompensation, but no cholestatic pattern was ever described (Brusilow and Horwich 2005; Crombez and Cederbaum 2005; Scaglia and Lee 2006).

The two patients discussed here share the same genotype (p.R21X/R21X) and had a similar clinical presentation characterized by cholestasis. However, this null mutation is also found in homozygous patients with different forms of early presentation, as well as late onset, re-enforcing the notion that there is no genotype/phenotype correlation in this disease.

Case 1 reports a patient who presented with severe cholestasis. Possible known causes of cholestasis were actively investigated but not identified. Endocrine, infectious and other metabolic diseases were excluded in this patient, including syndromic canalicular paucity. A defect in the synthesis of bile salts was biochemically incompatible, because this patient showed normal bile acids in plasma and urine which does not occur in such disorders. Furthermore, liver histology did not show giant cell hepatitis that are usually seen in bile salts synthesis defects.

The patient presented in case 2 showed clinical and biochemical data of cholestasis that normalized 2 weeks after

the beginning of the treatment. The patient is currently 18 months old and asymptomatic. Liver biopsy was never obtained due to risk–benefit of the procedure. Thus, silent and asymptomatic liver disease in this patient cannot be definitively excluded at this point and requires close monitoring.

The pathogenesis of cholestasis in cases 1 and 2 is currently unknown. Many other patients with hyperargininemia, some of which with the same null mutation as these two patients, do not present with cholestatic liver injury and rather develop neurological impairment. It is possible that the accumulation of large amounts of arginine (particularly elevated in patients with homozygous R21X nonsense mutation) might interfere with transport and/or clearance of compounds that under certain circumstances could be hepatotoxic and contribute to progression of liver cirrhosis. It could be that development of cholestasis in these patients requires two triggers: the first that corresponds to elevated levels of arginine present in all patients with hyperargininemia, and a second trigger that may either be environmental (e.g., drugs, viral infections, etc.) or genetic (e.g., polymorphisms that synergize and predispose to an hepatic form of this disease). In contrast to other urea cycle enzymes, there are two genes encoding arginases, *Arg1* and *Arg2*, which have similar structural and enzyme properties. Thus, it is possible that in some patients ARG2 may compensate for ARG1 deficiency and this way shape the clinical presentation (Crombez et al. 2005).

The availability of tandem mass spectrometry (MS/MS) has led to increased efforts to include the urea cycle defects in the expanded newborn screening programs (Eduards et al. 2009; Vilarinho et al. 2010), which will allow early diagnosis and treatment (Scaglia and Lee 2006) as illustrated in case 2. In Portugal, between 2004 and 2009, 449,184 neonates were screened through expanded newborn screening. Two cases of citrullinemia type I, one case of argininosuccinate lyase deficiency and two cases of hyperargininemia have been identified during that time period. The incidence of 1:215,000 makes argininemia the second most frequent urea cycle disease in our country, after ornithine transcarbamylase deficiency. A total of 12 patients with hyperargininemia have been reported in Portugal (Vilarinho et al. 1990; Braga et al. 1997; Fidalgo et al. 1997; Cardoso et al. 1999; Santos Silva et al. 2001; Vilarinho et al. 2010). Molecular studies suggest that R21X mutation, a C-T transition in codon 21(exon 2) replacing arginine by a premature stop codon (R21X: CGA to TGA) may represent a major cause of hyperargininemia in Portugal (Cardoso et al. 1999).

In summary, neonatal cholestasis as first presentation of hyperargininemia is rare, but this disorder should be included in the differential diagnosis of unexplained cholestasis in the neonate. Moreover, these two cases suggest that arginase deficiency may be the cause of

cholestatic liver disease, but further investigation is necessary to verify and understand this unexpected relationship.

References

- Ash DE (2004) Structure and function of arginases. *J Nutr* 134:2760S–2764S
- Braga AC, Vilarinho L, Ferreira P, Rocha H (1997) Argininemia presenting as persistent neonatal jaundice and hepatic cirrhosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 24:218–222
- Brusilow SW, Horwich AL (2005) Urea cycle enzymes. In: Scriver CR et al (eds) *Metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th edn. McGraw-Hill, New York, Chap 85
- Cardoso ML, Martins E, Vasconcelos et al (1999) Identification of a novel R21X mutation in the liver-type arginase gene (ARG1) in four Portuguese patients with argininemia. *Hum Mutat* 14:355–356
- Cederbaum SD, Yu H, Grody W (2004) Arginases I and II: do their functions overlap? *Mol Genet Metab* 81:S38–S44
- Crombez EA, Cederbaum SD (2005) Hyperargininemia due to liver arginase deficiency. *Mol Genet Metab* 84:243–251
- Eduards RL, Moseley K, Watanabe Y et al (2009) Long-term neurodevelopmental effects of early detection and treatment in a 6-year-old patient with argininemia diagnosed by newborn screening. *J Inher Metab Dis Online*
- Fidalgo A, Eusebio F, Tasso T et al (1997) Hiperargininemia: a proposito de 3 casos clínicos. *Acta Pediatr Port* 28:231–235
- Huraguchi Y, Takiguchi M, Amaya Y et al (1987) Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human liver arginase. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:412–415
- Jordá A, Rubio V, Portolés M et al (1986) A new case of arginase deficiency in a Spanish male. *J Inher Metab Dis* 9:393–397
- Moyer V, Freese DK, Whittington PF, Olson AD, Brewer F, Colletti RB, Heyman MB (2004) Guidelines for the evaluation of cholestatic jaundice in infants: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 39(no 2):115–128
- Pickler J, Puga A, Levy H et al (2003) Arginase deficiency with lethal neonatal expression: evidence for the glutamine hypothesis of cerebral oedema. *J Pediatr* 142:349–352
- Santos Silva E, Martins E, Cardoso ML et al (2001) Liver transplantation in a case of argininemia. *J Inher Metab Dis* 24:885–887
- Scaglia M, Lee B (2006) Clinical, biochemical and molecular spectrum of hyperargininemia due to arginase I deficiency. *Am J Med Genet* 142C:113–120
- Schiff M, Benoist JF, Cardoso ML et al (2009) Early-onset hyperargininemia: a severe disorder? *J Inher Metab Dis*. doi:10.1007/s10545-009-1137-5, Apr 20 Online
- Shah HA, Spivak W (1994) Neonatal cholestasis. *Pediatr Clin North Am* 41:943–965
- Sparks RS, Dizikes GJ, Klisak I et al (1986) The gene for human liver arginase (ARG1) is assigned to chromosome band 6q23. *Am J Hum Genet* 39:186–193
- Vilarinho L, Senra V, Vilarinho A et al (1990) A new case of argininemia without spastic diplegia in a Portuguese male. *J Inher Metab Dis* 13:751–752
- Vilarinho L, Rocha H, Sousa C et al (2010) Four years of expanded newborn screening in Portugal with tandem mass spectrometry. *J Inher Metab Dis*. doi:10.1007/s10545-010-9048, Feb 23
- Vockley J, Tabor DE, Kem RM et al (1994) Identification of mutations (D128G, H141L) in liver arginase gene of patients with hyperargininemia. *Hum Mutat* 4:150154
- Vockley J, Goodman BK, Tabor DE et al (1996) Loss of functions in conserved regions of the human arginase I gene. *Biochem Mol Med* 59:44–51

4.1- Evolução clínica favorável dos doentes metabólicos como consequência do seu diagnóstico pré-sintomático ou precoce

4.1.2- Defeitos da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos

Artigo 4 - *Benefícios do rastreio neonatal nas doenças da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos. Nascer e Crescer 2009;18:22.*

Esta tese teve como base o projecto nº 16078-2007, premiado pela Comissão de Fomento de Investigação em Cuidados de Saúde do Ministério da Saúde: denominado “*Avaliação dos benefícios clínicos e sócio-económicos do rastreio neonatal nas doenças metabólicas hereditárias*”, de que fui coordenadora. Na sequência deste projecto foi elaborado e publicado um artigo sobre o grupo de patologias que se veio a verificar serem especialmente frequentes após a implementação do rastreio alargado: as doenças da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos. Nesta abordagem comparativa do “follow-up” dos doentes diagnosticados no rastreio com aqueles que tinham diagnóstico sintomático prévio verificamos uma redução marcada da mortalidade (que era de 50% antes do rastreio) e passou a ser nula nos doentes rastreados, e da morbilidade traduzindo-se num menor número de internamentos e descompensações.

Artigo 5 - *Short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: the clinical relevance of an early diagnosis and report of four new cases. J Inherit Metab Dis 2011; 34 (3): 835/42*

O défice em SHCAD (défice na desidrogenase dos hidroxíácidos de cadeia curta) é a doença da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos mais recentemente descrita. Tem uma apresentação clínica distinta das demais patologias deste grupo e manifesta-se com hipoglicemia por hiperinsulinismo. Foi efectuada uma compilação dos casos publicados desta DHM rara e descritos, detalhadamente, os quatro doentes de origem portuguesa diagnosticados sintomaticamente. Demonstramos, pela análise retrospectiva do sangue da ficha de diagnóstico precoce do último caso, que um dos marcadores bioquímicos da patologia, hidroxibutirilcarnitina (C4OH), já se encontrava elevado no momento da colheita para rastreio neonatal, abrindo uma porta à sua inclusão no rastreio.

Artigo 6 - *Multiple Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency: molecular diagnosis, structural analysis and clinical correlation. Clin Genet (Submetido).*

Pela sua gravidade e evolução desfavorável, mesmo sob tratamento, a introdução da MADD nos actuais painéis de rastreio é discutível.

Foi efectuado um estudo multicêntrico nacional, que incluiu a descrição clínica, e bioquímica bem como a caracterização molecular e a análise estrutural da enzima deficitária de oito doentes, três dos quais rastreados. Neste trabalho salientamos a importância da análise molecular e estrutural na compreensão da evolução clínica desta doença assim como na determinação da abordagem terapêutica mais apropriada.

Benefícios do rastreio neonatal nas doenças da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos

Esmeralda Martins¹, Anabela Bandeira¹, Hugo Rocha², Ana Marcão², Laura Vilarinho²

RESUMO

Objectivos: Avaliar o contributo do diagnóstico precoce na redução da pesada morbilidade e mortalidade que se associa aos defeitos da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos.

Método: Avaliação clínica e bioquímica retrospectiva dos doentes com defeitos da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos (défice em desidrogenases dos ácidos gordos de cadeia média - MCAD, défice em desidrogenases dos ácidos gordos de cadeia longa -LCHAD e défice múltiplo das desidrogenases dos ácidos gordos - MADD), diagnosticados de forma assintomática pelo rastreio metabólico neonatal alargado, ou diagnosticados previamente em fase sintomática. Registou-se idade de diagnóstico e de início de tratamento, primeiros sintomas, clínica à data de diagnóstico, descompensações e evolução.

Resultados: Foram identificados e incluídos 11 doentes com doenças hereditárias do metabolismo nomeadamente: cinco doentes com MCAD, três com LCHAD e três com MADD. Em seis doentes o diagnóstico foi sintomático. Nestes, as primeiras manifestações da doença ocorreram entre o primeiro dia e o ano de idade, havendo registo de vários episódios de descompensação antes do diagnóstico. Neste grupo de doentes a mortalidade foi de 86%. Nos restantes cinco doentes o rastreio neonatal efectuado entre o 3º e o 6º dia de vida possibilitou um diagnóstico precoce. A mortalidade nestes foi nula e estão clinicamente assintomáticos, não havendo internamentos por descompensação grave.

Conclusões: O diagnóstico pré-sintomático e o início de um tratamento capaz de prevenir ou minimizar o impacto das situações de descompensação aguda e as complicações a longo prazo reduzem de forma efectiva a mortalidade e a morbilidade.

Palavras-chave: Doenças da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos; rastreio neonatal; diagnóstico pré-sintomático; diagnóstico sintomático; diagnóstico precoce

Nascer e Crescer 2009; 18(4): ??-??

INTRODUÇÃO

O rastreio neonatal constitui um dos maiores programas de medicina preventiva nos países ocidentais. Com início em meados da década de 70 tem como objectivo detectar, em estado pré-sintomático, doenças para as quais existe tratamento, reduzindo assim a sua morbilidade e mortalidade. Na última década a aplicação da espectrometria de massa em tandem (MS/MS) ao rastreio neonatal veio tornar possível o diagnóstico simultâneo de um grande número de doenças metabólicas hereditárias a partir da ficha de diagnóstico precoce já utilizada, sem aumentar a quantidade de sangue colhido ao recém-nascido (RN)^(1,2,3,4).

Com o aumento significativo do número de doenças passíveis de serem rastreadas e com a possibilidade de novos tratamentos, a tendência é para alargar o espectro e incluir novas patologias. É importante, no entanto, que esta expansão seja rigorosamente monitorizada avaliando os benefícios (melhoria da morbilidade, mortalidade e qualidade de vida) e inevitavelmente os custos^(3,5,6,7).

Para a fenilcetonúria, primeira doença metabólica a ser rastreada, é consensual e inquestionável neste momento a vantagem clínica e económica do rastreio⁽²⁾. Para o novo grupo de DHM detectadas precocemente por MS/MS, os benefícios são claros para o défice em desidrogenases dos ácidos gordos de cadeia média (MCAD), sendo ainda alvo de discussão para as restantes doenças^(5,7,8,9).

A identificação e quantificação por MS/MS de metabolitos marcadores das doenças e as razões entre eles permitem identificar mais de 30 doenças que podem dividir-se em 3 grandes grupos: aminoacidopatias, acidurias orgánicas e defeitos da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos^(10,11).

Os defeitos da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos têm uma incidência individual que varia entre 1:8.000 e 1:100.000, constituindo o grupo mais frequentemente de patologias detectadas no rastreio^(10,12). Os ácidos gordos são a maior reserva de energia do organismo e têm um papel crucial durante períodos de jejum ou de maior stress metabólico fornecendo 80% da energia utilizada pelo coração, fígado e músculo-esquelético. Sob o ponto de vista clínico estas doenças podem apresentar-se de forma aguda com hipoglicemia hipocetótica, acidose metabólica, hiperamoniemia, letargia, cardiomiopatia, insuficiência hepática, morte súbita, rabdomiólise ou mais tardiamente com miopatia, neuropatia e retinopatia. A clínica aguda surge em períodos de gasto energético aumentado como jejum prolongado, febre ou outras situações de stress metabólico e é caracterizada por uma elevada mortalidade (superior a 50% nos diagnósticos sintomáticos)^(10,13).

No nosso país o Programa Nacional de Diagnóstico Precoce iniciou-se em

¹ Unidade Metabolismo, Unid. Maria Pia, CHP
² Centro de Genética Médica - INSA, Porto

1979 com o rastreio da Fenilcetonúria, passando em 1981 a incluir o rastreio do hipotiroidismo congénito. Em 2005, após um estudo piloto, foi iniciado o rastreio neonatal alargado que actualmente incluiu 25 doenças^(11,14).

O objectivo deste trabalho é avaliar o contributo do diagnóstico precoce na redução da pesada morbilidade e mortalidade que se associa aos defeitos da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos, referindo a nossa experiência e fazendo simultaneamente uma revisão dos estudos que estão a ser publicados sobre evolução destes doentes. Inclui doentes com défice em MCAD, com défice nas desidrogenases dos ácidos gordos de cadeia longa (LCHAD) e ainda com défice múltiplo das desidrogenases dos ácidos gordos (MADD; acidúria glutárica tipo II), todas com um modo de transmissão autossómica recessiva.

POPULAÇÃO E MÉTODOS

Local: Hospital Pediátrico de nível III.

Critérios de inclusão: doentes com defeitos da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos (MCAD, LCHAD E MADD) diagnosticados sintomaticamente ou com diagnóstico pré sintomático pelo rastreio metabólico neonatal. Todos os casos em seguimento que cumpriam os critérios estabelecidos foram incluídos no estudo.

Métodos: Estudo retrospectivo com recolha de dados a partir do processo clínico. Foi avaliada a história familiar, idade e forma de apresentação nos sintomáticos, idade de diagnóstico e de início de tratamento, adesão à terapêutica, número de episódios e gravidade das descompensações e evolução que incluiu o crescimento e desenvolvimento, morbilidade e mortalidade.

RESULTADOS

Foram incluídos 11 doentes, seis com diagnóstico sintomático (2 MCAD, 2 LCHAD e 2 MADD) e cinco doentes do rastreio (3 MCAD, 1 LCHAD e 2 MADD), referenciados nos Quadros I, II e III.

Na história familiar destes casos foi documentada consanguinidade em duas das onze famílias, havendo o registo de quatro irmãos previamente falecidos com a mesma patologia do caso index. Uma família era de etnia cigana e as restantes de origem caucasiana.

Há ainda a referir em dois casos uma gestação complicada com partos prematuros: um quadro de HELLP (hemólise, elevação das transaminases e trombocitopenia) num doente com LCHAD e uma pré-eclampsia num caso de MADD.

Os cinco pacientes diagnosticados no rastreio neonatal estavam assintomáticos à data do diagnóstico e iniciaram tratamento entre o sexto e o décimo séti-

mo dia de vida. Actualmente, têm entre 7 meses e 3 anos de idade e permanecem assintomáticos com um crescimento, exame neurológico e desenvolvimento normais. Há o registo de seis internamentos para fluidoterapia endovenosa durante intercorrências infecciosas com vómitos ou recusa alimentar evitando descompensações graves da doença.

Nos seis doentes com diagnóstico sintomático a apresentação na altura do diagnóstico foi variável em gravidade e idade de início. Nos casos com MCAD a clínica manifestou-se aos 7 e 15 meses de idade com sonolência, letargia, alterações hepáticas e hipoglicemia. Um dos doentes faleceu no primeiro episódio. O outro foi diagnosticado aos dois anos, no segundo episódio de descompensação. Este tem actualmente 17 anos de idade, um crescimento e desenvolvimento cognitivo normal não tendo voltado a fazer episódios de descompensação após o diagnóstico (Quadro I).

Nos LCHAD os dois doentes sintomáticos, diagnosticados aos 9 e 18 meses apresentavam miocardiopatias graves com insuficiência cardíaca, hepatomegalia, alterações da função hepática e hipotonia. Faleceram durante infecções respiratórias, uma e três semanas após o diagnóstico, respectivamente. Um deles esteve parcialmente assintomático até à data do diagnóstico, o outro manifestou-

Quadro I – Doentes com défice em MCAD

	Diagnóstico sintomático 1	Diagnóstico sintomático 2	Rastreio neonatal 1	Rastreio neonatal 2	Rastreio neonatal 3
Sexo	Masculino	Feminino	Masculino	Masculino	Feminino
Idade diagnóstico	2 anos	7 meses	9 dias	6 dias	5 dias
Sintomas	Episódios recorrentes de coma	Episódio <i>Reye-like</i>	ausência de sintomas	ausência de sintomas	ausência de sintomas
Diagnóstico molecular	A985G/A985G	A985G/A985G	A985G/A985G	A985G/A985G	C653G/A985G
Internamentos/descompensação	2	1	2	1	0
Idade actual	18 anos	Faleceu 7 meses	3 anos	2 anos	2 anos
Crescimento	Normal	-	Normal	Normal	Normal
Desenvolvimento	Normal	-	Normal	Normal	Normal
Hx familiar	-	Irmão falecido Consanguinidade	-	-	-

NAScer E CRESCER

revista do hospital de crianças maria pia
ano 2009, vol XVIII, n.º 4

se no período neonatal com hipoglicemia (Quadro II).

Dos dois doentes com diagnóstico sintomático na MADD um teve apresentação neonatal com dismorfia facial, convulsões e hepatomegalia associados a acidose metabólica e hipoglicemia graves, e o outro mais tardiamente como um quadro de vômitos cíclicos, letargia, acidose metabólica e alterações da função hepática que motivaram múltiplos internamentos entre o primeiro ano de vida e o início de tratamento aos 10 anos de idade (Quadro III).

Em todos os doentes o diagnóstico bioquímico foi confirmado por estudo enzimático e/ou molecular.

Nos MCAD foi efectuado o diagnóstico bioquímico através do perfil de acilcarnitinas (com elevação de octanoilcarnitina (C8), decanoilcarnitina (C10) e relação C8/C10 nos casos rastreados), e em todos os casos a cromatografia de ácidos orgânicos urinários demonstrou um aumento da hexanoilglicina e dos ácidos dicarboxílicos. Todos os doentes apresentaram a mutação clássica em homozigotia (A985G) e o quinto doente

uma heterozigotia composta com uma mutação nova (A985G/C653G).

Na LCHAD o diagnóstico foi efectuado pelas alterações nas acilcarnitinas no doente rastreado (elevação de 3-hidroxi-hexadecanoilcarnitina C16OH e 3-hidroxi-octadecanoilcarnitina C18OH) e nos restantes casos pela elevação dos 3-hidroxi-dicarboxílicos no perfil cromatográfico de ácidos orgânicos urinários. A mutação mais comum, G1528C foi detectada em homozigotia, em todos os doentes.

Para a MADD, dois doentes apresentaram o perfil bioquímico típico, com

Quadro II – Doentes com défices em LCHAD

	Diagnóstico sintomático 1	Diagnóstico sintomático 2	Rastreio neonatal 1
Sexo	Masculino	Masculino	Masculino
Idade diagnóstico	18 meses	9 meses	5 dias
Sintomas	Miocardioptia Hepatopatia Má evolução estatus-ponderal	Miocardioptia hipertrófica	Prematuridade por HELLP
Diagnóstico molecular	G1528C/ G1528C	G1528C/G1528C	G1528C/ G1528C
Internamentos/ descompensação	4	1	0
Idade actual	Faleceu 18 meses	Faleceu 9 meses	6 meses
Crescimento	-	-	Normal
Desenvolvimento	-	-	Normal
Hx familiar	Consanguinidade Irmão falecido	-	-

Quadro III – Doentes com défice em MADD

	Diagnóstico sintomático 1	Diagnóstico sintomático 2	Rastreio neonatal 1
Sexo	Masculino	Feminino	Masculino
Idade diagnóstico	4 dias	10 anos	7 dias
Sintomas	Dismorfia facial Hipotonia, hepatomegalia, convulsões, coma	vômitos recorrentes, letargia	ausência de sintomas
Alterações bioquímicas	Hipoglicemia, Acidose metabólica, Hiperamoniemia	↑transaminases, Acidose metabólica, Cetose	↑ intermitente CK
Diagnóstico molecular	p.X618QextX14/ X618QextX14	p.R191C/R191C	p.R155G/P534L
Internamentos/ descompensação	1	10	0
Idade actual	Faleceu em 5 dias	18 anos	3 anos
Crescimento	-	Normal	Normal
Desenvolvimento	-	Dificuldades aprendizagem	Normal
Hx familiar	2 irmãos Falecidos	-	-

presença de glutárico e metabolitos da oxidação dos ácidos gordos, e numa doente as alterações foram evidentes apenas durante as descompensações. Este diagnóstico foi confirmado pelo estudo molecular com heterogeneidade genotípica que está registada no Quadro III.

Globalmente os sete doentes em seguimento, 2 com diagnóstico sintomático e 5 com diagnóstico assintomático, cumprem tratamento. Todos têm indicação de evitar períodos de jejum longo fazendo reforço de ingestão de hidratos de carbono durante períodos de maior *stress* metabólico como por exemplo nas intercorrências infecciosas. Na LCHAD fazem tratamento dietético com restrição no aporte em triglicéridos de cadeia longa que são substituídos pelo aporte em triglicéridos de cadeia média. Na MADD a terapêutica consiste numa dieta restrita em proteínas e gorduras e suplementos de carnitina.

DISCUSSÃO

O painel das doenças rastreadas com a utilização de *tandem mass* não é consensual nos vários países. Na União Europeia actualmente existe uma heterogeneidade considerável nos programas de rastreio neonatal. Em 2007, 13 dos países europeus ainda não tinham iniciado o rastreio neonatal alargado (nestes inclui-se por exemplo a França). Nos 9 países que utilizam o *tandem mass* o número de doenças rastreadas varia entre 2 e 23⁽¹⁵⁾. É consensual no entanto, em todos estes países, que o sucesso do *screening* passa por um *follow-up* clínico a longo prazo e que apenas este pode fornecer evidência suficiente acerca das doenças que tem ganho efectivo ao serem rastreadas^(16,17,18).

Em Portugal, a frequência das doenças da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos, após início do rastreio alargado é de 1/7.000, sendo a MCAD, 1/9.977 mais frequente que a fenilcetonúria, 1/10.082 (Relatório Diagnóstico Precoce 2008).

A MCAD é efectivamente a doença mais frequentemente incluída nos novos programas de rastreio e cuja incidência se veio a tornar duas a três vezes superior à do diagnóstico sintomático^(9,19). Este

facto permitiu fazer estudos comparativos com um número significativo de doentes, onde estão registadas as vantagens económicas e os ganhos em morbilidade e mortalidade^(20,21). A mortalidade que era de cerca de 20% a 30% no primeiro episódio do diagnóstico sintomático reduziu significativamente, estando calculado que a mortalidade e a morbilidade grave reduzem cerca de 90% nos casos tratados precocemente^(22,23). Na nossa casuística, enquanto nos doentes sintomáticos a mortalidade foi de 50%, nos rastreados não houve episódios de descompensação graves e a mortalidade é nula.

Por outro lado para a LCHAD e MADD os trabalhos de avaliação da evolução e estudos comparativos com doentes sintomáticos são exíguos em parte pela raridade destas patologias⁽¹¹⁾.

Um trabalho multicêntrico efectuado com 75 doentes com defeitos da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos de cadeia longa⁽²⁴⁾, nomeadamente LCHAD, o início de um tratamento adequado nos doentes assintomáticos, previne as descompensações agudas que se associam a elevada mortalidade e morbilidade bem como as complicações da doença a longo prazo como a miocardiopatia. Em relação a outras complicações irreversíveis mais tardias como a retinopatia e a neuropatia periférica, que podem surgir mais tardiamente, em 43% e 21% dos doentes respectivamente, o trabalho não é conclusivo uma vez que estes doentes assintomáticos têm uma idade inferior a 6 anos. Este efeito benéfico de um tratamento precoce na miocardiopatia mas duvidoso a longo prazo para a retinopatia e neuropatia periférica é também referido noutros trabalhos⁽¹³⁾. Nos nossos doentes sintomáticos a miocardiopatia com insuficiência cardíaca severa foi o factor determinante na morte durante intercorrência infecciosa pouco tempo após o diagnóstico e que poderia provavelmente ter sido evitada com um início precoce de tratamento.

A acidúria glutárica tipo II (MADD), é caracterizada por uma grande heterogeneidade clínica que é evidente nos nossos doentes sintomáticos, um com apresentação severa e morte precoce ao terceiro dia de vida e outro de apresentação mais

tardia e menos grave com má evolução ponderal, vômitos cíclicos e hepatopatia. O doente do rastreio está clinicamente assintomático, mas apresenta uma ligeira elevação flutuante da CK. Nesta doença o tratamento das formas menos graves com carnitina e terapêutica dietética é efectivo, fica a dúvida em relação ao tratamento pré-sintomático nas formas mais graves onde a mortalidade é elevada, mesmo nos doentes rastreados^(25,26).

A avaliação da qualidade de vida nos doentes rastreados, passa também pelo impacto da doença na família, devendo os cálculos incluir os ganhos da informação genética e de um diagnóstico pré-natal. Em todas estas famílias foi feito o respectivo aconselhamento genético e posteriormente foi efectuado o diagnóstico pré-natal em três gravidezes.

A implementação recente do rastreio alargado faz com que várias questões estejam ainda por responder, nomeadamente evolução a longo prazo e o tratamento nos casos identificados bioquimicamente e cujas consequências fisiológicas não estão bem esclarecidas. Assim, neste momento, todos os esforços no sentido de definição do espectro de doença, a história natural e a resposta ao tratamento a longo termo deve idealmente ser feita no maior número possível de doentes⁽²⁷⁾, sendo de relevo todas as casuísticas relativas a estas doenças.

Comentário: O rastreio neonatal é fundamental nas doenças da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos. Embora o grupo avaliado neste trabalho seja pequeno, nos doentes sintomáticos a mortalidade é significativamente maior (4/6) comparativamente aos casos rastreados onde a mortalidade é nula. A morbilidade é também maior com múltiplos internamentos por episódios de descompensação, antes do diagnóstico etiológico nos casos sintomáticos.

A possibilidade de um aconselhamento genético e de um rastreio familiar é também fundamental. Nestas 11 famílias há a referir, previamente ao diagnóstico dos sintomáticos, a morte de quatro irmãos no período neonatal ou durante episódios febris que tinham provavelmente a mesma doença.

NASCE E CRESCER

revista do hospital de crianças maria pia
ano 2009, vol XVIII, n.º 4

EFFECTIVENESS OF NEWBORN SCREENING FOR MITOCHONDRIAL FATTY ACID OXIDATION DISORDERS

ABSTRACT

Aims: To evaluate the contribution of neonatal screening in morbidity and mortality of beta mitochondrial fatty-acid oxidation.

Methods: Retrospective clinical and biochemical evaluation of patients with mitochondrial fatty acid oxidation disorders (medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency - MCAD, long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency - LCHAD and multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiencies - MADD). Analysis of age at diagnosis, clinical presentation and evolution, therapy effectiveness, number of acute episodes and physical and cognitive development.

Results: It was identified 11 patients with mitochondrial fatty acid oxidation disorders: 5 with MCAD; 3 with LCHAD and 3 with MADD. In six cases, the diagnosis was made by clinical symptoms and the median age at diagnosis was 2.7 years. Before the diagnosis, two of them had multiple hospitalizations for acute episodes and the mortality was 66%.

In five patients, neonatal screening, between the 3rd and 6th day of life, made the diagnosis. In this group, all patients are clinically well, without episodes of decompensation.

Conclusions: In this evaluation we verified that neonatal screening allowed a decreased of the mortality and morbidity in mitochondrial fatty acid disorders.

Key-words: Mitochondrial fatty acid oxidation disorders; neonatal screening; asymptomatic diagnosis; symptomatic diagnosis

Nascer e Crescer 2009; 18(4): ??-??

BIBLIOGRAFIA

1. Wilcken B, Wiley V, Hammond J, Carpenter K. Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *N Engl J Med* 2003; 348:23: 2304-12.
2. Leonard J, Dezateux C. Screening for inherited metabolic disease in newborn infants using tandem mass spectrometry. *BMJ*. 2002; 354: 4-5.
3. Wilcken B. Mini-symposium: Newborn screening for inborn errors of metabolism – clinical effectiveness. *J. Inherit. Metab.* 2006; 366-9.
4. Announcement. The Society for Inherited Metabolic Disorders – statement on newborn screening and treatment of individuals with inborn errors of metabolism detected by newborn screening. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2004; 83 1-2
5. Pandor A, Eastham J, Beberley C, Chilcott J, Painsley S. Clinical effectiveness and cost-effectiveness of neonatal screening for inborn errors of metabolism using tandem mass spectrometry: a systematic review. *Health Technology Assessment*. 2004; 12 (8): 1-150.
6. Wilcken B. The consequences of extended newborn screening programmes: Do we know who needs treatment? *Inherit. Metab.* 2008;173-177
7. Liebl B, Ratzel U, Roscher A, von Kries R. Data required for the evaluation of newborn screening programmes. *Eur J Pediatr* 2003; 162
8. Waisbren S, Read C, Ampola M, Brewster T, et al. Newborn screening compared to clinical identification of biochemical genetic disorders. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2002;25: 599-560.
9. Nennstiel-Ratzel U, Arenz S, Maier E, et al. Reduced incidence of severe metabolic crisis or death in children with medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency homozygous for c.985A>G identified by neonatal screening. *Mol Genet Metab*. 2005;
10. Shekhawat P.S, Matern D, Strauss AW. Fetal fatty acid disorders, their effect on maternal health and neonatal outcome: impact of expanded newborn screening on their diagnosis and management. *Pediatr. Research* 2005; 57 78R-88R.
11. Vilarinho L, Rocha H, Marcão A, Sousa C, Fonseca H, Bogas M, Vaz Osório R *Acta Port. Ped.* 2006; 186-91.
12. Saudubray JM, Martin D, De Lonlay P, Touaty G, Poggi-Travert F et al. Recognition and management of fatty acid oxidation defects: A series of 107 patients. *J. Inherit. Metab. Dis.* 1999;22: 488-502.
13. Stanley C, Bennett M, Mayatepek. Disorders of mitochondrial fatty acid oxidation and related metabolic pathways in Fernandes J, Saudubray JM, van den Berghe G, Inborn metabolic diseases – diagnosis and treatment. 4ª Ed. Berlin Springer 2006: 175 - 196
14. Vaz Osório R, 25 anos de história do rastreio neonatal em Portugal. Mesa Redonda - Rastreio Neonatal. XL Conferencias de Genética. 2004.
15. Bodamer OA, Hoffmann GF, Linder M, Expanded newborn screening in Europe 2007. *Inherit. Metab.* 2007; 30 – 449-444
16. Exploring barriers to long-term follow-up in newborn screening. *Genet. Med* 2006; 9- 563-570
17. Howell RR, Engelson G. Structures for clinical follow-up: newborn screening. *J. Inherit. Metab. Dis* 2007; 30: 600-605
18. James PM, Levy HL. The clinical aspects of newborn screening by tandem mass spectrometry. *Research Reviews*. 2006;12. 246-254
19. Rhead WJ. Newborn screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: A global perspective. *Inherit. Metab.* 2006; 29: 370-377
20. Haas H, Chaplin M, Joy P, Wiley V, Black C, Wilcken B. Healthcare use and costs of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in Australia: screening versus no screening. *J. Pediatr* 2007;108-10
21. van der Hilst CS, Derks TH, Reijngoud DJ, Smitt GP, TenVergert EM. Cost-effectiveness of neonatal screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: the homogeneous population of the Netherlands. *J. Pediatr* 2007;115-20
22. Ratzel U, Arenz S, Maier E, et al. Reduced incidence of severe metabolic crisis or death in children with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency homozygous for c.985A>G identified by neonatal screening. *Mol*

- Genet Metab 2005:157-159
23. Liebl B, Niennstiel-Ratzel U, Roscher A, von Kries R Data required for the evaluation of newborn screening programmes. Eur J Pediatr 2003 162: S57-S61
24. Spiekerkoetter U, Lindner M, Santer R, Grotzke M et al Management and outcome in 75 individuals with long-chain fatty acid oxidation defects: results from a workshop. J Inherit. Metab. 2009:1125-9
25. Vockley J. Glutaric aciduria type 2 and newborn screening: Commentary. Molec Genetics and Metabolism 2008: 5-6

26. Angle B, Bueton B. Risk of sudden death and acute life-threatening events in patients with glutaric aciduria type II. Molec Genetics and Metabolism 2008: 36-39
27. Pollit R J. Introducing new screens: why are we all doing different things? J. Inherit. Metab. Dis 2007: 243-249

CORRESPONDÊNCIA

Esmeralda Martins
Unidade Metabolismo
Unidade Maria Pia, CHP
Rua da Boavista, 87, 4050-111 Porto
Telefone: 226 089 900
esmeraldamartins@portugalmail.pt

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Drª Dulce Quelhas da Unidade de Bioquímica Genética e às técnicas Carmen Sousa e Helena Fonseca da Unidade de Rastreio Neonatal pelo apoio técnico, assim como às técnicas Luzia Leitão e Altina Ramos pela realização dos estudos moleculares.

Agradecem ainda à Comissão de Fomento pela bolsa "Avaliação dos benefícios clínicos e sócio-económicos do rastreio neonatal nas doenças metabólicas hereditárias", que apoiou e financiou este estudo.

Short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: the clinical relevance of an early diagnosis and report of four new cases

Esmeralda Martins · M. Luis Cardoso ·
 Esmeralda Rodrigues · Clara Barbot · Altina Ramos ·
 Michael J. Bennett · Elisa Leão Teles · Laura Vilarinho

Received: 16 September 2010 / Revised: 22 January 2011 / Accepted: 25 January 2011 / Published online: 24 February 2011
 © SSIEM and Springer 2011

Abstract Short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HADH, SCHAD) deficiency (OMIM #231530) represents a recently described disorder of mitochondrial fatty acid beta-oxidation, with less than ten cases described worldwide. The main clinical presentation of this metabolic disease is different from other inherited defects of fatty acid β -oxidation as the hypoglycemia is associated with hyperinsulinism. We present the clinical, biochemical and molecular findings of four new Caucasian patients with HADH deficiency. These new cases contribute to a more comprehensive description of the phenotype, diagnostic

biomarkers and treatment options for this poorly defined disease.

Introduction

Mitochondrial fatty acid β -oxidation (FAO) takes place at the inner mitochondrial membrane for long-chain acyl-CoA and in the mitochondrial matrix for medium- and short-chain species. In a series of four reactions, an acyl-CoA species is sequentially reduced across the α - β bond to generate an enoyl-CoA, hydrated across this double bond to generate a 3-hydroxyacyl-CoA, reduced to generate a 3-ketoacyl-CoA and finally thiolitically cleaved to generate acetyl-CoA and a two-carbon shorter acyl-CoA which is recycled through the pathway. The pathway comprises enzymes with different chain-length-specificity (Strauss et al. 2009) and provides nearly 80% of demands to high energy tissues such as muscle and heart, during stress (Shekhawat et al. 2005). Genetic defects of FAO have been demonstrated to cause disease in humans at any age with a wide variety of symptoms including hepatic encephalopathy leading to liver failure, cardiomyopathy, skeletal myopathy and sudden infant death (Stanley et al. 2006). Biochemically, FAO disorders are mostly characterised by inappropriately hypoketotic hypoglycaemia due to failure of hepatic ketogenesis. Most FAO disorders can now be diagnosed presymptotically by newborn screening (Schulze et al. 2003; Vilarinho et al. 2010).

Short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HADH, HAD, SCHAD; EC1.1.1.35) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=601609>) is a matrix enzyme, that catalyses the conversion of medium- and short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA's to long-chain acyl-CoA is the penultimate reaction in the β -oxidation of medium and short-chain fatty acids (Strauss et al. 2009; Clayton et al. 2001).

Communicated by: Carlo Dionisi-Vici

Competing interest: None declared.

E. Martins (✉) · C. Barbot
 Unidade de Doenças Metabólicas, Hospital de Crianças Maria Pia,
 Rua da Boavista, 827,
 4050-111 Porto, Portugal
 e-mail: esmeralda.g.martins@gmail.com

M. L. Cardoso
 Departamento de Bioquímica,
 Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto,
 Porto, Portugal

E. Rodrigues · E. L. Teles
 Unidade de Doenças Metabólicas, Hospital de São João,
 Porto, Portugal

A. Ramos · L. Vilarinho
 Centro de Genética Médica,
 Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge,
 Porto, Portugal

M. J. Bennett
 Metabolic Disease Laboratory,
 The Children's Hospital of Philadelphia,
 Philadelphia, PA, USA

HADH (SCHAD) deficiency (OMIM #231530) (NCBI – OMIM 2010) is an autosomal recessive metabolic disorder, resulting from mutations in the *HADH* gene in chromosome 4q22–q26 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=231530>; Vredendaal et al. 1998) which has so far only been described in a few patients.

The gene is also referred in literature and databases as *HAD*, *HHF4*, *HADH1*, *SCHAD*, *HADHSC*, *M/SCHAD*, *MGC8392* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=gene%20hadh>).

The main clinical presentation of HADH deficiency differs from other inherited defects of FAO, as the hypoketotic hypoglycemia is usually associated with hyperinsulinism (HI) (Clayton et al. 2001; Kapoor et al. 2009; Molven et al. 2004; Eaton et al. 2003; Vidnes and Oyasaeter 1977; Molven et al. 2002; Hussain et al. 2005). A single patient has been described without hyperinsulinism but with high residual activity (Bennett et al. 2006). Clues to the diagnosis come from the urinary organic acid profile, with elevated medium-chain dicarboxylic, 3-hydroxydicarboxylic metabolites and 3-hydroxyglutarate, and from plasma acylcarnitine analysis with increased hydroxybutyrylcarnitine (C4-OH). Confirmation is by demonstration of low activity of C4-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in lymphocytes (Wanders et al. 1990), fibroblasts or tissues and demonstration of mutations in the *HADH* gene (Clayton et al. 2001; Molven et al. 2004).

Here, we present the clinical, biochemical and molecular findings of four new Caucasian patients with this rare autosomal recessive disorder, and an overview of all previously reported cases.

Case reports

The patients belong to two unrelated families referred as A (Fig. 1) and B.

Family A The parents are a consanguineous Caucasian European couple (first cousins). Three of their eight children died during the first year of life without diagnosis. Two siblings (cases 1 and 2) were diagnosed with HADH deficiency as well as one of their nephews (case 3).

Case 1 This male proband is the 8th child of these consanguineous parents. The pregnancy was uneventful. He was born at 38 weeks of gestation with a 3800g weight and 50 cm length. No abnormalities were detected in the neonatal period and in the first months of life according to his parents information. At eight months of age, he started to have daily myoclonic generalized seizures.

At 11 months, developmental delay, microcephaly and severe hypotonia were also documented and he was referred to the Neuropaediatrics Department of our hospital in order to investigate the cause of the epilepsy. Results of

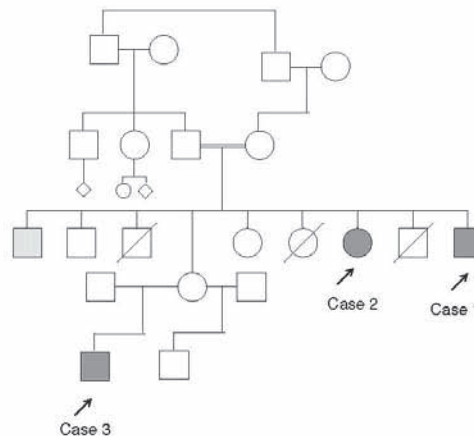


Fig. 1 Pedigree of family A

all studies performed did not elucidate a diagnosis: his karyotype was 46XY, a CT scan showed general cerebral atrophy, EEG demonstrated spikes and polyspikes consistent with myoclonic seizures and there was a normal EMG. Laboratory testing identified a persistent nonketotic hypoglycemia with glucose values ranging between 0.3 and 3.3 mmol/L (normal: 3.7–5.8). The hypoglycemia was independent of nutritional status and not associated with fasting. Hormonal studies showed an insulin concentration of 8.27 mU/L with c-peptide 0.8 ng/mL at a time when the glucose level was 1.8 mmol/L.

T3, T4, TSH, cortisol and ACTH levels were within normal limits, as well as a glucagon stimulation test. The insulin level was 4.2 mU/L with the corresponding glucose level of 3.3 mmol/L.

The child was treated with valproate for seizures and the epileptic crises became less frequent.

At 7 years of age, he presented with severe psychomotor retardation, hypotonia and a pyramidal syndrome. He had not developed any speech and he was unable to sit.

Metabolic investigations at this time included normal free and total plasma carnitine levels, and normal blood lactate, and pyruvate. Mild hyperammonemia was observed with ammonia levels between 88 – 112 $\mu\text{mol/L}$ (normal: 50–80). Acylcarnitine analysis was not performed, at this time.

Urinary fasting organic acid analysis during this presentation showed a consistent slight modest excretion of 3-hydroxyglutarate ranging from 12 to 45 $\mu\text{mol/mmol}$ creatinine (normal: less than 3), modestly increased 3-hydroxybutyrate and traces of adipate.

Glutaryl-CoA dehydrogenase activity in cultivated fibroblasts was normal, excluding a low-excretory case of glutaric aciduria type I.

Subsequent investigations were able to confirm hyperinsulinism (glucose 2–2.8 mmol/L, insulin 7.2–26.7 mU/L and c-peptide 0.7–4.4 ng/mL). He needed a glucose intake of 9 mg/kg/min to maintain normal blood glucose levels. He demonstrated a good response to diazoxide with normalization of blood glucose levels.

An MRI at this time showed severe general cerebral atrophy and all EEGs revealed abnormal profiles with generalized spikes and polyspikes and sharp waves sometimes with slow waves.

The first description of 3-hydroxyglutarate in a patient with hyperinsulinism and HADH deficiency (Clayton et al. 2001), prompted us to test this child for this disorder at the age of 16 years.

A marked reduction in HADH activity in cultured fibroblasts was found (8 nmol/min/mg protein; controls: 111–174) as well as a low ratio of HADH / short-chain-thiolase (1.2; controls 14.2–25.1) (C. Vianey-Saban, H. Debrouse, Lyon).

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes and used for PCR and sequencing of the *HADH* gene. The patient was found to be homozygous for a novel mutation c.587delC in exon 5, which predicts a truncated protein lacking 117 amino acids. He was also homozygous for a neutral exonic polymorphism in exon 2 (L86P).

The patient is currently 22 years old and severely mentally retarded. After diagnosis he was maintained on treatment with diazoxide (7 mg/Kg/d) and carbamazepine and valproate were discontinued.

Case 2 The proband's sister, 6th child of the same couple, presented with a clinical and biochemical picture similar to the index case. She was born at term after an uneventful pregnancy and a normal delivery. Birth weight was 3240 g.

She had a normal development in first months of life, however by the age of 6 months she developed myoclonic seizures, hypotonia, progressive microcephaly and was developmentally delayed.

Biochemical data, at 9 years old, showed a persistent nonketotic hypoglycemia ranging between 2.0 and 2.8 mmol/L with elevated insulin 10.2 mU/L and c-peptide 2.6 ng/mL, and a modest hyperammonemia 88–103 μ mol/L. Urine organic acid analysis showed increased excretion of 3-hydroxyglutarate ranging from 22 to 45 μ mol/mmol creatinine and medium-chain dicarboxylic and hydroxydicarboxylic acids. At this age, she required a glucose intake of 8 mg/kg/min in order to maintain normal blood glucose levels and was also responsive to diazoxide.

Molecular study confirmed that she was homozygous for the c.587delC mutation.

This patient is currently 24 years old. She is microcephalic and mentally retarded.

Case 3 Male, is the first child of a healthy adolescent sister of the index case. There is no information about the father of case 3. The patient was evaluated for the first time, at 14 months of age. The clinical presentation was epilepsy, developmental delay, microcephaly, hypotonia and pyramidal signs.

Laboratory studies showed a plasma glucose ranging from 2.2–2.4 mmol/L, CSF glucose 1.0 mmol/L (normal 2.2–3.9), insulin 4.5–12.3 mU/L, blood ammonia 52 μ mol/L. No ketone bodies were measurable. Urine organic acid analysis demonstrated increased excretion of 3-hydroxyglutarate ranging from 33 to 114 μ mol/mmol creatinine. Acylcarnitines analysis demonstrated increased levels of C4-OH ranging from 0.53–0.61 μ mol/L (normal: < 0.30).

Molecular studies revealed homozygosity for the same c.587delC deletion that was identified in the proband.

Presently he is 15 years old and treated with diazoxide 8 mg/Kg/d, hypoglycaemia has not been documented and the seizures stopped without antiepileptic medication.

Family B This is a single child family.

Case 4 Male, is the first child of non consanguineous Caucasian parents. The pregnancy was uneventful and the patient was born at 41 weeks, with a birth weight of 2730 g. Transient asymptomatic hypoglycemia was detected in the neonatal period that recovered with glucose.

At seven months of age he presented with normal growth and development but three episodes of generalized seizures had been observed. He was subsequently observed to have an episode of hypoglycemia which was hypoketotic and which corrected with intravenous glucose at 8 mg/kg/min.

Biochemical data showed a persistent hypoglycemia glucose ranging between 2.1 and 2.8 mmol/L, with elevated insulin 66.4 mU/L, and c-peptide 6.94 ng/mL and modest hyperammonemia 99 μ mol/L. Urine organic acid analysis showed increased excretion of 3-hydroxyglutarate (55 μ mol/mmol creatinine) and dicarboxylic aciduria. Plasma acylcarnitines showed increased level of C4-OH, 0.68 μ mol/L but a normal C2, 18 μ mol/L (normal: 7.8–21.8). The Guthrie newborn screening card of this patient was reprocessed and an increase C4-OH was also found retrospectively after storage for seven months at 4° C.

Diagnosis was confirmed by molecular and enzymatic studies. The patient was found to be homozygous for a splice-site mutation in intron 2 c.261+1 G>A of the *HADH* gene, and with no detectable activity of SCHAD in cultivated fibroblasts.

Upon diagnosis, the patient was started on diazoxide treatment 9 mg/kg/d, which normalized blood glucose and, subsequently no more seizures have been observed.

Brain MRI was performed and was normal and the patient is currently 5 years old, and is developing normally.

Discussion

HADH deficiency represents a recently described disorder of mitochondrial FAO. We reviewed the literature and compared the clinical presentations and most relevant analytical data from all these cases in order to have a clear view of clinical phenotypes associated with this still poorly understood and possibly underdiagnosed metabolic disease (Tables 1 and 2).

The reported cases can be divided into two groups: (i) older publications (most of the cases had fatal outcome), and HADH deficiency diagnosis was based on enzymatic evaluation in tissues samples but not at the molecular level (Tein et al. 1991; Bennett et al. 1996; Bennett et al. 1999), (ii) more recent diagnoses, in which a genetic approach was taken, and the diagnosis of HADH deficiency was confirmed at the molecular level (Clayton et al. 2001; Bennett et al. 2006; Kapoor et al. 2009; Molven et al. 2004; Hussain et al. 2005; Di Candia et al. 2009). As no mutations in the *HADH* gene have been identified in patients from the first group (Clayton et al. 2001), some doubts remained about whether these cases represent a primary or secondary HADH deficiency. Due to this doubt, they will be excluded from the present review. The confirmation of HADH deficiency based at the DNA level, has the advantage of generating a more homogeneous population.

An overview of Table 1 shows that the clinical presentation of HADH deficiency is quite homogeneous. Patients first appear to become symptomatic in early life (1.5 h – 3 years) most of them during the first year (12/13). Most of the patients present primarily with hypoglycemia (12/13) and seizures/convulsions, which are probably directly related to the hypoglycemia (10/13).

Effectively the main clinical presentation of this disease is HI; a phenotype first reported by Clayton et al. 2001. (Table 1). In this paper we describe four new cases of HADH deficiency (P10, P11, P12 and P13) from two families, whose phenotypes were also characterized by HI. Further to increased insulin levels, our patients also had increased levels of c-peptide compatible with the diagnosis of hyperinsulinism.

In family A there were three infant deaths within first year of life without a diagnosis. Despite the obvious consanguinity of this family and the risk of additional fatal autosomal recessive disorders, these children may also have been affected with HADH deficiency and had a more severe early presentation, as happens with other FAO

disorders. No samples were available from these children to perform post-mortem investigations.

The mechanism by which a defect in HADH deficiency leads to deregulated insulin secretion is related to a regulatory role of HADH upon pancreatic β -cell glutamate dehydrogenase (GDH). HADH directly interacts with and downregulates GDH activity thus reducing ATP production. In the absence of HADH protein, this regulatory function is removed and GDH activity is upregulated in a fashion similar to that seen in the hyperinsulinism with hyperammonemia syndrome seen in patients with gain of function mutations in GDH. This appears to represent a non-enzymatic function for HADH, frequently termed a moonlighting function (Li et al. 2010).

The hypoketotic hypoglycemia associated to hyperinsulinism seems so far to be the most frequent or better recognized phenotype (11/13). Our patients and other previously reported are being treated with diazoxide, which inhibits insulin secretion by keeping the potassium ATP channel open, preventing insulin release and subsequent hypoglycemic crises. A recently case described P8 (Kapoor et al. 2009) is not totally responsive to diazoxide but was demonstrated to be sensitive to protein, which is consistent with a direct interaction of HADH with GDH and the reported protein sensitivity of HADH deficiency but differs from other FAO defect which are all representative of fasting intolerance or increased energy demands.

Only two cases showed distinct clinical phenotypes: P1 with fulminant hepatic failure and P6 with a Reye-like presentation.

Reye-like syndrome (as seen in many other FAO deficiencies) was reported in 2006 in one patient (Bennett et al. 2006).

Fulminant hepatic failure and features more consistent with classical FAO defects can still be a phenotype of HADH deficiency particularly if a normal sized protein is expressed with documented impaired activity but with appropriate interactions with GDH limiting insulin secretion.

In our series, all three patients from family A presented with microcephaly, a feature not observed in any other patient with HADH deficiency. This is probably related with the persistent hypoglycemia during first years of life and later diagnosis and treatment. These patients were diagnosed after the first description of HADH deficiency by Clayton group (Clayton et al. 2001). At that time they were 16, 18 and 9 years old respectively and provides us with long-term knowledge of the natural history of this condition. A similar outcome is referred in the report by Molven team in P3 (Molven et al. 2004) in patients that were previously misdiagnosed (Vidnes and Oyasaeter 1977).

Our patients showed consistently elevated excretion of 3-hydroxyglutarate in urine with normal excretion of

Table 1 Clinical presentations

Personal data			Clinical data					Treatment			Reference				
Patient	Sex	Consanguinity (death siblings)	Population	Gestational age (W)	Clinical or analytical alterations detected by the first time	Age at MOSHAD deficiency diagnosis	Type of presentation	Convulsion/ seizures	Lethargy/ Hypotonia	Vomiting	Hepatomegaly	Microcephaly	Mental retardation	Diazoxide dosis	Reference
P1	F	N	Indian	na	3Y	3Y	FHF	X						5 mg/Kg/day	A1 (*)
P2	M	Yes	Pakistan	38	4M	4M	HH	X						150 mg/day	Clayton et al., 2001
P3	F	Yes	Pakistan	42	3D	3D	HH	X	X					100 mg/day	Melven et al., 2004
P4	F	Yes	Pakistan	40	1.5H	HH	HH	X						5 mg/Kg/day	Melven et al., 2002
P5	F	N	Caucasian	na	4M	7M	HH	X		X				5 mg/Kg/day	Hussain et al., 2005
P6	F	N	Caucasian	na	10M	10M	RLS	X						NR	Bennett et al., 2006
P7	F	Yes	Japanese	31	5M	7M	HH	X						NR	A2 (*)
P8	M	Yes	Bangladesh	na	4M	4M	HH	X						NR	Kapoor et al., 2009
P9	M	Yes	Caucasian	40	2M	2M	HH	X	X					5.6 mg/Kg/day	D. Canda et al., 2009
P10	M	Yes	Caucasian	38	11M	15Y	HH	X			X			7 mg/Kg/day	This study/A3 (*)
P11	F	Yes	Caucasian	na	7(3)	7(3)	HH	X	X		X			8 mg/Kg/day	This study/A3 (*)
P12	M	Yes	Caucasian	na	14M	4Y	HH	X	X		X			8 mg/Kg/day	This study/A3 (*)
P13	M	N	Caucasian	41	LBW	7M	HH	X						9 mg/Kg/day	This study

Legend

FHF- Fulminant hepatic failure

RLS - Reye-like syndrome

HH- Hypoglycemic hyperinsulinism

Y - Years

W-Weeks

M -Months

D - Days

H-hours

NR - dosis not reported

(*) previously presented in congress

A1- This case was presented in 2000 at SSIEM congress P-253

A2- This case was presented in 2008 in SSIEM congress P-147

A3- This case was presented in 2004 in SSIEM congress P-94

LBW - Low birth weight

na - not available

Table 2 Relevant analytical data

Patient	Analytical data				Glucose (mM/L) (normal 3.7–5.8)	Inosine	c-epoxide	Ketone Bodies	C4-OH	MCDCA (U)	3OH-DCA (U)	3OH-GA	Molecular study of HADH gene		Reference
	AST/ALT	NHE	Lactate	Alc1c2									Alc1c1	Alc1c2	
P1			?										c.118G>A (p.A40T)	c.171C>A (p.D57E)	A1 (*)
P2			1.4		↑		N	↑					c.778C>T (p.P258L)	c.773C>T (p.P258L)	Clayton et al., 2001
P3			0.8		↑		↓	↑					c.547-3_549del6	c.547-3_549del6	Mohren et al., 2004
P4			1.6		↑			↑					c.547-3_549del6	c.547-3_549del6	Mohren et al., 2002 and Mohren et al., 2004
P5			1.9		↑		N	↑					c.710-2A>G	c.-730-2A>G	Hussain et al., 2005
P6	↑	↑	3.9				N	↑					c.170A>G (p.D57G)	c.676T>C (p.Y226H)	Bennett et al., 2006
P7			1.2				N						unknown	unknown	A2 (*)
P8			1.8				N		N				c.562A>G (p.M188V)	c.562A>G (p.M188V)	Kapoor et al., 2009
P9			0.94				N		N				c.706C>T (p.R236X)	c.706C>T (p.R236X)	Di Camillo et al., 2009
P10	N	↑	0.3-2.8		↑		N	↑					c.587delC	c.587delC	This study/A3 (*)
P11	N	↑	2.0-2.8		↑		N	↑					c.587delC	c.587delC	This study/A3 (*)
P12	N	↑	2.2-2.4		↑		N	↑					c.587delC	c.587delC	This study/A3 (*)
P13	N	↑	2.1-2.8		↑		N	↑					c.261+1G>A	c.261+1G>A	This study

Legend

N - Normal

(*) previously presented in congress

A1- This case was presented in 2000 at SSIEM congress P-253

A2- This case was presented in 2008 in SSIEM congress P-147

A3- This case was presented in 2004 in SSIEM congress P-94

C4-OH - Hydroxybutyrylcarnitine;

MCDCA - Medium-chain dicarboxilic acids;

3OH-DCA - 3-hydroxydicarboxilic acids;

3OH-GA - 3-hydroxyglutarate;

U - urine

glutaric acid. Glutaric aciduria type I (low excretory form) was ruled out by enzymatic glutaryl-CoA dehydrogenase determination on cultured fibroblasts. In the literature, all cases published reported organic acids results and six had an increased excretion of 3-hydroxyglutarate with normal levels of glutarate. In our study this was the metabolite that pointed to the diagnosis. However, it remains without explanation why some cases (3/13) did not report increased urinary excretion of this metabolite.

C4-OH acylcarnitine is also a key compound for the diagnosis of this FAO disorder. It was present in (8/13) of patients. Special care should be taken in account when performing differential diagnosis of fasting ketosis, as that also causes increased levels of this compound. Nevertheless, in ketosis there are increased levels of acetylcarnitine that are not observed in HADH deficiency.

Early diagnosis of FAO disorders is important in order to decrease morbidity and mortality, and achieve a good clinical outcome (Di Candia et al. 2009; Filling et al. 2008). A comparative analysis of the clinical history of patients from family A and the single case of family B, prove this is also true for HADH deficiency. We show that in patient 4 of our series (13 in Table 1), the diagnosis of HADH deficiency was made rapidly when he became symptomatic and an appropriate treatment was promptly administrated preventing brain damage due to severe recurrent hypoglycemia, a similar situation is reported in more recent cases described in literature (Molven et al. 2004; Di Candia et al. 2009). Further, the retrospective analysis of newborn blood sample from the Guthrie card from this patient allowed us to demonstrate that an increased level of C4-OH acylcarnitine was present in blood early in life and that it should be possible to make a presymptomatic diagnosis of this disorder when including this condition in newborn screening programs.

Despite the clinical homogeneity there is a great heterogeneity in the mutations identified so far. They include missense mutations p.A40T, p.P258L, p.D57G, p.Y226H, a nonsense mutation (p.R236X), splicing mutations (c.261+1G>A, c.710-2A>G) and some small deletions (c.587delC) (Table 2). Most of the patients are homozygous for a specific mutation (10/13) suggesting consanguinity; even in families in which consanguinity was not clearly identified (Table 1).

In conclusion: HADH is a FAO disorder, which presents early in life mainly with hypoglycemic seizures and HI. Most of the cases are responsive to treatment with diazoxide, which should be administrated as soon as possible in order to correct the hypoglycemia and avoid irreversible mental deterioration. Effort should be made to increase the awareness of clinicians, especially neonatologists and pediatricians on recognizing the clinical pattern of hyperinsulinism a frequent and treatable cause of hypogly-

cemia in newborns and assure an early diagnosis and effective treatment.

References

- Bennett MJ, Russell LK, Tokunaga C et al. (2006) Reye-like syndrome resulting from novel missense mutations in mitochondrial medium- and short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. *Mol Genet Metab* 89:74–79
- Bennett MJ, Spotswood SD, Ross KF et al. (1999) Fatal hepatic short-chain L-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: clinical, biochemical, and pathological studies on three subjects with this recently identified disorder of mitochondrial beta-oxidation. *Pediatr Dev Pathol* 2:337–345
- Bennett MJ, Weinberger M, Kobori J et al. (1996) Mitochondrial short-chain L-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: A new defect of fatty acid oxidation. *Pediatr Res* 39:185–188
- Clayton PT, Eaton S, Aynsley-Green A et al. (2001) Hyperinsulinism in short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency reveals the importance of beta-oxidation in insulin secretion. *J Clin Invest* 108:457–465
- Di Candia S, Gessi A, Pepe G et al. (2009) Identification of a diffuse form of hyperinsulinemic hypoglycemia by 18-fluoro-L-3, 4 dihydroxyphenylalanine positron emission tomography/CT in a patient carrying a novel mutation of the HADH gene. *Eur J Endocrinol* 160:1019–1023
- Eaton S, Chatziandreu I, Krywawych S et al. (2003) Short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency associated with hyperinsulinism: a novel glucose-fatty acid cycle? *Biochem Soc Trans* 31:1137–1139
- Filling C, Keller B, Hirschberg D et al. (2008) Role of short-chain hydroxyacyl CoA dehydrogenases in SCHAD deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 368:6–11
- Hardy O, Hohmeier H, Becker T et al. (2007) Functional genomics of the B-cell: short-chain 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase regulates insulin secretion independent of K currents. *Mol Endocrinol* 21:765–773
- Hussain K, Clayton P, Krywawych S et al. (2005) Hyperinsulinism of infancy associated with a novel splice mutation in the SCHAD gene. *J Pediatr* 146:706–708
- Kapoor R, James C, Flanagan S et al. (2009) Hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase deficiency and hyperinsulinemic hypoglycemia: characterization of a novel mutation and severe dietary protein sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 94:2221–2225
- Li C, Chen P, Palladino A et al. (2010) Mechanism of hyperinsulinism in short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency involves activation of glutamate dehydrogenase. *J Biol Chem* 285(41):31806–31818
- Molven A, Matre GE, Duran M et al. (2004) Familial hyperinsulinemic hypoglycemia caused by a defect in the SCHAD enzyme of mitochondrial fatty acid oxidation. *Diabetes* 53:221–227
- Molven A, Rishang U, Matre GE et al. (2002) Hunting for a hypoglycemia gene: severe neonatal hypoglycemia in a consanguineous family. *Am J Med Genet* 113:40–46
- Schulze A, Lindner M, Kohlmeier D et al. (2003) Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome, and implications. *Pediatrics* 111:1399–1406
- Shekawat P, Matern D, Strauss A (2005) Fetal fatty acid oxidation disorders, their effect on maternal health and neonatal outcome: Impact of expanded newborn screening on their diagnosis and management. *Pediatr Res* 57:78R–86R

- Stanley C, Bennett MJ, Mayatepek E (2006) Disorders of mitochondrial fatty acid oxidation and related metabolic pathways. In: Fernandez J, Saudubray JM, van den Berghe G (eds) *Inborn metabolic diseases – diagnosis and treatment*, 4th edn. Springer, Berlin, pp 175–196
- Strauss A, Andresen BS, Bennett MJ (2009) Mitochondrial fatty acid oxidation defects. In: Sarafoglou K, Hoffmann G, Roth K. *Pediatric Endocrinology and Inborn errors of Metabolism*. McGraw-Hill. 51–70
- Tein I, De Vivo D, Hale D et al. (1991) Short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency in muscle: A new cause for recurrent myoglobinuria and encephalopathy. *Ann Neurol* 30:415–419
- Vidnes J, Oyasaeter S (1977) Glucagon deficiency causing severe neonatal hypoglycemia in a patient with normal insulin secretion. *Pediatr Res* 11:943–949
- Vilarinho L, Rocha H, Sousa C et al. (2010) Four years of expanded newborn screening in Portugal with tandem mass spectrometry. 2010. *J Inherit Metab Dis* online doi:10.1007/s10545-010-9048-z
- Vredendaal J, van den Berg I, Stroobants A et al. (1998) Structural organization of the human short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase gene. *Mamm Genome* 9:763–768
- Wanders R, Dijkstra L, Van Gennip AH et al. (1990) Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: identification of a new inborn error of mitochondrial fatty acid beta-oxidation. *J Inherit Metab Dis* 13:311–314

Clinical Genetics



Multiple Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency: molecular diagnosis, structural analysis and clinical correlation

Journal:	<i>Clinical Genetics</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Short Report
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Martins, Esmeralda; Hospital de Crianças Maria Pia, Unidade Doenças Metabólicas Gaspar, Ana; Hospital de Santa Maria, Unidade Doenças Metabólicas Bandeira, Anabela; Hospital de Crianças Maria Pia, Unidade Doenças Metabólicas Nogueira, Célia; Instituto Nacional de Saúde INSA, Unidade de Rastreio Neonatal Brandão, Otilia; Hospital de São João, Serviço de Anatomia Patológica Sousa, Carmen; Instituto Nacional de Saúde INSA, Unidade de Rastreio Neonatal Rocha, Hugo; Instituto Nacional de Saúde INSA, Unidade de Rastreio Neonatal Gomes, Caudío; Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Tecnologia Química e Biológica Vilarinho, Laura; Instituto Nacional de Saúde INSA, Unidade de Rastreio Neonatal
Key Words:	Multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency, MADD, glutaric aciduria type II, electron transfer flavoprotein, ETF, electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, ETF:QO, riboflavin

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Multiple Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency: molecular diagnosis, structural analysis and clinical correlation

Martins E¹, Gaspar A², Bandeira A¹, Nogueira C³, Brandão O⁴, Sousa C³, Rocha H³, Cláudio M. Gomes⁵, Vilarinho L³

¹ Unidade de Doenças Metabólicas, Hospital Maria Pia, CHP Porto – Portugal

² Unidade de Doenças Metabólicas, Hospital Santa Maria, Lisboa – Portugal

³ Unidade de Rastreio Neonatal, Instituto Nacional de Saúde INSA, Porto - Portugal

⁴ Serviço de Anatomia Patológica, Hospital São João, Porto – Portugal

⁵ Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, Oeiras, Portugal

Corresponding author: Esmeralda Martins

e-mail: esmeralda.g.martins@gmail.com

Unidade Doenças Metabólicas – Hospital de Crianças Maria Pia

Rua da Boavista, 827

4050-111 Porto - Portugal

Word counts of the text: 2820

Number of tables: 2

Number of figures: 1

Acknowledgments

C.M.G gratefully acknowledges research support from the FCT/MCTES (PTDC/SAU-GMG/70033/2006) and Climb (UK).

Conflict of interest statement

All the authors declare not having conflicts of interest.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ABSTRACT

Multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MADD) is caused by defects in the electron transfer flavoprotein (ETF) or in its electron acceptor, electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase (ETF-QO). The clinical features are highly variable, in respect to the age of onset and disease severity. In spite of the available data, the relationship between molecular lesions, biochemical phenotype and clinical presentation remains poorly understood. In order to contribute for a better understanding of this triad, we report and correlate clinical, biochemical and molecular data of eight patients with MADD. Five were clinically detected and three have been identified through a newborn screening program. In the symptomatic patients, three presented a severe neonatal onset and died in the first week of life. In the asymptomatic patients detected through neonatal screening, two presented normal growth and development and one deceased at the age of two years old.

Molecular analysis revealed three novel mutations within the *ETFDH* gene (p.R155G, c.34+5 C>G and p.X618QextX14). Protein structural analysis of mutations in *ETFDH* gene is suggestive of a correlation between the relative severity of individual mutations, protein structural stability and the clinical phenotype. Our results point out the utility of molecular and structural analysis of disease mutations in the understanding of clinical evolution.

Key-words: Multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency, MADD; glutaric aciduria type II, GAI; electron transfer flavoprotein, ETF; electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, ETF:QO; riboflavin

Abbreviations

ETF	electron transfer flavoprotein
ETF:QO	electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase
GA II	glutaric aciduria type II
MADD	multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency
UQ	Ubiquinone

INTRODUCTION

Multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MADD; OMIM #231680), also designated glutaric aciduria type II (GA II) is an autosomal recessive disorder of amino acid, fatty acid and choline metabolism, caused by defects in the electron transfer flavoprotein (ETF) or its electron acceptor, electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase (ETF:QO)(1). First identified in the mid 1970s, MADD has been described with three main clinical phenotypes: type I - neonatal onset with congenital anomalies; type II - neonatal onset without anomalies; type III -

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

mild or later onset. In the severe forms (type I and II), patients usually present hypotonia, hypoglycemia, metabolic acidosis and/or hyperammonemia, sometimes with congenital abnormalities (type II) such as dysplastic kidneys and/or congenital heart disease. Patients with milder forms of the disease, often show intermittent symptoms, such as vomiting, lethargy and hypoglycaemia, that become evident during periods of illness and catabolic stress; these episodes can however be lethal (2).

MADD is caused either by mutations in the genes encoding ETF (*ETFA* and *ETFB*) or in the ETF:QO encoding gene (*ETFDH*), mapped to 15p23-25, 19q13.1 and 4q33 respectively(3). There is evidence that the clinical phenotype, depends to some extent, on the location and nature of mutations, with null mutations (severely affecting mRNA expression, processing and/or stability) being associated with lethal forms of the disease and missense mutations (maintaining some residual ETF/ETF:QO enzyme activity) being associated with milder clinical phenotypes (3-5). As in many other metabolic disorders, clear genotype-phenotype relationships remain elusive being this especially true for milder forms of the disease, in which mutant proteins are usually only partially functional. In such cases, cellular and environmental factors like temperature and cofactors can modulate disease expression (6, 7). Although the molecular mechanisms underlying MADD remain unclear, riboflavin supplementation has been known to strikingly improve the clinical symptoms and metabolic profiles in a group of MADD patients, particularly those with late-onset form. In fact, the role of this vitamin in mitochondrial metabolism, and in particular in fatty acid oxidation flavoenzymes is increasingly prominent as recently reviewed (8).

The two mitochondrial proteins affected in MADD, ETF and ETF:QO, are flavoproteins that operate as a hub linking beta-oxidation to the respiratory chain. ETF is a heterodimer composed of 30 kD (ETF α) and 28 kD (ETF β) subunits, containing one structural AMP, and one catalytic FAD group. ETF:QO, also frequently referred to as ETF dehydrogenase, is a 64 kDa membrane-bound monomer, containing distinct structural domains that harbor one FAD and one [4Fe-4S] cluster, which mediate the transfer of electrons from reduced ETF to ubiquinone (UQ). The latter component links the beta-oxidation pathway to the respiratory chain, channelling the reducing power resulting from the oxidation of fatty acids to the respiratory complex II(9). This disorder can now be detected by expanded newborn screening using tandem mass spectrometry (MS/MS), providing the opportunity for early diagnosis and treatment in asymptomatic infants.

Here we report the genotypic, biochemical and clinical features of a set of MADD patients, and correlate the protein structural consequences resulting from the genetic defects with clinical manifestations. A comparison between the outcome of patients detected by newborn screening and those clinically detected is also carried out. With this combination of approaches, we seek to contribute to a better molecular understanding of MADD and to the design of better clinical management protocols.

Patients and methods

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Patients: Retrospective data of the clinical symptoms, age of presentation, biochemical records, evolution and treatment of eight patients with MADD diagnosed in Portugal are referred in Table A. In all cases, this inborn error of metabolism was initially suspected on the basis of a characteristic profile of urinary organic acids, with the presence of short, medium and long fatty acids namely: ethylmalonic, adipic, glutaric and isovaleric acids (10) obtained by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and/or acylcarnitine profiling in blood spots by tandem mass spectrometry (MS/MS). Enzymatic studies were performed in patients confirming the MADD diagnosis (C.Vianey-Liaund, Lyon, France). To define the disease phenotype, clinical data from medical records were collected allowing the classification of all patients into one of the three disease types, according to previously defined criteria. Treatment in these patients consists of a diet low in protein and fat, in addition to supplementation with carnitine (50-100mg/kg/day) and riboflavin (100mg/day) (10, 11). In all cases, riboflavin responsiveness has also been investigated.

Genotyping: Molecular analysis of the genes encoding α and β subunits of ETF (*ETFA* and *ETFB*) and the gene encoding for ETF:QO (*ETFDH*) was performed after valid consent obtained from patients and families. Genomic DNA was extracted from peripheral leucocytes using standard procedures and the genes described above were amplified by PCR using a commercial mixture with DNA polymerase - ImmoMix Red (Bioline), primers at 50 pmol/mL, approximately 60 ng of DNA and bidistilled water. Primers were designed to overlap the coding sequences and their flanking regions. PCR products were purified by ExoSap (usb®) enzyme and sequenced using Big Dye Terminator Cyclor Sequencing Ready reaction Kit protocol (Applied Biosystems). The sequencing reactions were performed in an ABI 3130XL Genetic Analyser and the gene variations identified were analyzed using bioinformatics tools such as public databases as well as web-based software programs (i.e., PolyPhen, SIFT).

Structural Analysis. The crystallographic structure of porcine ETF:QO (PDB code: 2gmh) was used to produce a structural model of the human protein by homology modeling (Swiss-Model) as the crystal structure of the human protein is not available. The two proteins share a very high amino acid sequence identity (90%) thus making the porcine enzyme an excellent structural template. All amino acid numbering refers to human ETF:QO. Analysis of the molecular interactions, cofactor contacts and topological features and generation of models for the variants was carried out using the WhatIF web server and the PDBsum database(12). Structural models have been inspected using PyMOL (DeLano Scientific).

Results

Clinical and biochemical features of MADD patients: A total of eight patients were investigated: four were diagnosed during acute episodes (P1, P2, P3, P5), three detected through newborn screening (P6, P7, P8), and one through a familial study (P4), (Table A). Among the five clinically detected patients, three (P1, P2, P3) presented a severe neonatal onset of the disease: two patients (P1, P2) were classified as type I forms with congenital

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

anomalies, hypotonia, hypoketotic hypoglycaemia and metabolic acidosis, both having fatal outcomes in the first week of life; one patient (P3) was a type II form (without congenital anomalies), who was identified in the course of a post-mortem examination of a sudden infant death syndrome at the second day of life (41 hours). In this case, a severe steatosis was identified in liver cells cytoplasm, as well as in heart, kidney and skeletal muscle cells (Dil Red staining for fat). Three years later, a termination of pregnancy was done (at 20th week of gestation) after a prenatal diagnosis for MADD on a female foetus (without anomalies, and small droplets of lipids – oil red positives – in some liver cells).

The two remaining patients (P4, P5) presented late onset of the disease (type III form) with recurrent vomiting (multiple episodes of admission to the hospital), fatigability and metabolic acidosis. From this group of patients only one responded positively to riboflavin therapy (P4). The treatment was started after diagnosis, leading to clinical stabilization.

The three patients (P6, P7, P8) detected through newborn screening were referred to metabolic units and at admission they were apparently in good health, presented a normal cardiac evaluation (echocardiogram and electrocardiogram), and all started treatment in the first days of life. None of these patients is riboflavin responsive. One of them, (P6) was hospitalized at 2 years old for vomiting and diarrhoea but no hypoglycaemia or metabolic acidosis were reported. Evolution was favourable and after 2 days of hospitalization the patient was sent home; however, 48 hours after discharge she became comatose and died. The remaining two patients, are currently (May 2011) eight months (P7) and five years old (P8), and have a normal growth, development and neurological examination.

Patients P8 and P4 are from the same family (son and father respectively). The parental diagnosis (P4) was possible through the familial investigation of the index case (P8), detected by newborn screening. Case P4 was diagnosed at 32 years old after multiple episodes of hospitalization and many consultations including psychiatry; the patient presents muscle disease with fatigability and slight elevation of CK 300 UI (N: ≤ 260) that normalized after riboflavin treatment. This is the only case in our series that is riboflavin responsive. Subject P8 is presently asymptomatic, but presents a persistent elevation of CK that gets worse during infectious diseases (CK levels between 320 and 1200 UI), that is not restored by riboflavin supplementation. For this case, CoQ10 therapy at 200 mg/day (10 mg/kg/day) was attempted during 3 months, with no noticeable improvement in CK levels.

All cases here reported presented an abnormal pattern of urinary organic acids. In P5 this pattern had intermittent abnormalities and showed several times high levels of 2-hydroxyglutaric acid in urine (202 – 220 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine; N: 2.8–7.0) and plasma (54 $\mu\text{mol}/\text{L}$; N: 0.28–0.93) that led us to consider a diagnosis of D-2-hydroxyglutaric aciduria (13,14). However, subsequent blood acylcarnitine profiling during a decompensation episode has shown an increase of acylcarnitines of all chain lengths, leading to a suspicion of MADD diagnosis. The acylcarnitine profile of the neonatal case (P3) that suddenly died at day two presented very high amounts of metabolites, in comparison with the moderate/mild forms (Table B). This finding is indicative of a severe biochemical blockage and supports the observed outcome.

1
2
3
4
5 **Molecular analysis:** Mutational analysis revealed five different mutations in *ETFDH* gene, three
6 of which have never been reported: (i) two missense mutations p.R155G and p.P534L (ii) one
7 extension of the ETF:QO polypeptide p.X618QextX14 and (iii) two splice mutations c.34+5G>C
8 and c.405+3A>T. In patient P5 we have identified the p.R191C mutation in the *ETFB* gene,
9 which has been already described in the literature (4). The novel mutations, p.X618QextX14,
10 c.34+5G>C and p.R155G are presented in homozygosity in neonatal forms in patients P1, P2
11 and P3 (Table A). The milder consanguineous cases P8 and P4, share the p.P534L mutation
12 that was found in homozygosity (P4) as well as in heterozygous state, together with the
13 p.R155G mutation (P8). The p.P534L mutation, the most frequent mutation identified in our
14 cases, was also in compound heterozygosity with the c.405+3A>T, c.34+5G>C and p.R534L.
15 The novel mutations identified in the present work account for a total of 50.1% of all mutated
16 alleles (p.R155G - 18.8%; c.34+5G>C - 18.8%; p.X618QextX14 - 12.5%).
17
18
19
20
21
22

23
24 **Structural analysis of ETF:QO mutations:** The novel point mutation p.R155G as well as the
25 most frequent mutation found (p.534L) were mapped in the ETF structure and analyzed in order
26 to rationalize their effect on the fold, stability and function of the protein. The p.R155G
27 modification, which has been found in two patients in this study, occurs at a relatively conserved
28 position throughout different homologues and it maps at the ubiquinone binding and membrane
29 interacting domains (Figure 1). This mutation is found nearby the entrance to the ubiquinone
30 binding site, and the positively charged Arg-155 is likely to be involved in the interaction with the
31 negatively charged membrane phospholipid heads. Therefore, changing this residue by a small
32 polar Gly is likely to affect membrane interaction. Also, Arg-155 forms a salt bridge with Asp-
33 292, which is nearby His-293, a residue within the ubiquinone pocket. Presumably, removal of
34 the Arg-155 is also likely to affect this network of interactions that might yield a defective
35 interaction with quinone. The predicted deleterious effects of this particular mutation on ETF:QO
36 structure are corroborated by the severe clinical phenotype (neonatal early death) observed in
37 the homozygous patient here described.
38
39

40
41 The point mutation here described is p.P534L, identified in 4/8 patients, and is located in a loop
42 within the iron-sulfur (FeS) domain, at the interface with the FAD domain (Figure 1). This
43 modification is expected to cause some destabilization, as prolines are responsible for sharp
44 turns in loops; therefore, replacement of this residue will necessarily affect the local
45 conformation. In this particular case, it will affect a network involving flanking residues,
46 especially Asp-532 which is salt-bridged with Lys-223 at a nearby turn from the FAD domain.
47 Although this mutation has a clear structural effect, it is not expected to fully compromise
48 ETF:QO folding and activity. In agreement, in the three compound heterozygote patients here
49 reported, this mutation was not lethal at the neonatal stage, indicating that in those cases the
50 ETFDH-p.P534L is at least partly functional. However, under metabolic decompensation the
51 mutation may become lethal as observed in the heterozygous compound patient also with the
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

c.34+5G>C splicing mutation (P6), or eventually in the context of the functionally more severe point mutation ETFDH-p.R155G (P8).

One of the other genetic anomalies reported in this study corresponding to a severe form with neonatal death is the one resulting in an extension of the ETF:QO polypeptide. The p.X618QextX14 mutation overrides the stop codon and the protein is expressed with additional 13 residues at its C-terminus (QTAASQFLSSMAS). Inspection of the structure shows that the C-terminal segment is buried within the protein structure, interfacing domains and additional residues very likely disrupt protein assembly. In fact that seems to be the case, as homozygosity for this mutation (P1) resulted in neonatal death. Finally, the ETF-p.R191C mutation found in P5 corresponds to a mutation in the *ETFB* gene, and has been recently analyzed *in vitro*: this mutation was found to have a mildly destabilizing effect and to affect the interaction with the acyl-CoA dehydrogenases (15).

Discussion

As shown in this study, MADD has a wide range of clinical, biochemical and molecular features. In fact, MADD is one of the most severe inborn errors of metabolism and is associated with significant morbidity and mortality, particularly in neonatal-onset cases (16). One of the patients here reported (P4) illustrates the fact that even the so-called less severe forms of the disease can in fact be lethal, especially during childhood. There are other reports of unexpected sudden death in infants suffering from MADD despite early diagnosis and treatment (17), and it has been hypothesized that some intrinsic abnormality of myocardial function due to altered energy production and/or metabolism affecting the heart may play a role in this fatal outcome.

Besides this, it is clear that newborn screening for MADD, which results in early detection and timely intervention, is critical for reducing the risk of morbidity and mortality associated with this disorder. In mild forms, the ongoing goal is to identify the optimal and most efficient treatment to minimize adverse outcomes. In the severe neonatal forms, an early and accurate diagnosis allows family studies, genetic counselling and ultimately prenatal diagnosis, as carried out in cases P2 and P3 here reported.

Expanded newborn screening allowed the detection of three patients, but alongside with these true positives, another newborn was identified as having a suspected biochemical profile of MADD. Complete sequencing of *ETFA*, *ETFB* and *ETFDH* revealed the presence of only one pathological mutation, p.P93PfsX8/N (c.278_279insC/N), in the exon 1 of *ETFB* gene, which together with an absolutely normal biochemical and clinical four year follow-up, points to a transient abnormality in adverse situations due to a heterozygous condition. Although never reported in MADD, this observation is not new in FAO disorders having been already reported associated to VLCADD (18, 19). In this study symptomatic and pre-symptomatic cases were not comparable because the different degrees of severity in patient groups (symptomatic ones were neonatal severe forms and mild forms; the detected cases through newborn screening were less severe forms).

1
2
3 The genetic study of the eight MADD patients here reported revealed three novel mutations in
4 the *ETFDH* gene, and the predominance of p.P534L, which is identified in 31% of the mutated
5 alleles. Although the molecular mechanism of MADD is still unclear, riboflavin supplementation
6 has been known to strikingly improve the clinical symptoms and metabolic profiles in a group of
7 MADD patients, particularly those with late-onset forms, such as patient P4. Recent reports
8 suggest that all riboflavin-responsive MADD are associated with *ETFDH* mutations. Additional
9 supplementation with CoQ10 may be useful in myopathic forms, but only in *ETFDH* mutations
10 associated with CoQ10 deficiency. From the two cases reported in this study that have muscle
11 symptoms, one is responsive to riboflavin treatment (P4) and the other (P8) is neither
12 responsive to riboflavin nor to CoQ10 treatments.

13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Analysis of protein structural data is a very useful strategy to rationalize how genetic variations
might impact on protein structure, stability and biological activity. In this group, protein structural
analysis of mutations in the *ETFDH* gene allowed to establish some possible correlations
between the genetic defect, the impact on protein structure and stability, and the clinical
phenotype. In spite of the many open questions about the impact of expanded newborn
screening on the outcome of patients with MADD, our work clearly points that a molecular and
structural analysis of disease mutations in patients can be very helpful in understanding clinical
evolution and in the establishment therapies and follow-up protocols for patients.

References

1. Frerman F, Goodman S. Defects of electron transfer flavoprotein and electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase: glutaric acidemia type II. In: Scriver C, Beaudet A, WS S et al., eds. The metabolic and molecular basis on inherited disease. New York: McGraw-Hill, 2001: 2357-2365.
2. Loehr JP, Goodman SI, Frerman FE. Glutaric acidemia type II: heterogeneity of clinical and biochemical phenotypes. *Pediatr Res* 1990; 27: 311-315.
3. Yotsumoto Y, Hasegawa Y, Fukuda S et al. Clinical and molecular investigations of Japanese cases of glutaric acidemia type 2. *Mol Genet Metab* 2008; 94: 61-67.
4. Schiff M, Froissart R, Olsen RK et al. Electron transfer flavoprotein deficiency: functional and molecular aspects. *Mol Genet Metab* 2006; 88:29: 153-158
5. Olsen RK, Andresen BS, Christensen E et al. Clear relationship between ETF/ETFDH genotype and phenotype in patients with multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency. *Hum Mutat* 2003; 22: 12-23.
6. Bross P, Corydon TJ, Andresen BS et al. Protein misfolding and degradation in genetic diseases. *Hum Mutat* 1999; 14: 186-198.
7. Henriques BJ, Rodrigues JV, Olsen RK et al. Role of flavinylation in a mild variant of multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency: a molecular rationale for the effects of riboflavin supplementation. *J Biol Chem* 2009; 284: 4222-4229.
8. Henriques BJ, Olsen RK, Bross P et al. Emerging roles for riboflavin in functional rescue of mitochondrial β -oxidation flavoenzymes. *Curr Med Chem* 2010; 17: 3842-3854.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

9. Zhang J, Frerman FE, Kim JJ. Structure of electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase and electron transfer to the mitochondrial ubiquinone pool. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 16212-16217.
10. Stanley C, Bennett M, Mayatepek E. Disorders of mitochondrial fatty acid oxidation and related metabolic pathways. In: Fernandes J, Saudubray J, van der Berghe G et al., eds. *Inborn metabolic diseases*. Berlin: Springer, 2006: 175-198.
11. Kahler S. Metabolic myopathies. In: Hoffmann G, Zschocke J, Nyhan W, eds. *Inherited metabolic diseases - a clinical approach*. Berlin: Springer, 2010: 161-176.
12. Vriend G. WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J Mol Graph* 1990; 8: 52-56, 29.
13. van der Knaap MS, Jakobs C, Hoffmann GF et al. D-2-Hydroxyglutaric aciduria: biochemical marker or clinical disease entity? *Ann Neurol* 1999; 45: 111-119.
14. Wagner L, Hoffmann GF, Jakobs C. D-2-hydroxyglutaric aciduria: evidence of clinical and biochemical heterogeneity. *J Inherit Metab Dis* 1998; 21: 247-250.
15. Henriques BJ, Bross P, Gomes CM. Mutational hotspots in electron transfer flavoprotein underlie defective folding and function in multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1802: 1070-1077.
16. Vockley J. Glutaric aciduria type 2 and newborn screening: Commentary. *Molecular Genetics and Metabolism* 2008; 93: 5-6.
17. Angle B, Burton B. Risk of sudden death and acute life-threatening events in patients with glutaric acidemia type II. *Molecular Genetics and Metabolism* 2008; 93: 36-39.
18. Gobin-Limballe S, McAndrew RP, Djouadi F et al. Compared effects of missense mutations in Very-Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase deficiency: Combined analysis by structural, functional and pharmacological approaches. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1802: 478-484.
19. ter Veld F, Mueller M, Kramer S et al. A novel tandem mass spectrometry method for rapid confirmation of medium- and very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in newborns. *PLoS One* 2009; 4: e6449.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Legends

Table A - Clinical, biochemical and molecular characterization of patients in this work

Table B - Comparison of the acylcarnitine values from three patients detected through newborn screening (P6, P7, P8) a severe neonatal patient (P3) and a suspected case were only one mutation was identified (heterozygous). In all of these cases the blood spots were collected until 6th day of life.

Figure 1 - Structural representation of ETF:QO outlining the positions of the missense mutations (Arg155 and Pro534, dotted circles), cofactors (FAD, Flavin adenine dinucleotide; FeS, [4Fe-4S] iron sulfur cluster; UQ, ubiquinone) and presumed membrane interaction region (grey box). The protein termini are also highlighted (N, N-terminus; C, C-terminus). Cylinders represent alpha-helices and arrows denote beta-strands. The cartoon represent the homology model of human ETF:QO.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Patient	Consanguinity	Sex	Clinical type	Symptoms at onset	Biochemical abnormalities	Course	Molecular diagnosis
1	No	Male	I	Facial dysmorphism Hypotonia Hepatomegaly Convulsions	Hypoglycemia Metabolic acidosis Hyperammonemia	Died in day 5 of life	p.X618QextX14/ p.X618QextX14 ETFDH gene
2	No	Male	I	Hepatomegaly Polycystic kidneys Hypotonia	Hypoglycemia Raised transaminases Metabolic acidosis	Died in day 4 of life	c.34+5G>C/c.34+5G>C ETFDH gene
3	No	Male	II	Sudden infant dead	Hypoglycemia	Died in day 2 of life ?	p.R155G/ p.R155G ETFDH gene
4	Yes	Male	III	3 years of age Recurrent vomiting Exercise intolerance	Raised CK	33 years old Asymptomatic	p.P534L/p.P534L ETFDH gene
5	No	Fem	III	2 years of age Recurrent vomiting	Raised transaminases Metabolic acidosis Ketonuria	19 years old Learning disabilities	p.R191C/p.R191C ETFB gene
6	No	Fem		Asymptomatic (detected by newborn screening)		Died at 2 years of life	p.P534L/ c.34+5G>C ETFDH gene
7	No	Male		Detected by newborn screening Sepsis?	Hypoglycemia	8 months old Normal growth and development	c.405+3A>T /p.P534L ETFDH gene
8	Yes	Male	III	Asymptomatic (detected by newborn screening)	Raised CK	5 years old Normal growth and development	p.R155G/p.P534L ETFDH gene

Table A - Clinical, biochemical and molecular characterization of patients in this work

Table B - Comparison of the acylcarnitine values from three patients detected through newborn screening (P6, P7, P8) a severe neonatal patient (P3) and a suspected case were only one mutation was identified (heterozygous). In all of these cases the blood spots were collected until 6th day of life.

Marker	Reference values (µmol/L)	P6	P7	P8	P3	Suspect case not confirmed
Free carnitine	>9.13	50.69	34.56	36.52	34.82	33.25
Butyrylcarnitine	<0.85	0.61	0.55	0.79	3.20	0.53
Isovalerylcarnitine	<1.00	1.22	0.33	0.93	2.05	0.21
Hexanoylcarnitine	<0.13	0.52	0.57	0.85	0.43	0.37
Octanoylcarnitine	<0.26	0.98	1.70	1.22	1.19	1.29
Decanoylcarnitine	<0.39	2.30	3.20	1.89	1.39	1.84
Glutarylcarnitine	<0.20	0.20	0.37	0.07	2.65	0.43
Dodecanoylcarnitine	<0.45	1.79	2.50	2.02	2.31	0.46
Tetradecanoylcarnitine	<0.40	1.36	1.65	1.51	1.74	0.41
Tetryradecanoilcarnitine	<0.52	1.63	1.92	1.98	4.44	0.35

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Review Only

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

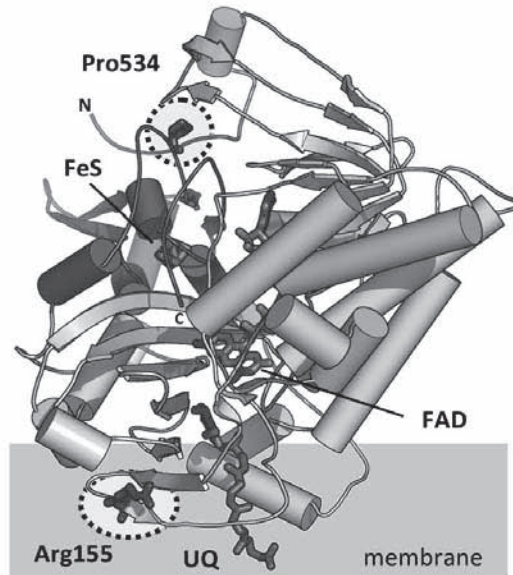


Figure 1 - Structural representation of ETF:QO outlining the positions of the missense mutations (Arg155 and Pro534, dotted circles), cofactors (FAD, Flavin adenine dinucleotide; FeS, [4Fe-4S] iron sulfur cluster; UQ, ubiquinone) and presumed membrane interaction region (grey box). The protein termini are also highlighted (N, N-terminus; C, C-terminus). Cylinders represent alpha-helices and arrows denote beta-strands. The cartoon represent the homology model of human ETF:QO.

4.2- Importância do rastreio alargado nas famílias

Artigo 7 - Outcome of three cases of untreated maternal glutaric aciduria type I. Eur J Pediatr 2008; 167:569-73

Após o alargamento do rastreio a novas patologias, começaram a ser diagnosticados alguns casos de mães afectadas de DHM, na sequência da investigação das alterações bioquímicas (secundárias) encontradas no sangue do RN. Algumas das mães, apresentavam sintomas como fadiga crónica associada a diminuição da carnitina e noutras foi detectado atraso cognitivo ligeiro sem diagnóstico etiológico definido como é o caso das mães com glutárica tipo I referidas neste artigo. O seguimento dos RN não revelou sequelas aparentes devidas à diminuição da carnitina plasmática materna durante o desenvolvimento fetal ou à exposição pré-natal ao ácido glutárico e 3-hidroxi-glutárico.

Artigo 8 - Methionine adenosyltransferase I/III deficiency in Portugal: high frequency of a dominantly inherited form in a small area of Douro high lands (submetido).

A grande maioria das DHM tem uma transmissão autossómica recessiva pelo que heterozigóticos são assintomáticos.

No défice em metionina adenosiltransferase, a forma de transmissão encontrada nos nossos casos, é fundamentalmente autossómica dominante. Embora seja uma situação em termos clínicos aparentemente benigna, verificamos um aumento da homocisteína total na maioria dos adultos portadores do alelo mutado (pais, tios, avós) diagnosticados através do estudo familiar que embora ligeira, se traduz num risco acrescido para acidentes trombóticos. Por este motivo, os casos encontrados foram referenciados ao médico de família e fizeram avaliação de outros factores de risco associados a acidente vascular cerebral e enfarte do miocárdio.

Outcome of three cases of untreated maternal glutaric aciduria type I

Paula Garcia · Esmeralda Martins · Luísa Diogo · Hugo Rocha · Ana Marcão · Eurico Gaspar · Margarida Almeida · Catarina Vaz · Isabel Soares · Clara Barbot · Laura Vilarinho

Received: 12 February 2007 / Revised: 12 June 2007 / Accepted: 13 June 2007 / Published online: 28 July 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract We report, for the first time, the outcome of three children born to two women with untreated glutaric aciduria type I (GA I). Isolated hypocarnitinemia in neonatal screening in one baby allowed the identification of the disease in his mother, who was undiagnosed so far and had had a previous daughter. The other baby was born to an already diagnosed mother who was not treated; newborn screening in the child reflected the metabolic state of the mother. Biochemical abnormalities returned to normal within one week. At the age of 4 months, neuroimaging showed Sylvian enlargement in both infants and bilateral temporal arachnoid cysts in one. Physical and neurological developments were normal for the three patients at ages 2 and 5 years. We conclude that long-term

follow up will determine the true impact of GA I in such children.

Keywords Glutaric aciduria · GLUT1 · Maternal glutaric aciduria · Low free carnitine · Pregnancy and glutaric · Expanded neonatal screening

Abbreviations

GA I Glutaric aciduria type I
C0 Free carnitine
GCDH Glutaryl-CoA dehydrogenase

Introduction

Glutaric aciduria type I (GA I, MIM 231670) is an autosomal recessive metabolic disorder with an estimated prevalence of 1/100,000 neonates [13], and it is characterized by a progressive movement disorder that usually starts in the first year of life [6]. GA I is caused by mutations in the GCDH gene, encoding glutaryl-CoA dehydrogenase (GCDH, EC. 1.3.99.7). The typical clinical presentation of GA I is that of an early-onset acute encephalopathy during an intercurrent illness, followed by dystonic-dyskinetic movements [9]. A small group of GA I patients remain asymptomatic, even in adult life [1, 9]. Neuroimaging hallmarks of GA I include fronto-temporal brain atrophy with macrocephaly and bilateral striatal necrosis. The biochemical diagnosis of GA I is established by high levels of glutaric acid (GA) and 3-hydroxyglutaric acid (3-OHGA) in urine, serum, and cerebrospinal fluid. It is now widely agreed that GA I should be included in programs of extended newborn screening [13, 21], since there are no specific alerting manifestations before the onset of enceph-

Paula Garcia and Esmeralda Martins contributed equally to this work.

P. Garcia · L. Diogo · M. Almeida · C. Vaz
Hospital Pediátrico de Coimbra,
Av. Bissaya Barreto,
3000 Coimbra, Portugal

E. Martins · C. Barbot
Hospital de Crianças Maria Pia,
R. Boavista,
827 4050 Porto, Portugal

H. Rocha · A. Marcão · L. Vilarinho (✉)
Instituto de Genética Médica Jacinto de Magalhães,
Laboratório Nacional de Rastreios,
Praça Pedro Nunes, 88,
4099-028 Porto, Portugal
e-mail: laura.vilarinho@igm.min-saude.pt

E. Gaspar · I. Soares
Centro Hospitalar de Vila Real,
5000 Lordelo, Vila Real, Portugal

alopathy, and early diagnosis and therapy may reduce the risk of acute dystonia [9].

Several inborn errors of metabolism are reportedly harmful during pregnancy, for the affected mother, her fetus, or both. Phenylketonuria (PKU) represents the typical example of a maternal metabolic disorder that affects the developing fetus [8], but there are descriptions of successful pregnancies in mothers with other metabolic disorders, including organic acidurias [20]. Here, we present, for the first time, the outcome in three babies born to untreated GA I women. In one case, the disease in the mother was detected because her child underwent expanded neonatal metabolic screening.

Materials and methods

GA I has part of the Portuguese Neonatal Screening Program since 2005 [22]. Blood spots are collected between the 3rd and 6th day of life, and amino acids and acylcarnitines are analyzed as butyl esters by tandem mass spectrometry (MS/MS) using an API 2000 triple quadrupole tandem mass spectrometer (Applied Biosystems, Sciex). Glutaryl carnitine level and the glutaryl carnitine/acylcarnitine ratio are determined to improve the diagnostic sensitivity and specificity of GA I, as previously reported [12].

Molecular analyses of the GCDH gene in peripheral blood DNA from the patients and their children were performed as described [4].

We searched the literature for infants with maternal GA I in PubMed and Highwire using the following key words: maternal and glutaric; pregnancy, and glutaric, but no reports of maternal GA I were found.

Results

In the past two years, a total of 150,000 neonates underwent an expanded neonatal screening. Very low free carnitine values were detected in less than five cases, two of which are herein discussed.

Case 1 Case 1 was born after an uneventful pregnancy and delivery at term. At birth, his body weight was 3,515 g, length 52.5 cm, and head circumference 36 cm. At the age of 5 days, neonatal screening detected low free carnitine levels (3.6 $\mu\text{mol/L}$; reference range 8 to 63), which was confirmed (4.6 $\mu\text{mol/L}$) in a recall test at the age of 7 days. Carnitine supplementation was started and the child was fed with maternal milk for the first 2 months. At the age of 4 months, his brain magnetic resonance imaging (MRI) showed slightly enlarged Sylvian fissure, bilaterally (Fig. 1). At the age of 1 year, his growth was on the 75th

centile and his global development quotient was 97, when assessed by the Griffiths Development Scale (GDS) [7].

A few days after the metabolic findings in case 1, GA I was diagnosed in his 24-year-old-mother because of elevated GA (2,051 $\mu\text{mol/mmol}$ creatinine, normal <5) and increased 3-hydroxy glutaric acid (3-OHGA) in urine, with hypocarnitinemia (1.7 $\mu\text{mol/L}$, reference range 30–50). Gene testing showed two heterozygous mutations (p.Arg402Trp and p.Gly390Val) in the GCDH gene.

She had been followed at our hospital between the ages of 15 months and 10 years for hypotonia, macrocephaly, and learning disabilities. Family history was unremarkable. The patient graduated in regular school with special teaching support. Her present physical examination is unremarkable, but she has a moderate mental deficit (IQ 75) when assessed by the Wechsler Adult Intelligence Scale (WAIS) [23]. Brain MRI shows typical features of GA I.

Case 2 The mother of case 1 had a previously uneventful pregnancy and delivery. The newborn was screened only for PKU and congenital hypothyroidism. She is now 5 years old and develops normally (global IQ 103), shows unremarkable plasma carnitine level (48 $\mu\text{mol/L}$), urinary organic acids, acylcarnitine profile, and brain MRI (Fig. 2).

Case 3 Case 3 is a boy born after an uneventful pregnancy and delivery to a 21-year-old mother with GA I. This woman presented at the age of 8 years with macrocephaly, mild developmental delay (IQ 75 when assessed by the Wechsler Intelligence Scale for Children WISC), and epilepsy, which was controlled with carbamazepine and vigabatrin. Her brain MRI showed widened Sylvian fissures, fronto-temporal atrophy with secondary ventriculomegaly, and delayed myelination. Her urinary GA and 3-OHGA levels were elevated (9,410 $\mu\text{mol/mmol}$ creatinine and 880 $\mu\text{mol/mmol}$ creatinine, respectively), and her total

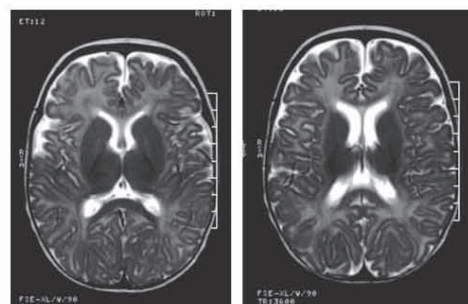


Fig. 1 Brain magnetic resonance imaging (MRI) of case 1 at 4 months of age. T2-weighted images show moderate slight frontal and insular atrophy

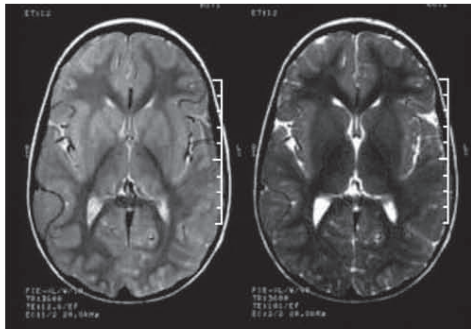


Fig. 2 Brain MRI of case 2 at age 3.5 years. Normal image for age

plasma carnitine level was low ($2 \mu\text{mol/L}$; normal: >35). When measured, the GCDH activity in fibroblasts was nearly absent ($<1\%$ of the lowest reference value). The patient harbors a homozygous p.Arg402Trp mutation in the GCDH gene.

At the age of 20 years, she became pregnant, but her diet was not supplemented with carnitine, against her physician's advice. During her pregnancy, vigabatrin was stopped and carbamazepine was continued in low doses (600 mg/day) with extra folic acid intake. No crises were registered during this time.

At birth, the child was normal (body weight $3,160 \text{ g}$, length 49 cm , and head circumference 34.5 cm). Neonatal screening for GA I was performed at day 1 of life. An increase of glutarylcarntine ($0.22 \mu\text{mol/L}$; reference range <0.14) and glutarylcarntine/palmitoylcarntine ($0.32 \mu\text{mol/L}$; reference range <0.09), with extremely low free carnitine ($3.4 \mu\text{mol/L}$; reference range >12) was found. L-carnitine supplementation was started immediately, with rapid correction of the metabolic profile, as documented by the second blood spot at the age of 6 days; therefore, a restricted protein diet was begun and carnitine supplement was stopped. At the age of 24 months, case 3 showed normal growth (50th centile), as well as normal psychomotor development. At the age of 4 months, a brain computed tomography (CT) scan showed enlarged fronto-temporal fissures and bilateral temporal arachnoid cysts (Fig. 3a). These changes had disappeared in subsequent scans at 23 months of age (Fig. 3c) and in a brain MRI, although a slight hyperintense signal was present in peritrigonal areas (Fig. 3b).

Discussion

GCDH deficiency is a neurological organic aciduria characterized by early-onset macrocephaly and motor consequences of acute encephalopathy, which usually occur during inter-

mittent illnesses and cause irreversible bilateral striatal damage. Inter- and intra-familial variability in clinical presentation is possible and raises important questions in terms of incidence and prevalence, pathogenesis, and patients' management.

GA I is a treatable condition and metabolic crisis can usually be prevented with adequate support. Since the beginning of expanded neonatal screening, an increasing number of affected neonates have been treated presymptomatically, and this might influence the natural history of

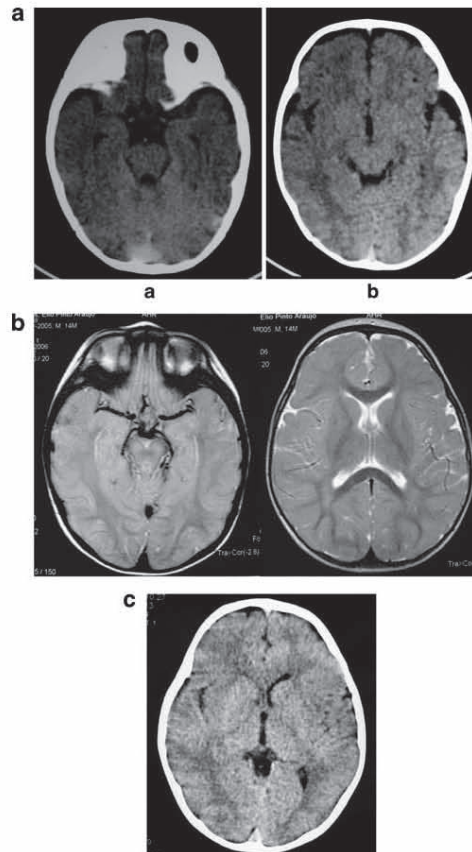


Fig. 3 Brain computed tomography (CT) scans and MRI of case 3. a Brain CT scan at the age of 4 months showing large fronto-temporal cerebrospinal fluid (CSF) spaces (a) and the enlargement of Sylvian fissures (b). b Brain MRI at 14 months of age showed that the initial abnormalities presented at 4 months of age had disappeared; only a slight hyperintense signal in peritrigonal areas was present. c Brain CT scan at 23 months old showed that the alterations presented at 4 months of age had disappeared

this disease [9]. Neonatal screening has also brought to light infants with secondary hypocarnitinemia because of low maternal carnitine levels, similar to case 1 in this work. Thus, low carnitine levels should prompt the analysis of a second blood spot, since this might relate to the metabolic condition of an affected mother during pregnancy. A similar observation has been reported in women with 3-methylcrotonyl-CoA-carboxylase deficiency, whose children showed elevated 3-hydroxy-isovalerylcarnitine at newborn screening [5]. A number of asymptomatic women with carnitine transporter defect detected from low carnitine levels in their infants have recently been reported [19]. It is likely that additional cases will emerge because of the wider use of the extended neonatal screening.

Although untreated and, more importantly, not supplemented with carnitine, both women had no metabolic decompensation during gestation or in the post-partum period. Surprisingly, the high levels of GA and 3-OHGA [9] apparently did not significantly affect their sons, who were submitted to an abnormal environment during the whole pregnancy. However, we cannot exclude that minor consequences will reveal during school years or even later. On the other hand, it is possible that the brain alterations observed at neuroimaging in these children reflect some delayed maturation, but they appear different from changes usually observed in GA I newborns. In particular, macrocephaly and dilatation of the quadrigeminal cistern were not present [10]. In addition, the maternal uses of low doses of carbamazepine do not seem to account for the CT scan alterations. This drug is currently used in pregnant epileptic women and there are no reported cases of this kind of neuroimaging alterations in the sons [3].

The structural similarity of GA and 3-OHGA to glutamic acid, an excitatory neurotransmitter and the precursor of γ -aminobutyric acid, are often invoked to explain the selective vulnerability of the frontal and temporal cortex during gestation [10, 18]. Alternatively, fronto-temporal degeneration and chronic subdural effusion in GA I might be the effect of 3-OHGA on endothelial structures during brain development with subsequent vascular dysfunction [14]. Fetal maturation could also be influenced by the low levels of maternal carnitine [2, 15, 16], although it seems that the fetus is capable of independent carnitine synthesis *in utero* [17]. Only long-term follow up will permit us to determine the true impact of GA I during pregnancy.

In conclusion, an increased number of women carrying inborn errors of metabolism are now reaching the reproductive age, but, because of the rarity of individual disorders, knowledge of the risks for mothers and their babies is still limited [11]. Whilst we report the outcome of two pregnancies in GA I, we call attention to the additional advantage of the expanding neonatal screening in the identification of mothers whose diagnosis have remained undetected so far.

Acknowledgments The authors are grateful to F. M. Santorelli, MD, PhD, for the careful reading of the manuscript and E. Christensen, PhD, Copenhagen, Denmark, for performing the enzymatic study.

References

1. Amir N, Elpeleg ON, Shalev RS, Christensen E (1989) Glutaric aciduria type I: enzymatic and neuroradiologic investigations of two kindreds. *J Pediatr* 114:983–989
2. Arenas J, Rubio JC, Martin MA, Campos Y (1998) Biological roles of L-carnitine in perinatal metabolism. *Early Hum Dev* 53:43–50
3. Artama M, Auvinen A, Raudaskoski T, Isojärvi I, Isojärvi J (2005) Antiepileptic drug use of women with epilepsy and congenital malformations in offspring. *Neurology* 64:1874–1878
4. Busquets C, Soriano M, de Almeida IT, Garavaglia B, Rimoldi M, Rivera I, Uziel G, Cabral A, Coll MJ, Ribes A (2000) Mutation analysis of the GCDH gene in Italian and Portuguese patients with glutaric aciduria type I. *Mol Genet Metab* 71:535–537
5. Gibson KM, Bennet MJ, Naylor EW, Morton DH (1998) 3-Methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase deficiency in Amish/Mennonite adults identified by detection of increased acylcarnitines in blood spots of their children. *J Pediatr* 132:519–523
6. Goodman SI, Markey SP, Moe PG, Miles BS, Teng CC (1975) Glutaric aciduria: a "new" disorder of amino acid metabolism. *Biochem Med* 12:12–21
7. Griffiths R (1954) The abilities of babies. University of London Press, London, UK
8. Levy HL (2003) Historical background for the maternal PKU syndrome. *Pediatrics* 112:1516–1518
9. Kolker S, Garbade SF, Greenberg CR, Leonard JV, Saudubray JM, Ribes A, Kalkanoglu HS, Lund AM, Merinero B, Wajner M, Troncoso M, Williams M, Walter JH, Campistol J, Marti-Herrero M, Caswill M, Burlina AB, Lagler F, Maier EM, Schwahn B, Tokatli A, Dursun A, Coskun T, Chalmers RA, Koeller DM, Zschocke J, Christensen E, Burgard P, Hoffmann F (2006) Natural history, outcome, and treatment efficacy in children and adults with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr Res* 59:840–847
10. Kolker S, Koeller DM, Sauer S, Horster F, Schwab MA, Hoffmann GF, Ullrich K, Okun JG (2004) Excitotoxicity and bioenergetics in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inher Metab Dis* 27:805–812
11. Lee PJ (2006) Pregnancy issue in inherited metabolic disorders. *J Inher Metab Dis* 29:311–316
12. Lindner M, Ho S, Fang-Hoffmann J, Hoffmann GF, Kolker S (2006) Neonatal screening for glutaric aciduria type I: strategies to proceed. *J Inher Metab Dis* 29:378–382
13. Lindner M, Kolker S, Schulze A, Christensen E, Greenberg CR, Hoffman GF (2004) Neonatal screening for glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inher Metab Dis* 27:851–859
14. Muhlhausen C, Ergun S, Strauss KA, Koeller DM, Crnic L, Wootmer M, Goodman SI, Ullrich K, Braulke T (2004) Vascular dysfunction as an additional pathomechanism in glutaric aciduria type I. *J Inher Metab Dis* 27:829–834
15. Nakano C, Takashima S, Takeshita K (1989) Carnitine concentration during the development of human tissues. *Early Hum Dev* 19:21–27
16. Oey NA, den Boer ME, Wijburg FA, Vekemans M, Auge J, Steiner C, Wanders RJ, Waterham HR, Ruijter JP, Attie-Bitach T (2005) Long-chain fatty acid oxidation during early human development. *Pediatr Res* 57:755–759
17. Oey NA, van Viles N, Wijburg FA, Wanders RJ, Attie-Bitach T, Vaz FM (2006) L-carnitine is synthesized in the human fetal-placental unit: potential roles in placental and fetal metabolism. *Placenta* 27:841–846

18. Sauer SW, Okun LG, Fricker G, Mahringer A, Muller I, Crnic LR, Muhlhausen C, Hoffmann GF, Horster F, Goodman SI, Harding CO, Koeller DM, Kolker S (2006) Intracerebral accumulation of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids secondary to limited flux across the blood–brain barrier constitute a biochemical risk factor for neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Neurochem* 97:889–910
19. Vijay S, Patterson A, Olpin S, Henderson MJ, Clark S, Day C, Savill G, Walter JH (2006) Carnitine transporter defect: diagnosis in asymptomatic adult women following analysis of acylcarnitines in their newborn infants. *J Inherited Metab Dis* 29:627–630
20. Spinty S, Rogozinski H, Lealman GT, Wraith JE (2002) Second case of a successful pregnancy in maternal isovaleric acidemia. *J Inher Metab Dis* 25:697–698
21. Superti-Furga A (2003) Glutaric aciduria type I and neonatal screening: time to proceed—with caution. *Eur J Pediatr* 162:S17–S20
22. Vilarinho L, Rocha H, Marcão A, Sousa C, Fonseca H, Bogas M, Vaz Osório R (2006) Diagnóstico Precoce: Resultados preliminares do rastreio metabólico alargado. *Acta Pediatr Port* 37:186–191
23. Wechsler D (1955) Wechsler Adult Intelligence Scale. Manual. Psychological Corporation, New York

Methionine adenosyltransferase I/III deficiency in Portugal: high frequency of a dominantly inherited form in a small area of Douro high lands

Martins E (2), Marcão A (1), Bandeira A (2), Fonseca H (1), Nogueira C (1) and Vilarinho L (1)

1. National Institute of Health (INSA), Newborn Screening Unit, Porto, Portugal
2. Oporto Hospital Center, Maria Pia Unit , Porto, Portugal

Communicating author: Martins E
esmeralda.g.martins@gmail.com

Word counts for the text: 2179

Word counts for the summary: 215

Number of figures: 2

Number of tables: 2

Summary: Methionine adenosyltransferase deficiency (MAT I/III deficiency), is an inborn error of metabolism resulting in isolated hypermethioninemia, and usually inherited as an autosomal recessive trait, although a dominant form has been reported in several families.

During the last six years, approximately 520,000 newborns were screened in the Portuguese Newborn Screening Laboratory by MS/MS, and twenty-one cases of persistent hypermethioninemia were found. One case confirmed to be a classical homocystinuria and twenty cases were confirmed by *MAT1A* gene analysis to have an isolated elevation of methionine due to MAT I/III deficiency, which indicates an incidence for this condition of 1/26,000. Twelve of the MAT I/III deficient newborns, belonging to eleven families, were identified in the northern region of Portugal and sent to the same treatment center, where they are under follow-up. Clinical, biochemical and genetic characteristics of individuals from these eleven families are presented. Plasmatic methionine and homocysteine levels were found to be moderately increased in all newborns and molecular analysis revealed that they all were heterozygous for R264H mutation. Normal growth, development and neurological examination were observed in all cases and cerebral MRI, performed in six cases, revealed myelination abnormalities in one case. Control plasmatic methionine levels for all twelve cases were always below 300 μ M, and they are all in a normal diet for their age.

Synopsis: High frequency of isolated hypermethioninemia detected in Portuguese newborn screening due to a dominantly inherited MAT I/III deficiency form associated with R264H mutation.

Keywords: MAT I/III deficiency, hypermethioninemia, methionine adenosyltransferase, hyperhomocysteinaemia.

Abbreviations:

MAT – methionine adenosyltransferase

MRI – magnetic resonance imaging

MS/MS – tandem mass spectrometry

AdoMet – S-adenosylmethionine

CNS – central nervous system

Introduction

Over the last decade, high-throughput methods for multicomponent analyses, especially tandem mass spectrometry (MS/MS) have transformed newborn population screening. The overall frequency of disorders detected by MS/MS in Portugal is about one out of every 2,396 (Vilarinho et al 2010).

Methionine adenosyltransferase deficiency (MAT I/III deficiency, OMIM 250850) is an inborn error of metabolism resulting in isolated hypermethioninemia and one of the 25 diseases integrated in the panel of the Portuguese National Newborn Screening Program. This enzyme (MAT, EC 2.5.1.6) catalyses the biosynthesis of S-adenosylmethionine from methionine and ATP, and both forms of hepatic MAT (MAT I and III) are encoded by *MAT1A* gene (Mudd et al 2001). In the majority of the cases, MAT I/III deficiency is inherited as an autosomal recessive trait, although a dominant form has been reported in several families, associated with the R264H mutation (Chamberlin et al 1997; Chou 2000).

Pathogenesis in this disease is not clearly elucidated and it might result from different factors: extraordinarily high plasma methionine levels can directly contribute to neurological abnormalities (Mudd 2011), the lack of synthesis of S-adenosylmethionine (AdoMet) dependent methylated products can cause demyelination (Chamberlin et al 1996), and hyperhomocysteinaemia might be in the origin of an elevated risk of vascular and thrombotic diseases (Stabler et al 2002).

Clinical manifestations in individuals with isolated persistent hypermethioninemia due to deficient MAT I/III activity are variable, depending on the extend of the methionine

elevation which, on the other hand, seems to be related with the specific *MAT1A* gene mutation (Mudd 2011). In cases associated with R264H mutation, approximately 30% of residual enzyme activity can be found (Chamberlin et al 1997) and according with this, clinical outcome is usually favourable (Pérez-Mato et al 2001). Nevertheless, caution is recommended regarding the establishment of genotype/ phenotype correlations to predict the development of CNS problems (Mudd 2011). The optimal management of MAT I/III deficiency also remains to be defined, and the clinical and biochemical follow-up of more patients and during more years is required to achieve definitive conclusions. Before the introduction, in 2004, of the MS/MS technology in the Portuguese Newborn Screening Laboratory, no cases of MAT I/III deficiency were reported in our population. Since then, 20 newborns and several related individuals were identified, revealing the under-diagnosis of this condition in Portugal.

The authors describe the clinical, biochemical and genetic characteristics of eleven families with MAT I/III deficiency identified by newborn screening, and which are under follow-up in the Oporto Hospital Center. The aims of this work were: (i) to determine the frequency of hypermethioninemia due to MAT I/III deficiency in the Portuguese population, (ii) to characterize the genotype of affected individuals and try to establish genotype/ phenotype correlations to predict the clinical outcome, and (iii) to study the families in order to identify other individuals at risk.

Patients and Methods

During the last six years, approximately 520,000 newborns, originating from whole country, were screened in the Portuguese Newborn Screening Laboratory by MS/MS.

Blood samples were collected between the 3rd and 6th days of live on Whatman 903 filter paper and the analysis of amino acids and acylcarnitines, as butyl esters (Rashed et al 1995), was performed using two API 2000 triple quadrupole tandem mass spectrometers. Methionine quantification, allows the detection of remethylation disorders, namely cystathionine β -synthase deficiency, as well as hypermethioninemia due to MAT I/III deficiency. The positive screening criterion used for both this conditions was a methionine value above 50 μ M. The cases of transitory hypermethioninemia were ruled out by asking a second sample for confirmation, and only newborns with persistent high methionine levels were sent to a treatment center for further evaluation: plasmatic and urinary amino acids

chromatography, plasmatic homocysteine, urinary organic-acid analysis as well as hepatic function evaluation were performed.

In the cases with an isolated persistent high methionine level, MAT I/III deficiency was confirmed by *MATIA* gene analysis. Genomic DNA was extracted from dried blood spots in the BioRobot®EZ1, using the EZ1 DNA Tissue Kit from Qiagen. *MATIA* gene exons I to IX and the corresponding intronic flanking areas were PCR amplified, directly sequenced using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Version 3.1 from Applied Biosystems and analyzed on an ABI3130XL DNA Analyzer.

Results

Since 2004, twenty-one cases of persistent hypermethioninemia were confirmed in 520,000 newborns screened in Portugal. One case presented cystathionine beta-synthase deficiency and twenty cases (14 females and 6 males) were confirmed to have an isolated elevation of methionine due to MAT I/III deficiency, which indicates an incidence for this condition of 1/26,000 newborns. Twelve of these individuals, belonging to eleven families, were identified in the northern region of Portugal and sent to the same treatment center (Table 1). These patients presented a methionine level at screening ranging from 52 to 124 μM (85 μM average level; normal < 50 μM). At confirmation (sampling day between 15 days and 1 month), methionine levels raised in most patients and ranged from 79 to 247 μM (151 μM average level; normal < 50 μM). Plasmatic homocysteine was found to be moderately increased in all patients but one (range: 13–21 μM ; normal < 9 μM). Patient 12 was found to have an exceptionally high homocysteine level (64 μM ; normal < 9 μM), and a possible diagnosis of classic homocystinuria was suspected. While waiting for confirmation, a low protein diet was immediately started and after 48h, homocysteine levels came down to 17 μM . After the exclusion of this diagnosis, a normal protein diet was resumed and total homocysteine levels never went again above 20 μM .

Molecular analysis from the twelve cases revealed that they all were heterozygous for the R264H mutation (Table 1, Figure 1), and present no other mutation in the *MATIA* gene. The parents of the index cases were studied and as expected, one of them in each family was found to be heterozygous for the R264H mutation. Parents' plasma methionine levels were also measured, and except for the mother of patient 3, which presented normal methionine, and the mother of patient 12, for whom it was not possible to measure the methionine level, all other parents with R264H mutation presented moderately elevated methionine levels. Except for families of patients 1 and 4, the parents' methionine levels

are lower than the ones from their children. For some of the parents, the plasma homocysteine levels were also analysed and found to be moderately increased (data not shown). In several families, methionine was quantified by MS/MS, not only in parents but also in other relatives and the ones presenting high methionine levels all confirmed to be R264H carriers (Table 2).

These twelve cases (ages between 1 and 6 years old) are under biochemical and clinical follow-up in Oporto Hospital Center and until now all present normal growth, development and neurological examination. Cerebral MRI was performed in the six index cases with more than two years old and only in case 6 myelination alterations were observed.

Families from cases 1 and 6 had positive histories for severe vascular disease episodes. Index cases from both families had grand-fathers that died, respectively, at 40 and 44 years old, due to thrombotic events, and without any risk factors identified. The father of patient 10 also had a myocardium infarction at a young age, but in this family a history of mild hypercholesterolemia also exists.

Discussion

Screening programs must be adapted to the ethnic and genetic background, customs, social characteristics, medical environment and economic status of a country. Based in our previously experience in the diagnosis of metabolic disorders in Portugal, our program integrates some diseases which are prevalent in our population, namely arginase deficiency, 3-hydroxy-3-methylglutarylCoA lyase deficiency and classic homocystinuria. Ten cases of this later disease had been previously diagnosed in our center, and because of that, methionine measurement was integrated in our MS/MS screening approach. Unexpectedly, during these six years of MS/MS screening only one case of classic homocystinuria was found and the first cause of hypermethioninemia in Portuguese newborns revealed to be MAT I/III deficiency (20 out of 21 cases), although no cases were previously known in our country.

Most reports on this condition are recent since they are subsequent to the introduction of the MS/MS technology in newborn-screening programs. Its true incidence worldwide is not known, but it is for sure under diagnosed (Ivo Barić 2009). The frequency found in our population (1:26,000) is similar to the one reported in Galicia (Couce et al 2008), which may indicate a similar frequency in whole Iberian Peninsula.

The molecular study of *MATIA* gene allowed the confirmation of all suspected MAT I/III deficient cases. Twelve of these cases originate from a small area of Douro high lands in

the northern region of Portugal (Figure 2), and all of them revealed to be heterozygotes for R264H mutation. At least 37 mutations have so far been reported in *MATIA* gene (Mudd 2011), R264H exceptionally behaves as a dominant mutation and causes relatively mild hypermethioninemia, even in heterozygotes. This behavior is explained by the fact that the R264H mutated subunit can form inactive dimers with the normal subunit (Chamberlin et al 2000; Pérez-Mato et al 2001). R264H heterozygosity seems to be relatively frequent among the patients identified by screening for methionine (Chien et al 2005; Couce et al 2008) and it's usually considered to be clinically benign (Pérez-Mato et al 2001). The complete lack of MAT I/III activity can represent a risk for development of brain demyelination, but low levels of activity seem to be sufficient to maintain clinical well-being (Chamberlin et al 1996). R264H heterozygotes' parents and grandparents were found to be healthy, which is in accordance with the residual enzyme activity reported to be associated with this mutation (Chamberlin et al 1997) and which is reflected in the moderately high methionine levels previously reported for these individuals (Couce et al 2008) and confirmed in this study. Nevertheless, several MAT I/III deficient patients were reported which presented CNS problems, and although most of them had high plasma methionine levels, certainly indicating severe MAT I/III deficiencies, genotype/ phenotype correlations to predict the development of CNS involvement are still not identified (Mudd 2011). We thus decided to perform cerebral MRI to our children, besides the regular clinical and biochemical monitoring. Myelination alterations were reported even in children with normal neurological examination and do not seem to be related with methionine levels and so, in spite of normal growth, development and neurological examination, cerebral MRI was performed in all children over two years old. Before this age, and due to a high degree of immaturity in myelination, observed alterations are difficult to evaluate (ref).

The finding of a 3 year-old-girl presenting myelination alterations (Patient 6) confirms that careful must be taken when assuming that none of the R264H heterozygote individuals will develop clinical signs. One possibility is that the observed alterations result not from the elevated methionine but from AdoMet depletion, and to confirm this possibility we intent to perform AdoMet quantification. In spite of the few experiences reported, and depending on the individual AdoMet levels observed, AdoMet supplementation will be evaluated for all the patients presenting mild hyperhomocysteinaemia and especially for the case presenting brain MRI alterations.

Abnormal elevations of plasma total homocysteine are reported in the more severely affected MAT I/III deficient patients, which present the most markedly elevated levels of plasma methionine, and seem to contribute to increased long term risk for strokes (Stabler et al 2002; Linnebank et al 2005). Despite the moderately increased levels of methionine, all our cases have increased levels of total homocysteine, and we found two positive family histories for severe vascular disease episodes without other risk factors (families 1 and 6). This fact may indicate that also in cases presenting with moderately increased plasma methionine and total homocysteine levels, as are usually the cases associated with R264H mutation, the risk for vascular diseases may exist and an individual approach to each family could be recommended (Barić 2009). All the families are informed regarding the possible risks associated with R264H heterozygosity. The *MATIA* gene study is offered to all the possible heterozygotes, which are then advised to do careful regular clinical monitoring.

Since exceptionally high methionine levels were never observed in our patients, and a low methionine diet can aggravate AdoMet deficiency and contribute for neurological abnormalities (Chien et al 2005), for the pediatric cases only regular clinical monitoring and periodical control of methionine and homocysteine levels are being undertaken.

Conclusion

The neonatal screening community followed by the health care policy makers have to balance the pros and cons of integrate some diseases in newborn screening panels. However, everything that can improve quality of life of our children and contribute to the clarification of the families should be considered.

The unexpected findings of such a high frequency for MAT I/III deficiency and of an hot spot for R264H mutation in a small region from the north of the country brought us new insights into this condition in Portugal. A similar high frequency for MAT I/III deficiency due to R264H was only reported in Galicia, which is not surprising due to the close historical origins of populations from Galicia and from the north of Portugal. The long-term benefit of the screening of this condition will be evaluated thoroughly.

References

- Barić I (2009) Inherited disorders in the conversion of methionine to homocysteine. *J Inherit Metab Dis* 32: 459-471.

- Chamberlin ME, Ubagai T, Mudd SH, Wilson WG, Leonard JV, Chou JY (1996) Demyelination of the brain is associated with methionine adenosyltransferase I/III deficiency. *J Clin Invest* 98: 1021-1027.
- Chamberlin ME, Ubagai T, Mudd SH, Levy HL, Chou JY (1997) Dominant inheritance of isolated hypermethioninemia is associated with a mutation in the human methionine adenosyltransferase 1A gene. *Am J Hum Genet* 60: 540-6.
- Chamberlin ME, Ubagai T, Mudd SH, Thomas J, Pao VY, Nguyen TK, Levy HL, Greene C, Freehauf C, Chou JY (2000) Methionine Adenosyltransferase I/III Deficiency: Novel Mutations and Clinical Variations. *Am J Hum Genet* 66: 347-355.
- Chien Y, Chiang S, Huang A, Hwu L (2005) Spectrum of hypermethioninemia in neonatal screening. *Early Hum Dev* 81: 529-533.
- Chou JY (2000) Molecular genetics of hepatic methionine adenosyltransferase deficiency. *Pharmacol Ther* 85: 1-9.
- Couce ML, Bóveda MD, Castiñeiras DE, Corrales FJ, Mora MI, Fraga JM, Mudd SH (2008) Hypermethioninaemia due to methionine adenosyltransferase I/III (MAT I/III) deficiency: Diagnosis in an expanded neonatal screening programme. *J Inherit Metab Dis Short Report* #110.
- Linnebank M, Lagler F, Muntau AC, Röschinger W, Olgemöller B, Fowler B, Koch HG (2005) Methionine adenosyltransferase (MAT) I/III deficiency with concomitant hyperhomocysteinemia: two novel cases. *J Inherit Metab Dis* 28: 1167-1168.
- Mudd SH, Levy HL, Tangerman A, Boujet C, Buist N, Davidson-Mundt A, Hudgins L, Oyanagi K, Nagao M, Wilson WG (1995) Isolated persistent hypermethioninemia. *Am J Hum Genet* 57: 882-892.
- Mudd SH, Levy HL, Kraus JP (2001) Disorders of transsulfuration. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease, 8th edition*. New York: McGraw-Hill, 2007-2056.
- Mudd SH (2011) Hypermethioninemias of genetic and non-genetic origin: A review. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 157(1): 3-32.
- Pérez Mato I, Sanchez del Pino MM, Chamberlin ME, Mudd SH, Mato JM, Corrales FJ (2001) Biochemical basis for the dominant inheritance of

hypermethioninemia associated with the R264H mutation of the MAT1A gene. A monomeric methionine adenosyltransferase with tripolyphosphatase activity. *J Biol Chem* 276: 13803-9.

- Rashed MS, Ozand PT, Bucknall MP, Little D (1995) Diagnosis of inborn errors of metabolism from blood spots by acylcarnitines and amino acids profiling using automated electrospray tandem mass spectrometry. *Pediatr Res* 38: 324-31.

- Stabler SP, Steegborn C, Wahl MC, Oliveriusova J, Kraus JP, Allen RH, Wagner C, Mudd SH (2002) Elevated plasma total homocysteine in severe methionine adenosyltransferase I/III deficiency. *Metabolism* 51: 981-988.

- Vilarinho L, Rocha H, Sousa C, Fonseca H, Bogas M, Vaz Osório R (2010) Four years of expanded newborn screening in Portugal. *J Inherit Metab Dis* DOI 10.1007/s10545-010-9048-z.

Table 1 – Characterization of MAT I/III deficient patients followed in Oporto Hospital Center

Table 2- Characterization of MAT I/III deficient patients' relatives

Figure 1- Partial sequence of *Mat1A* gene exon 7

Figure 2- Hot spot for MAT I/III deficiency due to R264H mutation in a small area of Douro high lands

Table 1

Patient	Sex	Current age (y/m)	Screening sampling day	Methionine at screening (Normal< 50 µM)	Methionine at confirmation (Normal< 50 µM)	Homocysteine (Normal< 9,0 µM)	MATIA study
1	F	6y	6	85	80	13	R264H/N
2	M	4y	4	77	121	16	R264H/N
3	M	4y	4	52	168	16	R264H/N
4	F	4y	4	103	85	13	R264H/N
5	M	3y	3	58	247	18	R264H/N
6	F	3y	4	80	195	14	R264H/N
7	F	29m	4	85	245	20	R264H/N
8	M	23m	6	73	145	14	R264H/N
9	F	23m	5	124	155	15	R264H/N
10	F	23m	5	91	79	11	R264H/N
11	F	22m	5	117	182	21	R264H/N
12	F	19m	4	79	111	64	R264H/N

Table 2

Patient	Affected Relatives	Methionine (Normal<50 µM)	MATIA study
1	Mother	114	R264H/N
2			
3	Mother	32	R264H/N
4	Father	119	R264H/N
5	Mother	146	R264H/N
	Mother	111	R264H/N
	Maternal aunt	65	R264H/N
	Maternal uncle	112	R264H/N
6	Maternal grandmother	92	R264H/N
7	Mother	57	R264H/N
	Father	68	R264H/N
8	Brother	102	R264H/N
9	Mother	79	R264H/N
10	Father	65	R264H/N
11	Father	187	R264H/N
12	Mother	ND	R264H/N

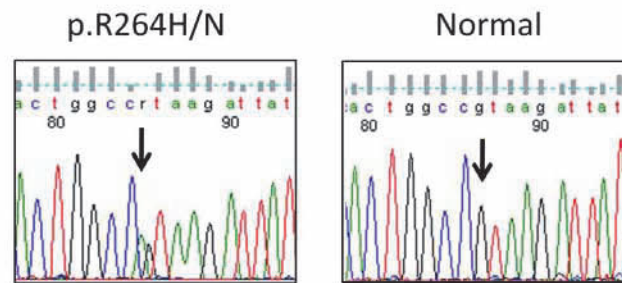


Figure 1 – Partial sequence of *Mat1A* gene exon 7. A-Sequence of a heterozygous individual for R264H mutation (G → A transition at cDNA nucleotide 791). B – Normal sequence.



Figure 2- Hot spot for MAT I/III deficiency due to R264H mutation in a small area of Douro high lands

4.3 - Interesse do estudo epidemiológico nas novas doenças rastreadas

Artigo 9 - *Incidence of maple syrup urine disease in Portugal*. Mol Genet Metab 2010 Aug;100(4):385-7.

Além de nos permitir conhecer o nosso património genético os estudos moleculares são fundamentais para permitir um diagnóstico exacto, predizer o prognóstico em muitos dos casos e adequar melhor o tratamento a cada indivíduo.

Foi efectuado um levantamento a nível nacional de todos os doentes com leucínose e calculada a incidência desta patologia na nossa população, a qual é superior à referida noutros países europeus e está relacionada com a frequência da mutação c.117delC nos indivíduos de etnia cigana. A incidência desta doença “aumentou” após o início do seu rastreio provavelmente pelo facto de muitos casos da forma de apresentação clássica terem falecido no PNN sem diagnóstico etiológico (antes do início do rastreio neonatal alargado) como nos apercebemos na colheita da história familiar.

Artigo 10 - *Molecular and structural analyses of maple syrup urine disease and identification of a founder mutation in a Portuguese Gypsy community*. Mol Genet Metab 2008 Jun;94(2):148-56.

Foi efectuado o estudo molecular e a análise estrutural das mutações missense encontradas. A possibilidade de obter informação clínica relevante sobre a gravidade fenotípica de uma doença genética humana a partir do genótipo de um paciente é o motor que impulsiona a elaboração de análises de expressão de mutações identificadas nos genes. O conhecimento de como a mutação interfere na acção da enzima alterada permite procurar terapêuticas génicas e farmacológicas, no sentido de minimizar o efeito da mutação na actividade enzimática.

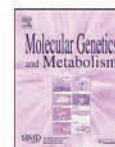
Artigo 11 - *Spectrum of MMACHC mutations in Italian and Portuguese patients with combined methylmalonic aciduria and homocystinuria, cbIC type*. Mol Genet Metab 2008 Apr;93(4):475-80.

A acidúria metilmalónica por defeito do metabolismo intracelular, forma cbl C, é frequente no nosso país e é uma das patologias incluídas no actual painel de rastreio português. Foi efectuado um estudo conjunto de doentes com esta patologia diagnosticados em Portugal e em Itália. Embora não seja possível uma correlação genótipo/fenótipo para todas as mutações encontradas, a mais frequentemente descrita c.271dupA (55% dos casos), está associada às formas de apresentação mais precoce e com pior prognóstico. Este resultado é importante no aconselhamento genético à família e no diagnóstico pré-natal, mas também na facilidade e economia que uma mutação mais frequente permite na confirmação do diagnóstico da doença.



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular Genetics and Metabolism

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymgme

Brief Communication

Incidence of maple syrup urine disease in Portugal

Sofia Quental^{a,b,*}, Laura Vilarinho^c, Esmeralda Martins^d, Elisa Leão Teles^e, Esmeralda Rodrigues^e, Luísa Diogo^f, Paula Garcia^f, Filomena Eusébio^g, Ana Gaspar^g, Sílvia Sequeira^h, António Amorim^{a,b}, Maria João Prata^{a,b}^aIPATIMUP – Institute of Pathology and Molecular Immunology of the University of Porto, Portugal^bFaculty of Sciences, University of Porto, Portugal^cGenetics Medical Center, INSA, Porto, Portugal^dChildren's Hospital Maria Pia, Porto, Portugal^eSão João Hospital, Porto, Portugal^fChildren's Hospital of Coimbra, Coimbra, Portugal^gSanta Maria Hospital, Lisboa, Portugal^hD. Estefânia Hospital, Lisboa, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 April 2010

Accepted 14 April 2010

Available online 22 April 2010

Keywords:

Maple syrup urine disease

Portugal

Incidence

ABSTRACT

Maple syrup urine disease is an autosomal recessive disorder of branched-chain amino acids metabolism with a worldwide frequency of 1/185,000 live newborns. In Portugal, the incidence of the disease has not been assessed. Based on the review of the cases diagnosed by tandem mass spectrometry an incidence of 1/86,800 live newborns was estimated in Portugal, indicating that the disease is more frequent in this country than reported in most populations.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Maple syrup urine disease (MSUD; OMIM 248600) is a disorder of the metabolism of branched-chain amino acids (BCAAs – leucine, isoleucine and valine), inherited in an autosomal recessive manner. In this disorder, the branched-chain α -ketoacid dehydrogenase complex (BCKD – EC 1.2.4.4), the enzymatic macromolecule involved in the first irreversible step of the catabolic pathway of BCAAs, is impaired leading to a progressive accumulation of both BCAAs and the respective branched-chain α -ketoacids. As all those components (but especially leucine and its α -ketoacid, α -ketoisocaproate) have a toxic effect predominantly in the central nervous system, severe clinical consequences arise that can ultimately lead to death in untreated patients. The presentation of MSUD is very diverse comprising five different clinical phenotypes: the majority of the patients (75%) have the most severe classic form, with neonatal presentation and extremely low enzymatic activity (0–2%); the remaining types, referred as mild variant forms, manifest later in life and are characterized by a higher activity of BCKD complex [1].

The outcome of MSUD patients can be improved by early diagnosis and therapeutic intervention, given that pre-symptomatic management usually prevents permanent brain damage [2,3]. Owing to that, since October 2004 MSUD was integrated in the Portuguese newborn screening program based on tandem mass spectrometry (MS/MS) [4].

MSUD has an estimated worldwide incidence of 1/185,000 live newborns based on data from routine neonatal screening of 26.8 million newborns, although in some ethnic groups, especially those where consanguineous marriages are common, higher values have been reported [1].

In Portugal, no data concerning the incidence of MSUD have ever been reported, despite a generalized suspicion among clinicians that it could be more frequent than in other populations. The aims of the present study were (a) to estimate the incidence of MSUD in Portugal (b) to establish a preliminary comparative analysis of clinical presentation and diagnosis before and after the introduction of MSUD in the newborn screening program.

Materials and methods

Patients' diagnosis

The present study includes data from 36 MSUD Portuguese patients (32 with the classic form (Table 1) and 4 with mild variant

* Corresponding author at: IPATIMUP – Institute of Pathology and Molecular Immunology of the University of Porto, Rua Dr. Roberto Frias s/n, 4200-465 Porto, Portugal. Fax: +351 22 5570799.

E-mail address: mquental@ipatimup.pt (S. Quental).

Table 1
Clinical and biochemical parameters of classic MSUD patients identified either symptomatically or by the newborn screening program.

Patient	Year of birth	Age at diagnosis confirmation (days of life)	Plasma leucine ($\mu\text{mol/L}$) at diagnosis	Current age (years)	Clinical presentation	Clinical outcome
<i>Classic MSUD symptomatic cases</i>						
P1	2001	24	288	–	Data not available	Death
P2	2000	Data not available (diagnosis established in France)		9	Data not available	Normal neurodevelopment
P3	1994	8	3289		Poor feeding, seizures, coma	Died at 7 years of age
P5	1994	Data not available (diagnosis established in France)		15	Data not available	Normal neurodevelopment
P7	1994	8	3167	15	Poor feeding, lethargy	Learning difficulties
P8	2002	14	2766	6.5	Poor feeding, coma	Data not available
P9	2004	9	1889	5	Lethargy	Normal neurodevelopment
P11		Data not available (diagnosis established in France)			Data not available	Normal neurodevelopment
P12	1994	13	3283	15	Seizures, coma	Normal neurodevelopment
P15	1989	17	1684.5	20	Hypotonia, poor feeding, seizures, coma, hypoglycemia, hepatomegaly	Normal neurodevelopment
P16	2005	30	2878.4	4	Hypotonia, poor feeding, seizures, drowsiness, hypoglycemia	Moderate neurodevelopment delay
P17	2005	30	3000	4	Hypotonia, seizures, drowsiness	Moderate neurodevelopment delay
P18	1992	11	2248	16.5	Refusal to feed, coma, apnoeas, hypotonia	Normal neurodevelopment
P19	1993	11	1803.5	15.5	Hypotonia, poor feeding, seizures, coma, hypoglycemia	Spastic diplegia
P21	2004	13	3048.8	4.5	Hypotonia, poor feeding, seizures, coma, hypoglycemia	Severe neurodevelopment delay
P22	2004	6	3542	5	Hypotonia, seizures	Slight neurodevelopment delay
P23	1977	14		32.5	Hypotonia, coma	Slight neurodevelopment delay
P24	1993	10	1689	15.5	Refusal to feed, hypotonia, coma	Normal neurodevelopment
P25	2000	18	4024.4	9.5	Hypotonia, seizures, coma	Normal neurodevelopment
P26	2002	15	1402.4	7	Hypotonia, poor feeding, seizures, coma	Slight neurodevelopment delay
P27	2000	18	3562	9	Refusal of feeding, hypotonia, hypothermia, apnoeas	Several episodes of decompensation, developmental delay, spastic tetraparesia
P28	1994	12	2234	15	Hypotonia, poor feeding, seizures, coma	Moderate neurodevelopment delay
P30	1984	26	1934.5	25	Poor feeding, coma	Severe neurodevelopment delay
P32	1990	13	4500		Data not available	Died
P33	1998	12	1512	–	Refusal to feed, apnoeas, seizures	Died at 10 days
P34	1990	13	2053	–	Refusal of feeding, coma, apnoeas	Died at 10 months
P35	1992	24	3950	–	Refusal of feeding, hypotonia, hypothermia, apnoeas	Died at 26 days
<i>Classic MSUD patients identified by MS/MS</i>						
P10	2005	20	2502	4.5	Refusal of feeding, severe respiratory infection	Ataxia
P13	2005	12	3014	4	Feeding difficulties, grunting, central hypotonia, peripheral hypertonia, fits	Normal neurodevelopment
P14	2005	7	2178	3.5	Feeding difficulties; hypotonia, lethargy	Data not available
P31	2007	8	1488	2.5	Feeding difficulties	Normal neurodevelopment
P36	2009	8	1900		Asymptomatic	

Patients' number is in accordance to that previously reported [6].
Reference values: plasma leucine <1 year (47–109 $\mu\text{mol/L}$) and ≥ 1 year (68–158 $\mu\text{mol/L}$).

forms). In symptomatic cases, diagnosis was based on elevated levels of plasma BCAAs (valine, leucine and isoleucine) along with α -alloisoleucine and abnormal urine organic acids. The same criteria were used to confirm diagnosis in suspected newborns detected by MS/MS.

The classification of the clinical phenotype into classic and variant MSUD forms was established by patients' clinicians based on clinical presentation and biochemical data.

For the majority of the patients (30) diagnosis was confirmed through molecular identification of the causal mutations; these results have been presented elsewhere [5,6].

Incidence determination

Firstly, MSUD incidence was determined considering the number of diagnosed MSUD cases and the total number of live new-

borns in the time period between the birth of the oldest and youngest patients (1977–2009). Then, we have evaluated the incidence considering only the patients detected in the MS/MS-based newborn screening program and the total number of newborns screened (October 2004–October 2009).

Data concerning the number of births per year was obtained from the Portuguese Instituto Nacional de Estatística, available at www.ine.pt.

Results and discussion

Considering the number of births that occurred in the time period between 1977 and October 2009 (4,084,525), and the 36 confirmed MSUD cases, the incidence of MSUD in Portugal can be estimated as 1/113,459 live newborns (95% confidence interval 1/172,400 to 1/84,745). As suspected from clinician's experience, this

frequency is higher than the 1/185,000 worldwide estimate. In part, this can be explained because a considerable proportion of the Portuguese patients are of Gypsy origin; as previously reported, all Portuguese Gypsy patients share the same disease causing mutation, which occurs at a frequency particularly high in the Gypsy community from the south of the country, likely due to drift effects [7].

The inclusion of MSUD in the expanded newborn screening program, which in Portugal started in late 2004, resulted in a substantial improvement in the ability to identify suspected MSUD cases, allowing therefore for a more reliable determination of the incidence of MSUD. Between 2004 and 2009, five cases of MSUD were diagnosed through MS/MS among approximately 434,000 screened newborns, leading to an estimated incidence of 1/86,800 (95% confidence interval 1/3,937,000 to 1/44,000).

This value is still higher than the above presented estimate of 1/113,459, despite the later being based in a much larger time period, ~30 years. For the discrepancy in the two estimates likely accounts the fact that in late 70s and 80s the clinical and biochemical diagnosis was more difficult and slower leading to a delayed, or even non-established, diagnosis that would result in a higher neonatal death. Significantly, relatives of some of our patients are known to have died in the neonatal period due to “sepsis” or unknown reasons. While very probably some of those individuals were undiagnosed MSUD patients, a confirmed diagnosis of MSUD could not be established being understandable that data from the last ~30 years produced a subestimation of the MSUD incidence in the country.

Taking these aspects into consideration, 1/86,800 live newborns, derived from the newborn screening data, seems to be the best estimate of the true incidence of MSUD in Portugal.

A higher frequency than the worldwide reference has also been reported for Spain, where the incidence of MSUD was estimated to be around 1/12,000 to 1/50,000 ([8] as cited in [9]), as well as for a few countries such as Turkey [10,11], Philippines [12] and Malaysia [13,14].

The improvement in therapeutic efficacy and clinical outcome of the patients detected in the initial days of life, sometimes even before the first symptoms manifest, have already been discussed in the literature [15]. For a disorder like MSUD, in which early detection and intervention usually prevents permanent intellectual impairment, the benefits of newborn screening programs will probably be reflected in a better prognosis for many patients [2,16]. Yet, along with early diagnosis, maintaining a strict life-long metabolic control is also a major determinant of patient's outcome [17].

As already referred, in Portugal the expanded newborn screening program started in October 2004 and since then five MSUD patients were identified, one of them of Gypsy origin. All these patients have the classic form of the disease. A question raised from the experience in other countries is whether mild variant MSUD cases can escape detection by MS/MS [1,18,19]. However, since the age of onset in patients with variant MSUD forms is usually between five months to first years of life, only in the next few years will be possible to draw any conclusion concerning this issue in Portugal. Nevertheless, up to now no false negative MSUD patients in the newborn screening were described.

Another important issue to address more deeply in the future concerns the outcome of patients identified through the expanded newborn screening program comparatively to the outcome of those who were identified through clinical manifestation. In Table 1 are presented a few clinical and biochemical parameters of classic MSUD cases, some of them detected by MS/MS. Although the small number of Portuguese patients so far identified through MS/MS renders difficult to perform reliable comparisons, a relevant finding is that on average the confirmed diagnosis is available 4 days

earlier in patients who were detected by MS/MS (11 days comparing to 15 days in symptomatic cases). Given that the levels of BCAAs increase in each day, representing a serious brain injury threat, and that patients diagnosed after day 14 of life usually do not develop normal intellectual capacities, the medical relevance of this achievement is considerable [1,16].

Acknowledgments

This work was partially supported by the Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT) through a PhD grant to S.Q. (SFRH/BD/22685/2005). IPATIMUP is an Associate Laboratory of the Portuguese Ministry of Science, Technology and Higher Education and is partially supported by FCT.

References

- [1] D. Chuang, V. Shih, Maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria), in: C.R. Scriver (Ed.), *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, McGraw-Hill, New York, 2001, pp. 1971–2006.
- [2] K. Heldt, B. Schwahn, I. Marquardt, M. Grotzke, U. Wendel, Diagnosis of MSUD by newborn screening allows early intervention without extraneous detoxification, *Mol. Genet. Metab.* 84 (2005) 313–316.
- [3] D.H. Morton, K.A. Strauss, D.L. Robinson, E.G. Puffenberger, R.L. Kelley, Diagnosis and treatment of maple syrup disease: a study of 36 patients, *Pediatrics* 109 (2002) 999–1008.
- [4] L. Vilarinho, H. Rocha, A. Marcão, C. Sousa, H. Fonseca, M. Bogas, R. Vaz Osório, Diagnóstico precoce: resultados preliminares do rastreio metabólico alargado, *Acta Pediatr. Port.* 37 (2006) 186–191.
- [5] S. Quental, E. Martins, L. Vilarinho, A. Amorim, M. João Prata, Maple syrup urine disease due to a new large deletion at BCKDHA caused by non-homologous recombination, *J. Inher. Metab. Dis.* (2008) (online report #139).
- [6] S. Quental, S. Macedo-Ribeiro, R. Matos, L. Vilarinho, E. Martins, E.L. Teles, E. Rodrigues, L. Diogo, P. Garcia, F. Eusebio, A. Gaspar, S. Sequeira, F. Furtado, I. Lanca, A. Amorim, M.J. Prata, Molecular and structural analyses of maple syrup urine disease and identification of a founder mutation in a Portuguese Gypsy community, *Mol. Genet. Metab.* 94 (2008) 148–156.
- [7] S. Quental, A. Gusmão, P. Rodriguez-Pombo, M. Ugarte, L. Vilarinho, A. Amorim, M.J. Prata, Revisiting MSUD in Portuguese Gypsies: evidence for a founder mutation and for a mutational hotspot within the BCKDHA gene, *Ann. Hum. Genet.* 73 (2009) 298–303.
- [8] J.M. Fraga, J.R. Alonso-Fernandez, Neonatal screening programmes in Spain: 1982–1986, in: B.L. Threlle (Ed.), *Advances in Neonatal Screening*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1987, pp. 487–488.
- [9] J.L. Chuang, J.R. Davie, J.M. Chinsky, R.M. Wynn, R.P. Cox, D.T. Chuang, Molecular and biochemical basis of intermediate maple syrup urine disease. Occurrence of homozygous G245R and F364C mutations at the E1 alpha locus of Hispanic-Mexican patients, *J. Clin. Invest.* 95 (1995) 954–963.
- [10] K. Gorzelany, A. Dursun, T. Coşkun, S.H. Kalkanoglu-Sivri, G.F. Gökçay, M. Demirkol, O. Feyen, U. Wendel, Molecular genetics of maple syrup urine disease in the Turkish population, *Turk J. Pediatr.* 51 (2009) 97.
- [11] A. Dursun, M. Henneke, K. Özgül, J. Gartner, T. Coşkun, A. Tokatli, H.S. Kalkanoglu, M. Demirkol, U. Wendel, I. Ozalp, Maple syrup urine disease: mutation analysis in Turkish patients, *J. Inher. Metab. Dis.* 25 (2002) 89.
- [12] J.Y. Lee, M.A. Chieng, S.C. Estrada, E.M. Cutiungco-De la Paz, C.I. Silao, C.I. Padilla, Maple syrup urine disease (MSUD) – clinical profile of 47 Filipino patients, *J. Inher. Metab. Dis.* (2008) (online report #135).
- [13] I. Zakiah, Y.N. Ashikin, S.M. Aisiah, H.I. Ismail, Inborn errors of metabolic diseases in Malaysia: a preliminary report of maple syrup urine diseases for 1993, *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 26 (Suppl. 1) (1995) 134.
- [14] M.K. Thong, Z.M. Yunus, Spectrum of inherited metabolic disorders in Malaysia, *Ann. Acad. Med. Singapore* 37 (Suppl. 12) (2008) 66.
- [15] P. Kaplan, A. Mazur, M. Field, J.A. Berlin, G.T. Berry, R. Heidenreich, M. Yudkoff, S. Segal, Intellectual outcome in children with maple syrup urine disease, *J. Pediatr.* 119 (1991) 46–50.
- [16] E. Simon, R. Fingerhut, J. Baumkötter, V. Konstantopoulou, R. Ratschmann, U. Wendel, Maple syrup urine disease: favourable effect of early diagnosis by newborn screening on the neonatal course of the disease, *J. Inher. Metab. Dis.* 29 (2006) 532–537.
- [17] B. Hoffmann, C. Helbling, P. Schadewaldt, U. Wendel, Impact of longitudinal plasma leucine levels on the intellectual outcome in patients with classic MSUD, *Pediatr. Res.* 59 (2006) 17–20.
- [18] K. Bhattacharya, V. Khalili, V. Wiley, K. Carpenter, B. Wilcken, Newborn screening may fail to identify intermediate forms of maple syrup urine disease, *J. Inher. Metab. Dis.* 29 (2006) 586.
- [19] R.L. Puckett, F. Lorey, P. Rinaldo, M.H. Lipson, D. Matern, M.E. Sowa, S. Levine, R. Chang, R.Y. Wang, J.E. Abdenur, Maple syrup urine disease: further evidence that newborn screening may fail to identify variant forms, *Mol. Genet. Metab.* 100 (2009) 136–142.

Available online at www.sciencedirect.com

Molecular Genetics and Metabolism 94 (2008) 148–156

Molecular Genetics
and Metabolismwww.elsevier.com/locate/ymgme

Molecular and structural analyses of maple syrup urine disease and identification of a founder mutation in a Portuguese Gypsy community

Sofia Quental^{a,b,*}, Sandra Macedo-Ribeiro^c, Raquel Matos^a, Laura Vilarinho^d, Esmeralda Martins^e, Elisa Leão Teles^f, Esmeralda Rodrigues^f, Luísa Diogo^g, Paula Garcia^g, Filomena Eusébio^h, Ana Gaspar^h, Sílvia Sequeiraⁱ, Fátima Furtado^j, Isabel Lança^j, António Amorim^{a,b}, Maria João Prata^{a,b}

^a IPATIMUP—Institute of Pathology and Molecular Immunology of University of Porto, Rua Dr. Roberto Frias, s/n, 4200-465 Porto, Portugal^b Faculty of Sciences of University of Porto, Portugal^c IBMC—Institute for Molecular and Cell Biology, Porto, Portugal^d IGMJM—Institute of Medical Genetics Jacinto de Magalhães, Porto, Portugal^e Children's Hospital Maria Pia, Porto, Portugal^f São João Hospital, Porto, Portugal^g Children's Hospital of Coimbra, Coimbra, Portugal^h Santa Maria Hospital, Lisboa, Portugalⁱ D. Estefânia Hospital, Lisboa, Portugal^j José Joaquim Fernandes Hospital, Beja, Portugal

Received 14 February 2008; accepted 14 February 2008

Available online 2 April 2008

Abstract

Maple syrup urine disease (MSUD) is an autosomal recessive disorder, caused by the defective function of the branched-chain α -ketoacid dehydrogenase complex (BCKD). BCKD is a mitochondrial complex, encoded by four nuclear genes (*BCKDHA*, *BCKDHB*, *DBT* and *DLD*), involved in the metabolism of branched-chain amino acids (BCAAs). Since the MSUD mutational spectrum has not been previously assessed in Portugal, in this study we present the molecular characterization of 30 MSUD Portuguese patients. Seventeen putative mutations have been identified (six in *BCKDHA*, five in *BCKDHB* and six in *DBT*); seven of them are here described for the first time. The most common mutation identified was a C deletion in *BCKDHA* gene (c.117delC; p.R40GfsX23), already reported in the Spanish population. Interestingly, it was found in all patients of a Gypsy community from South of the country, so a founder effect is probably responsible for the high incidence of the disease in this community. Structural models of MSUD missense mutations have been performed to understand their pathogenic effect, in order to elucidate and often to predict the severity of a mutation clinical consequence.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Maple syrup urine disease; Branched-chain α -ketoacid dehydrogenase complex; *BCKDHA*; *BCKDHB*; *DBT*; Mutation analysis

Maple syrup urine disease (MSUD) is a rare (1:185.000) inherited autosomic recessive disorder of metabolism,

caused by the defective function of branched-chain α -ketoacid dehydrogenase (BCKD—E.C. 1.2.4.4) complex [1].

BCKD catalyzes the oxidative decarboxylation of branched-chain α -ketoacids (BCKAs) derived from the transamination of branched-chain amino acids (BCAAs) leucine, isoleucine and valine. These are three essential amino acids that cannot be synthesized by animals, and

* Corresponding author. Address: IPATIMUP—Institute of Pathology and Molecular Immunology of University of Porto, Rua Dr. Roberto Frias, s/n, 4200-465 Porto, Portugal. Fax: +351 22 5570799.
E-mail address: mquental@ipatimup.pt (S. Quental).

so they must be taken in food, representing about 20% of the human dietary protein.

The mammalian BCKD is a mitochondrial multienzyme complex organized around a cubic core of 24 lipoate-bearing dihydrolipoyl transacylase (E2) subunits, to which multiple copies of branched-chain α -ketoacid decarboxylase (E1) and dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) subunits are attached. Two regulatory enzymes (a specific kinase and a specific phosphatase) also constitute the complex [2,3]. E1 is a thiamine-dependent enzyme and consists of two α (E1 α) and two β subunits (E1 β), forming a heterotetrameric structure. The E3 component, unlike the others, is also shared by pyruvate and α -ketoglutarate dehydrogenase complexes.

When BCKD activity is impaired both BCAAs and BCKAs accumulate in body fluids reaching toxic levels, which lead to severe clinical consequences. The neuronal tissue seems to be the most sensitive to this metabolic decompensation, with the main consequences being seizures, coma, brain edema and mental retardation [1,4].

The variation in clinical presentation of MSUD led to the classification into different clinical phenotypes: the classic form, with the most severe consequences, manifests within the first 2 weeks of life by poor feeding, seizures and coma, representing about 80% of patients; the remaining 20% have milder variant forms, with later onset and BCKD activity ranging from 2% to 40%. This last group includes the rare thiamine responsive form, in which pharmacological doses of thiamine lead to normalization of the BCAA levels [1].

Many MSUD causing mutations have already been described in the catalytic subunits of BCKD complex and, based on the altered loci, genetic subtypes have been proposed: type Ia (MIM# 608348) for mutations found in *BCKDHA* (E1 α subunit); type Ib (MIM# 248611) for mutations found in *BCKDHB* (E1 β subunit) and type II (MIM# 248610) for mutations in *DBT* (E2 subunit) [1].

In this study, we have undertaken a comprehensive molecular characterization of *BCKDHA*, *BCKDHB* and *DBT* in 30 previously unstudied MSUD Portuguese patients, which led to detect 10 previously described and 7 novel mutations. The obtained results further revealed that a founder mutation—c.117delC at *BCKDHA*—underlies the high incidence of MSUD within a Gypsy community from South Portugal, rendering now possible to implement DNA-testing programs aimed at providing epidemiological surveillance in that specific population.

In addition, given the recently determined crystal structures of E1 and E2, we have located the MSUD missense mutations and when addressing the correlation between structural impact and clinical phenotype we demonstrate that structural investigation is a valuable tool to elucidate and often to predict the severity of a mutation clinical consequence.

Materials and methods

Subjects

The present study includes samples from 30 MSUD Portuguese patients. Two of them are sisters and 11 belong to a Portuguese Gypsy community.

In the majority of the cases, diagnosis was based on elevated levels of plasma branched-chain amino acids (valine, leucine and isoleucine) along with L-alloisoleucine and abnormal urine organic acids. Three cases have already been detected by tandem mass spectrometry (MS/MS), since MSUD has recently been included in expanded newborn screening program in Portugal. In these patients diagnosis was further confirmed by blood and urine analysis.

The classification into classic and variant MSUD forms was established by patients clinicians based mainly on mode of clinical presentation and biochemical data.

Peripheral blood samples from patients were obtained by venipuncture in EDTA tubes, under medical supervision. Informed consent was obtained and the ethics boards of the involved institutions approved the research protocol.

Samples from parents were available for 11 patients and, in these cases, inheritance was tested.

Mutation analysis

DNA and RNA were extracted from blood samples using commercially available kits (Generation DNA Purification kit; Gentra Systems, Minneapolis, Minnesota, USA and High Pure RNA isolation Kit, Roche Applied Science, Mannheim, Germany, respectively). cDNA was synthesized with the First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas Life Sciences).

The exonic coding region of *BCKDHA* (9 exons), *BCKDHB* (11 exons) and *DBT* (11 exons) was amplified from genomic DNA using standard protocols (1 μ L of DNA for a final reaction volume of 12.5 μ L). Direct sequencing, with forward and reverse primers, was then performed using a Big Dye terminator Cycle Sequencing kit, followed by analysis on an ABI PRISM 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystems). The presence of each mutation was always confirmed in two independent amplification and sequencing reactions. DNA samples from at least 50 individuals (100 chromosomes) were tested in order to confirm the absence of new mutations identified.

Analyzed sequences were compared with cDNA sequences with Accession Nos.: *BCKDHA* NM_000709.2 (contig NT_011109); *BCKDHB* NM_000056.2 (contig NT_007299) and *DBT* NM_001918 (contig NT_032977). Mutations nomenclature follows the recommendations of Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>), with nucleotide +1 corresponding to the A of the ATG translation initiation codon. Primers sequences and detailed PCR conditions are available under request.

Other analysis

Multiple sequence alignments to verify the degree of conservation were performed using Clustal W [5].

PolyPhen program was used to predict the significance of missense alterations in protein function (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) [6].

Generation of protein plots was performed using PyMOL (<http://www.pymol.org/>) [7] and PDB entry codes used were 1X7Y [8] and 2II3 [9].

Prediction of splicing patterns was performed with the software GENSCAN (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) [10].

Results and discussion

In the present study, we have analyzed the entire coding region of *BCKDHA*, *BCKDHB* and *DBT* genes in 30 MSUD Portuguese patients. In 28 of them, molecular

characterization was successfully completed and in the remaining two patients (P20 and P29) only one mutation could be detected (Table 1). Until now, we achieved to characterize 96.7% of the disease alleles, which is a value in the range of those previously reported in other patient series [11–13].

It was possible to extend the DNA molecular characterization to the parents of 11 patients (Table 1) and in all the cases they were found to be carriers of the mutations detected in sons.

Seventeen different molecular variations were identified and found to be scattered in a near equal number across the three genes studied. Eight out of the detected mutations had been previously referred to in the literature (p.R40GfsX23; p.A220V and p.D302A in E1 α , p.P200X; p.I214K; p.Q267X and p.R285X in E1 β and p.K313N in E2, see Table 2), seven are here described for the first time (p.H37VfsX3; p.D152N and p.Y413H in E1 α , and p.Y122LfsX2; p.D390G; p.L398P and p.P411Q in E2) and two (p.P356L in E1 β and c.1209+5G>C in E2) were found to be recorded in the MSUD mutation database from The Clinic for Special Children (table with the comprehensive mutation identification in the clinic available at <http://www.clinicforspecialchildren.org/resmutidmsud.html>). However, since no published data exist addressing the pathogenic effect of the last two mutations, we dealt with them in same way we did with the newly identified MSUD mutations.

To ascertain the pathogenicity of these variant alleles, firstly we discarded the presence of each of them in at least 50 Portuguese healthy individuals (100 control alleles). Next, to assess the effect of the missense mutations on protein function, we have investigated (i) the evolutionary conservation of amino acid residues across orthologous genes and (ii) the conservativeness of amino acid replacements within each gene, using Clustal W and PolyPhen programs (see Table 2). In addition, as Åvarsson et al. [14] had already described the crystallographic structure of the human E1 tetramer of the BCKD complex as a four-lobed entity in which each lobe roughly correspond to one of the four subunits α , α' , β and β' (Fig. 1), it was possible to analyse after visualization with PyMOL how some MSUD mutations might affect the E1 assembly and function. An identical approach was applied for E2 mutations but using as template the very recently described bovine crystal structure [9] due to the unavailability of the human homologous for the E2 inner core domain, where all identified *DBT* missense mutations were located.

Apart from the pathogenic mutations, the comprehensive examination of *BCKDHA*, *BCKDHB* and *DBT* led to the detection of several polymorphic variations, from which two, both located in introns of *DBT*, were not yet reported: c.1210-10T>A, was present in 1 homozygous plus 1 heterozygous patient and in 2 out of 82 control chromosomes, whereas c.1281+31T>G, was identified in heterozygosity in 3 patients and in 4 out of 82 control alleles.

Mutations within *BCKDHA* (encoding E1 α subunit)

In the *BCKDHA* gene, two novel missense mutations were identified, leading to the amino acid changes p.D152N and p.Y413H that are very likely MSUD-causative mutations. Both amino acid substitutions occur at positions evolutionarily highly conserved and, accordingly, both were predicted to be functionally damaging (Table 2). At position 413, another alteration—p.Y413C—had been previously reported [15] and its pathogenic effect was already discussed on the basis of the effect on E1 structure [14]. Given that Y413 is located in the small C-terminal domain of the α subunit (Fig. 1), any aromatic to non-aromatic mutation of the residue will have a negative effect on the structural integrity of the protein by disrupting the process of tetramer assembly [14]. Indeed, tyrosine 413 of the α chain establishes hydrogen bonds with the main-chain atoms of glycine 209 and isoleucine 210, both in the β chain (Fig. 2a), and that can probably explain why the presence of p.Y413C was shown to result in a markedly reduced assembly rate of the normal β subunit with the mutant α subunit [16]. Therefore, a similar consequence can be presumed for the newly detected histidine at position 413. Despite the predicted substantial damage in the interaction between α and β subunits caused by the two known alterations at 413—p.Y413C and p.Y413H—none of them is expected to prevent completely the assembly of the tetramer. The clinical phenotypes associated to the two amino acid changes confirm this prediction, since either p.Y413C or p.Y413H were identified in patients with moderate forms of the disease ([15] and Table 1).

Another newly detected mutation within E1 α was p.D152N, involving residues (aspartate \rightarrow asparagine) structurally very similar although aspartate is negatively charged while asparagine is uncharged. As the location of aspartic acid 152- α is close to the surface of the E1 heterotetramer and distant from the assembly interfaces, its alteration by an asparagine does not seem to affect subunit interaction, that is dimer or tetramer assembly. However, aspartic acid 152- α establishes a strong salt bridge with the side chain arginine 314 of helix 11, which is a secondary structure element in the α subunit that seems to be important for protein structure (Fig. 2b). The uncharged asparagine is unable to form such a specific interaction and consequently we can assume that it will cause some degree of impairment on the structural integrity of helix 11. An alteration in helix 11—p.T310R (described as p.T265R by Wynn, et al. [16]) was formerly reported as able to prevent optimal packing in the hydrophobic core, thereby reinforcing the importance of helix 11 integrity for the overall stability and function of the protein [14,16]. Despite the impairment caused by p.D152N in this helix, its expected effect on protein structure and stability is not dramatic, which is in fairly agreement with the clinical data since patient 4, homozygous for p.D152N, presents a milder variant form of MSUD having been diagnosed only at 3 years of age.

Table 1
Genetic data of MSUD Portuguese patients

Patient	Genetic subtype	Genotype	Deduced effect	Clinical phenotype	Age of diagnosis	Plasma leucine ($\mu\text{mol/L}$) at diagnosis	Current age (years)	Clinical outcome
P1	II	c.[939G>C]+[939G>C]	p.[K313N]+[K313N]	Classic	24 days	288		Died
P2 ^a	II	c.[363_364delCT]+[363_364delCT]	p.[Y122L6X2]+[Y122L6X2]	Classic	PND			Data not available
P3	Ib	c.[595_596delAG]+[641T>A]	p.[P200X]+[I214K]	Classic	8 days	3289	7	Died at 7 years
P4	Ia	c.[454G>A]+[454G>A]	p.[D152N]+[D152N]	Variant	3 years	314	17	School difficulties after adolescence
P5	Ib	c.[641T>A]+[641T>A]	p.[I214K]+[I214K]	Classic				Data not available
P6	Ia	c.[659C>T]+[1237T>C]	p.[A220V]+[Y413H]	Variant	2 years	495	9	Learning difficulties
P7	Ib	c.[799C>T]+[799C>T]	p.[Q267X]+[Q267X]	Classic	8 days	3167	13	Learning difficulties
P8	Ib	c.[799C>T]+[853C>T]	p.[Q267X]+[R285X]	Classic	14 days	2766	5	Data not available
P9	Ia	r.[109_484del]+[109_484del] ^f	p.[H37V6X3]+[H37V6X3]	Classic	9 days	1889	3	Normal neurodevelopment
P10	II	c.[1193T>C]+[1193T>C]	p.[L398P]+[L398P]	Classic	MS/MS	2502 ^g	2	Data not available
P11 ^h	II	c.[363_364delCT]+[363_364delCT]	p.[Y122L6X2]+[Y122L6X2]	Classic				Data not available
P12	Ib	c.[595_596delAG]+[1067C>T]	p.[P200X]+[P356L]	Classic	13 days	3283	13	Data not available
P13 ^h	Ia	c.[117delC]+[117delC]	p.[R40G6X23]+[R40G6X23]	Classic	MS/MS	3014 ^g	2	Slight delay
P14	Ia	c.[905A>C]+[905A>C]	p.[D302A]+[D302A]	Classic	MS/MS		2	Data not available
P15	II	c.[363_364delCT]+[363_364delCT]	p.[Y122L6X2]+[Y122L6X2]	Classic	17 days	1684.5	18	Normal neurodevelopment
P16 ^{h,e}	Ia	c.[117delC]+[117delC]	p.[R40G6X23]+[R40G6X23]	Classic	30 days	2878.4	2	Moderate neurodevelopment delay
P17 ^{h,e}	Ia	c.[117delC]+[117delC]	p.[R40G6X23]+[R40G6X23]	Classic	30 days	3000	2	Moderate neurodevelopment delay
P18	II	c.[1169A>G]+[1169A>G]	p.[D390G]+[D390G]	Classic	11 days	2248	15	Normal neurodevelopment
P19 ^h	Ia	c.[117delC]+[117delC]	p.[R40G6X23]+[R40G6X23]	Classic	11 days	1803.5	14	Spastic diplegia
P20	II	c.[1209+5G>C]+[?](c.375+4C>T- <i>BCKDHA</i>) ^h	p.[A340_S403del]+[?]	Thiamine responsive	20 months		10	Normal neurodevelopment
P21 ^h	Ia	c.[117delC]+[117delC]	p.[R40G6X23]+[R40G6X23]	Classic	13 days	3048.8	3	Severe neurodevelopment delay
P22 ^{h,e}	Ia	c.[117delC]+[117delC]	p.[R40G6X23]+[R40G6X23]	Classic	6 days	3542	3	Slight neurodevelopment delay
P23	Ib	c.[799C>T]+[799C>T]	p.[Q267X]+[Q267X]	Classic	14 days		30	Slight neurodevelopment delay
P24	II	c.[363_364delCT]+[1209+5G>C]	p.[Y122L6X2]+[A340_S403del]	Classic	10 days	1689	14	Normal neurodevelopment
P25 ^{h,e}	Ia	c.[117delC]+[117delC]	p.[R40G6X23]+[R40G6X23]	Classic	18 days	4024.4	7	Normal neurodevelopment
P26 ^{h,e}	Ia	c.[117delC]+[117delC]	p.[R40G6X23]+[R40G6X23]	Classic	15 days	1402.4	5	Slight neurodevelopment delay
P27 ^{h,e}	Ia	c.[117delC]+[117delC]	p.[R40G6X23]+[R40G6X23]	Classic	18 days	3562	7	Several episodes of decompensation, developmental delay, spastic tetraparesis
P28 ^h	Ia	c.[117delC]+[117delC]	p.[R40G6X23]+[R40G6X23]	Classic	30 days		13	Moderate neurodevelopment delay
P29	II	c.[1232C>A]+[?]	p.[P411Q]+[?]	Thiamine responsive	40 days	1661.6	21	Normal neurodevelopment
P30 ^h	Ia	c.[117delC]+[117delC]	p.[R40G6X23]+[R40G6X23]	Classic	26 days	1934.5	23	Severe neurodevelopment delay

Analyzed sequences were compared with cDNA sequences with Accession No.: *BCKDHA*-NM_000709.2 (contig NT_011109); *BCKDHB*-NM_000056.2 (contig NT_007299) and *DBT*-NM_001918 (contig NT_032977).

Reference values: Plasma leucine <1 year (47–109 $\mu\text{mol/L}$) and ≥ 1 year (68–158 $\mu\text{mol/L}$).

PND = prenatal diagnosis.

Samples from parents were available for P1; P8; P15; P16 and P17; P21; P22; P25; P26; P27 and P29.

^a Sisters.

^b Twins.

^c Second cousins.

^d First cousins.

^e The breakpoints of the deletion have not yet been identified at the genomic level. At cDNA level, the effect is the skipping of exons 2, 3 and 4.

^f Values referring to the confirmation by blood analysis.

^g Gypsy patients.

^h In P20 we have also identified the intronic substitution c.375+4C>T in *BCKDHA*. However, as GENSCAN predicts that this alteration does not affect splicing it was presumed not to be a disease causing mutation.

Table 2
Variations identified in *BCKDHA*, *BCKDHB* and *DBT*

Exon (Intron)	Nucleotide change	Protein prediction	Frequency	PolyPhen prediction ^b	Conservation	Reference
<i>Type Ia (BCKDHA)</i>						
2	c.117delC	p.R40GfsX23	22/30			[12] (as p.R40fs62X)
4	c.454G>A	p.D152N	2/30	Probably damaging	Always D	This study
	r.109_484del	p.H37VfsX3	2/30			This study
6	c.659C>T	p.A220V	1/30	Predicted to be benign	Always A	[12]
7	c.905A>C	p.D302A	2/30	Probably damaging	Always D	[12]
9	c.1237T>C	p.Y413H	1/30	Probably damaging	Always Y	This study
<i>Type Ib (BCKDHB)</i>						
5	c.595_596delAG	p.P200X	2/12			[11]
6	c.641T>A	p.I214K	3/12	Probably damaging	I or V	[12]
7	c.799C>T	p.Q267X	5/12			[4]
8	c.853C>T	p.R285X	1/12			[11]
10	c.1067C>T	p.P356L	1/12	Probably damaging	Always P	Clinic for special children
<i>Type II (DBT)</i>						
4	c.363_364delCT	p.Y122LfsX2	7/18			This study
7	c.939G>C	p.K313N	2/18	Probably damaging	Always K	[1] (as K252N)
9	c.1169A>G	p.D390G	2/18	Probably damaging	Always D	This study
9	c.1193T>C	p.L398P	2/18	Probably damaging	Always L	This study
9 (9)	c.1209+5G>C	p.A340_S403del ^a	2/18			Clinic for special children
10	c.1232C>A	p.P411Q	1/18	Probably damaging	Always P	This study

^a Protein prediction of the effect of the splice mutation c.1209+5G>C was experimentally observed through cDNA analysis in this study.

^b PolyPhen predicts that a non-synonymous substitution is: probably damaging; possibly damaging; benign and unknown.

Protein sequences were extracted from Ensemble Genome Browser. The species analyzed were: *BCKDHA* *Danio rerio* (ENSDARP00000059346); *Homo sapiens* (OTTHUMP00000076145); *Mus musculus* (ENSMUSP00000071292); *Rattus norvegicus* (ENSRNOP00000027995); *Bos taurus* (ENSBTAP00000041458); *Pan troglodytes* (ENSPTRP00000046772) *BCKDHB* *Danio rerio* (ENSDARP00000076508); *Homo sapiens* (OTTHUMP00000018048); *Mus musculus* (ENSMUSP00000034801); *Rattus norvegicus* (ENSRNOP00000013249); *Bos taurus* (ENSBTAP00000016044); *Pan troglodytes* (ENSPTRP00000031400); *DBT* *Homo sapiens* (OTTHUMP00000012596); *Mus musculus* (ENSMUSP00000000349); *Rattus norvegicus* (ENSRNOP00000020267); *Bos taurus* (ENSBTAP00000008292); *Pan troglodytes* (ENSPTRP00000001722).

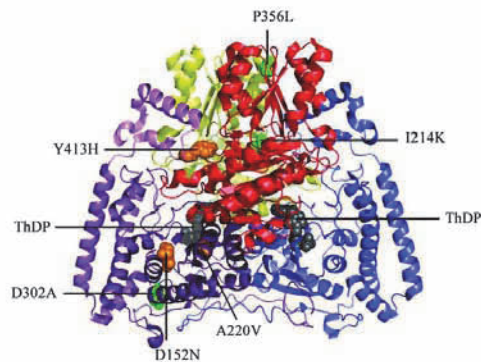


Fig. 1. Representation of E1 heterotetramer: E1 α (purple, with the small C-terminal domain in a light purple); E1 β (red); E1 α' (blue) and E1 β' (yellow). Missense mutations identified in E1 α and in E1 β are indicated (in one of the two subunits): mutations that are predicted to cause a milder phenotype are represented by orange spheres while the alterations that presumably lead to a severe phenotype are displayed as green spheres. ThDP-Thiamine diphosphate.

A new deletion, identified in patient 9, has also been detected in *BCKDHA* gene. In this patient, the systematic failure to amplify the genomic DNA region encompassing exons 2, 3 and 4 while amplicons were successfully

obtained for the remaining tested regions (which lacked any potentially pathogenic variation), led us to suspect that the molecular defect causing the MSUD phenotype was a large deletion in *BCKDHA*. cDNA analysis confirmed the skipping of those three exons (p.H37VfsX3). However, the investigation of the corresponding breakpoints is still currently ongoing.

Three additional alterations within *BCKDHA* (p.A220V, p.D302A and p.R40GfsX23) had already been found in other MSUD patients, namely from Spain [12].

The detrimental effect of both p.A220V and p.D302A can very probably be attributed to the alteration they induce in subunit association. In fact, A220 is located in an α helix close to the E1 β interface whereas D302 is important for the α - α' subunit interactions [12,14]. It appears that the structural impact of p.D302A must be more severe because, in addition, residue 302 establishes hydrogen bonds with F304 and A305, which are again residues of helix 11. The strictly conserved aspartate at position 302 stabilizes the helix by a compensation of the partial positive charge of the N-terminal macrodipole of helix 11 when interacting with main-chain of phenylalanine 304 and such stabilization cannot be achieved with the substituted amino acid. The clinical data here presented together with the reported in Rodríguez-Pombo et al. [12], confirm that the effect of p.A220V is less harmful than that caused by p.D302A. In our series, a patient homozy-

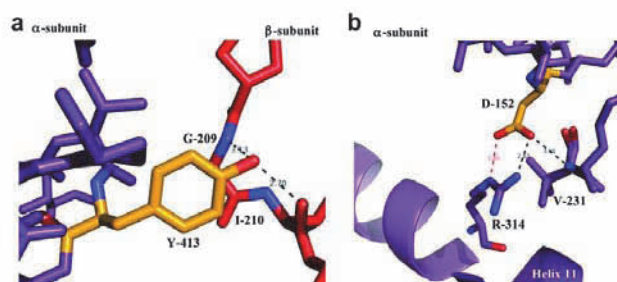


Fig. 2. Structural bases of new missense mutations identified in E1 α (Y413H and D152N). Carbon atoms are in orange; oxygen atoms are in red and nitrogen atoms are in blue. The α subunit is represented in purple and the β subunit is in red. Hydrogen bonds and salt bridges are indicated by black and red dotted lines, respectively. Entry for Protein Data Bank used was 1X7Y. For more detailed description see "Results and discussion". (a) Y413H; (b) D152N.

gous for the mutation leading to p.D302A presents the severe form of MSUD, while in the Spanish series a patient heterozygous for the mutations leading to p.A220V and p.D302A manifests a mild clinical phenotype. Furthermore, two additional patients heterozygous for A220V (one Portuguese and one Spanish) have variant forms of the disease. Taken together, these findings strongly suggest that p.A220V affects less dramatically the structure and function of the E1 complex than p.D302A, although a more accurate evaluation of the p.A220V impact on the clinical phenotype would come from a homozygous individual for p.A220V which, up to now, has not yet been observed.

The third previously reported variant in *BCKDHA* was a frameshift mutation at position 117 (C deletion) that causes an alteration in the reading frame giving rise to a premature stop codon resulting in a truncated protein with just 61 amino acids. Since the stop codon appears very prematurely, the corresponding mRNAs must be degraded by nonsense-mediated mRNA decay, and thus no protein will be produced [17]. This mutation was the most frequent in our sample, having been detected homozygously in 11 affected children. All these MSUD patients belong to a Portuguese Gypsy community living in the South of the country and close consanguineous relationships are known to exist between many of these MSUD patients. The high frequency of c.117delC homozygosity among this community is a sign of the deeply enrooted endogamy that characterizes the Gypsy people [18]. As which concerns MSUD, this is not the only situation of this kind reported up to now. For instance, within certain Pennsylvania Mennonite communities, the MSUD incidence can be as high as 1/176 live births due to the founder mutation p.Y438N- α [19,20], and that can be explained by the small effective size of the Mennonite groups and limited gene flow with surrounding populations.

Within the Portuguese Gypsies here analyzed the MSUD founder mutation is c.117delC, a variant that was firstly observed in a heterozygous Spanish patient not

referred to as being Gypsy [12]. Therefore, only haplotypic analysis at tightly linked markers with *BCKDHA* (which will be soon initiated) can make possible to clarify whereas all Gypsy and non-Gypsy chromosomes carrying this mutation shared or not a common origin.

Mutations within *BCKDHB* (encoding E1 β subunit)

In *BCKDHB*, five different mutations were identified randomly spread across different exons, but none of them was here observed for the first time (Table 1). Three of them are nonsense substitutions—p.P200X, p.Q267X and p.R285X—considered to be the primary cause of the disease because all generate premature termination codons. In these three cases, similarly to what is expected to occur for the previously described c.117delC, we can likely admit that translation must be highly attenuated by nonsense-mediated mRNA decay [17].

One of these three substitutions—p.Q267X, firstly reported in a North American patient of uncertain Western European ancestry [4], appears to be rather prevalent in the Iberian Peninsula: it occurred in 3 out of the 30 *BCKDHB* mutated chromosomes in the study of Rodríguez-Pombo et al. (enrolling 33 Spanish patients) [12], and it is also one of the most frequent alterations among the Portuguese patients here studied (5 of the 12 *BCKDHB* mutated chromosomes). This distribution suggests that Iberia might have been the place where the mutation firstly arose, but again haplotypic analysis is needed to explore this issue.

The other two variations in *BCKDHB* are missense mutations (p.I214K and p.P356L), both implying amino acids replacements whose previous indications to be damaging to the protein function were here reinforced and further reassessed. I214 is located in the inner core of the β subunit and so the alteration from isoleucine to lysine in that position may seriously compromise the stability of the region [12]. Concerning p.P356L, we can predict a dramatic effect of the change due to the unique characteristics

of proline. This amino acid has a rigid structure that induces a change in chain direction preceding β -strand n and contributes to confer conformational rigidity to the loop between α helix 11 and β -strand n . Thus, the substitution at position 356 of a proline by a leucine is expected to increase the flexibility and might disturb chain folding in this region, with possible consequences on the overall packing, stability and function of the protein.

Mutations within *DBT* (encoding E2 subunit)

Out of the three searched genes, *DBT* was the one where more novel mutations were found: four out of the six *DBT* mutations are here firstly described (p.Y122LfsX2; p.D390G; p.L398P and p.P411Q), while the remaining two (c.1209+5G>C and p.K313N) have already been identified.

The E2 subunit of BCKD consists of a lipoyl-bearing domain (LBD), a subunit-binding domain (SBD) and an inner core (catalytic) domain (CD). It is in CD that all missense mutations here identified are located. Although the structure of the human LBD and SBD were recently described [21], the sole mammalian crystal structure of CD is from bovine origin, being known that the bovine cubic core of the BCKD complex is formed by 24 subunits of E2, organized in eight groups of three monomers; each of these homotrimers occupies one vertex of the hollow cube, with octahedral symmetry [9].

Considering that the bovine sequence shares 93% identity with the human homolog, that structure can work as a helpful model to understand the adverse effects of MSUD mutations, as demonstrated in the study of Kato et al. who have already assessed the structural consequences of p.K313N [9].

When applying identical strategy to p.D390G and noticing that the aspartic acid at position 390 establishes a salt bridge with the conserved R376 of the α helix H4 from the same subunit, we could predict that the substitution of the residue by glycine (p.D390G) will preclude that specific interaction, affecting consequently the structure of helix H4. In addition, it seems likely that the structural alterations induced in helix H4 by p.D390G somehow might influence the binding to coenzyme A (CoA), since the near residue Q378 on this helix is directly involved in substrate binding.

Regarding alteration p.L398P, due to the rigid structure of proline, the amino acid change should also critically affect the E2 conformation and cause some degree of impairment in the hydrophobic core. In the case of the missense mutation producing p.P411Q, proline is the altered residue and its substitution by a glutamine is expected to cause some degree of impairment in CoA binding. Although P411 is not directly involved in cofactor binding it is important for the formation of the pocket where CoA will bind.

For these three mutations the structural considerations fully agree the evolutionary evidence suggesting they are too damaging to the protein function, with high likelihoods of functional impact (Table 2).

A fourth novel mutation in *DBT* is a CT deletion in exon 4 (p.Y122LfsX2), which was detected in homozygosity in three patients (including two sisters) and in heterozygosity in another one. Since it originates transcripts with a premature stop codon, again aberrant mRNAs can possibly be recognized by nonsense-mediated mRNA decay factors shutting down protein synthesis. Not surprisingly patients carrying this substitution have the severe classic form of the disease.

The splice mutation c.1209+5G>C, found in heterozygosity in two patients (P20 and P24), was predicted with GENSCAN to affect the normal splicing pattern of exon 9. In order to elucidate the real effect of c.1209+5G>C, we have examined cDNAs encompassing exons 7–11.

In both c.1209+5G>C bearing patients two equally predominant transcripts were observed: one with the normal and full sequence; and a second species with an entire skipping of exon 9 that fitted the *in silico* predictions about c.1209+5G>C. When cDNAs from control individuals were analyzed, besides the clearly major and normal transcript it was also observed a very secondary isoform that, coincidentally, presented the entire exon 9 skipped (Fig. 3). This finding (that was confirmed using a second pair of primers specific for the region corresponding to exons 8–10) was in line with the results obtained by Fisher et al. [22], who sequenced the transcripts from two normal cell lines and also detected a single exon 9 skipping in one minor transcript. It seems then that skipping of exon 9 may occur in normal individuals although being a rather infrequent splicing event. Probably, the presence of c.1209+5G>C in a splicing sequence dramatically shifts its rate

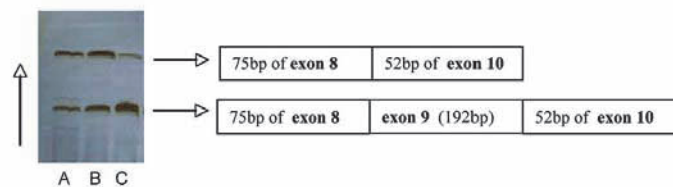


Fig. 3. PCR-amplification of cDNA region encompassing exons 8–10, from patient 20 (A), patient 24 (B) and from a control individual (C). The upper band represents the transcript with exon 9 skipped, while the lower band corresponds to the transcript with the three exons. Patients 20 and 24 are both heterozygous for the splice mutation c.1209+5G>C in *DBT* gene.

of recognition by the cell splicing machinery, leading to the regular production of a transcript that usually is only spuriously formed.

Among the carriers of *DBT* mutations affecting the inner core domain of the E2 protein, are the two unique thiamine responsive patients (P20 and P29) in our series. This reinforces previous evidence that the molecular features associated to this clinical phenotype systematically involve the *DBT* gene [23]. Unfortunately, in our two thiamine responsive patients, we could not hitherto find the second mutation that, in compound heterozygosity with others (c.1209+5G>C in P20 and c.1232C>A in P29), is associated with this MSUD phenotype. Given that up to now we have just focused on the molecular characterization of coding and intronic flanking regions of *BCKDHA*, *BCKDHB* and *DBT*, we cannot exclude that the patients are carriers of intronic alterations or deletions impossible to be detected with the referred strategy. Currently, the molecular screening is already being extended to the unstudied genomic regions within *DBT*, but for the moment is not possible to properly address which are the molecular defects that origin the thiamine responsiveness. Yet, in the case of P20, we can argue that the responsible variation does not seem to be the identified c.1209+5G>C. Firstly because c.1209+5G>C is also present in P24, who manifests the classic form of MSUD; secondly, because c.1209+5G>C is a splice mutation that gives rise to an E2 protein with reduced size, contrarily to which is being consistently observed in other known mutations causing thiamine responsiveness, all reportedly producing full-length mutant E2 proteins [23].

Lastly, is noteworthy that four of the six mutations identified in the *DBT* gene are present in the region encompassing exon 9–intron 9–exon 10. This observation might have occurred just by chance or alternatively might mean that the region has a special propensity to mutation. As a matter of fact such a trend is not verified in previous data on the molecular spectrum of MSUD [11–13] but the scarcity of studies on the subject does not allow us to draw definitive conclusions.

Final remarks

It is widely recognized that in MSUD, early identification and diligent management of diet holds the best course for minimizing the disease clinical manifestations [4]. This explains consensual recommendations to include MSUD in newborn screening programs, which in Portugal is being undertaken since 2005 [24]. The identification of patients at risk in the first days of life is crucial for future prognosis and quality of life for affected individuals.

The molecular screening of patients can provide further contributions to improve the clinical management of MSUD. Among other aspects, molecular studies are a source of important epidemiological data, as become clear in this study. Knowing, for instance, that 117delC is a major mutation underlying MSUD in Portuguese Gypsies

is of great medical relevance *per se*. Besides allowing for the implementation of community-based carrier testing programs aimed at evaluate the true incidence of this mutant allele, another immediate benefit from the perspective of public-health care is the possibility to facilitate molecular prenatal diagnosis in families at risk, which as a matter of fact is already currently ongoing avoiding the invasive technique alternatively used for determination of enzymatic activity in chorionic villus. Those measures will contribute at least to diminish the burden related with the delayed diagnosis of MSUD.

Another prospect of molecular studies is to facilitate projections on the clinical type and severity of a disease. These projections may be essential to guide a proper monitoring of patients and that is why phenotype-genotype studies are needed. Such studies on MSUD are still scarce and were up to now unable to demonstrate a tight correlation between molecular defects at *BCKDHA*, *BCKDHB* or *DBT* and a particular clinical phenotype. From the few published studies it is becoming evident the diversity of molecular and clinical presentation that characterizes patients with MSUD, illustrating the difficulty of applying to MSUD the so called “simple monogenic diseases” model [4,25–27].

However, tools do exist that might help to overcome some difficulties, among which is the possibility of three-dimensional structural analysis of mutation effects resulting from the availability of crystal structures of BCKD components. The data here obtained when such an approach was applied show that the derived information on structural impact of each mutation is quite in agreement at least with the severity of the corresponding clinical impact. In fact, the three mutations (p.D152N, p.A220V and p.Y413H) predicted to imply the milder structural damage were those harbored by patients (among the non-thiamine responsive) presenting a less severe clinical course. This retrospective analysis suggests that in the future, as long as more information on the crystal structure of BCKD will be available, mutation modeling may become a fundamental tool to predict the consequences of newly detected mutations.

Acknowledgments

This work was partially supported by Fundação para a Ciência e a Tecnologia (SFRH/BD/22685/2005) and by IPATIMUP (Programa Operacional Ciência e Inovação (POCI 2010), VI Programa Quadro (2002–2006).

References

- [1] D.T. Chuang, V.E. Shih, Maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria), in: C.R. Scriver (Ed.), *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, McGraw-Hill, New York, 2001, pp. 1971–2006.
- [2] F.H. Petit, S.J. Yeaman, L.J. Reed, Purification and characterization of branched chain α -keto acid dehydrogenase complex of bovine kidney, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 4881–4885.

- [3] L.J. Reed, Z. Damuni, M.L. Merryfield, Regulation of mammalian pyruvate and branched-chain α -keto acid dehydrogenase complexes by phosphorylation dephosphorylation, *Curr. Top. Cell. Regul.* 27 (1985) 41–49.
- [4] M.M. Nellis, A. Kasinski, M. Carlson, R. Allen, A.M. Schaefer, E.M. Schwartz, D.J. Danner, Relationship of causative genetic mutations in maple syrup urine disease with their clinical expression, *Mol. Genet. Metab.* 80 (2003) 189–195.
- [5] J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 4673–4680.
- [6] V. Ramensky, P. Bork, S. Sunyaev, Human non-synonymous SNPs: server and survey, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 3894–3900.
- [7] W.L. DeLano, The PyMOL Molecular Graphics System, DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA, 2002. Available from: <http://www.pymol.org>.
- [8] R.M. Wynn, M. Kato, M. Machius, J.L. Chuang, J. Li, D.R. Tomchick, D.T. Chuang, Molecular mechanism for regulation of the human mitochondrial branched-chain α -ketoacid dehydrogenase complex by phosphorylation, *Structure* 12 (2004) 2185–2196.
- [9] M. Kato, R.M. Wynn, J.L. Chuang, C.A. Brautigam, M. Custorio, D.T. Chuang, A synchronized substrate-gating mechanism revealed by cubic-core structure of the bovine branched-chain α -ketoacid dehydrogenase complex, *EMBO J.* 25 (2006) 5983–5994.
- [10] C. Burge, S. Karlin, Prediction of complete gene structures in human genomic DNA, *J. Mol. Biol.* 268 (1997) 78–94.
- [11] M. Henneke, N. Flaschker, C. Helbling, M. Müller, P. Schädewaldt, J. Gärtner, U. Wendel, Identification of twelve novel mutations in patients with classic and variant forms of maple syrup urine disease, *Hum. Mutat.* 22 (2003) 417–422.
- [12] P. Rodríguez-Pombo, R. Navarrete, B. Merinero, P. Gómez-Puertas, M. Ugarte, Mutational spectrum of maple syrup urine disease in Spain, *Hum. Mutat.* 27 (2006) 715–727.
- [13] N. Flaschker, O. Feyen, S. Fend, E. Simon, P. Schädewaldt, U. Wendel, Description of the mutations in 15 subjects with variant forms of maple syrup urine disease, *J. Inher. Metab. Dis.* 30 (2007) 903–909.
- [14] A.E. Åvarsson, J.L. Chuang, R.M. Wynn, S. Turley, D.T. Chuang, W.G.J. Hol, Crystal structure of human branched-chain α -ketoacid dehydrogenase and the molecular basis of multienzyme complex deficiency in maple syrup urine disease, *Structure (Fold. Des.)* 8 (2000) 277–291.
- [15] J.L. Chuang, C.R. Fisher, R.P. Cox, D.T. Chuang, Molecular basis of maple syrup urine disease: novel mutations at the E1 α locus that impair E1 (α 2 β 2) assembly or decrease steady-state E1 α mRNA levels of branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex, *Am. J. Hum. Genet.* 55 (1994) 297–304.
- [16] R.M. Wynn, J.R. Davie, J.L. Chuang, C.D. Cote, D.T. Chuang, Impaired assembly of E1 decarboxylase of the Branched-chain α -Ketoacid dehydrogenase complex in Type IA maple syrup urine disease, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 13110–13118.
- [17] L.E. Maquat, Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5 (2004) 89–99.
- [18] L. Kalaydjieva, B. Morar, R. Chaix, H. Tang, A newly discovered founder population: the Roma/Gypsies, *BioEssays* 27 (2005) 1084–1094.
- [19] L. Marshall, A. DiGeorge, Maple syrup urine disease in the old order Mennonites, *Am. J. Hum. Genet.* 33 (1981) 139A.
- [20] B. Zhang, H.J. Edenberg, D.W. Crabb, R.A. Harris, Evidence for both a regulatory mutation and a structural mutation in a family with Maple syrup urine disease, *J. Clin. Invest.* 83 (1989) 1425–1429.
- [21] C.F. Chang, H.T. Chou, Y.J. Lin, S.J. Lee, J.L. Chuang, D.T. Chuang, T.H. Huang, Structure of the subunit binding domain and dynamics of the di-domain region from the core of the human branched chain α -ketoacid dehydrogenase complex, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 28345–28353.
- [22] C.W. Fisher, C.R. Fisher, J.L. Chuang, K.S. Lau, D.T. Chuang, R.P. Cox, Occurrence of a 2-bp (AT) deletion allele and a nonsense (G-to-T) mutant allele at the E2 (DBT) locus of six patients with maple syrup urine disease: multiple-exon skipping as a secondary effect of the mutations, *Am. J. Hum. Genet.* 52 (1993) 414–424.
- [23] J.L. Chunag, R.M. Wynn, C.C. Moss, J. Song, J. Li, N. Awad, H. Mandel, D.T. Chuang, Structural and biochemical basis for novel mutations in homozygous Israeli Maple syrup urine disease patients. A proposed mechanism for the thiamine-responsive phenotype, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 17792–17800.
- [24] L. Vilarinho, H. Rocha, A. Marcão, C. Sousa, H. Fonseca, M. Bogas, R. Vaz Osório, Diagnóstico Precoce: resultados preliminares do rastreio metabólico alargado, *Acta Pediatr. Port.* 37 (2006) 186–191.
- [25] K.M. Dipple, E.B. McCabe, Phenotypes of patients with “simple” Mendelian disorders are complex traits: thresholds, modifiers, and systems dynamics, *Am. J. Hum. Genet.* 66 (2000) 1729–1735.
- [26] K.M. Dipple, E.B. McCabe, Modifier genes convert “simple” Mendelian disorders to complex traits, *Mol. Genet. Metab.* 71 (2000) 43–50.
- [27] C.R. Scriver, P.J. Waters, Monogenic traits are not simple: lessons from phenylketonuria, *Trends Genet.* 15 (1999) 167–272.

Available online at www.sciencedirect.com

Molecular Genetics and Metabolism 93 (2008) 475–480

Molecular Genetics
and Metabolismwww.elsevier.com/locate/ymgme

Brief Communication

Spectrum of *MMACHC* mutations in Italian and Portuguese patients with combined methylmalonic aciduria and homocystinuria, cblC type

Célia Nogueira ^{a,1}, Chiara Aiello ^{b,1}, Roberto Cerone ^c, Esmeralda Martins ^d,
 Ubaldo Caruso ^c, Isabella Moroni ^e, Cristiano Rizzo ^b, Luísa Diogo ^f, Elisa Leão ^g,
 Fernando Kok ^h, Federica Deodato ^b, Maria Cristina Schiaffino ^c, Sara Boenzi ^b,
 Olivier Danhaive ^b, Clara Barbot ^d, Sílvia Sequeira ⁱ, Mattia Locatelli ^b,
 Filippo M. Santorelli ^{b,*}, Graziella Uziel ^e, Laura Vilarinho ^{a,*}, Carlo Dionisi-Vici ^{b,*}

^a Genetics Medical Center, INSA, Oporto, Portugal^b Molecular Medicine, Metabolic Unit, Neonatal Intensive Care Unit, and Scientific Directorate, IRCCS Children's Hospital Bambino Gesù, Rome, Italy^c Department of Pediatrics, IRCCS G. Gaslini Institute, University of Genoa, Italy^d Department of Metabolic Diseases, HMP, Oporto, Portugal^e Department of Child Neurology, IRCCS Istituto Nazionale Neurologico C. Besta, Milano, Italy^f Department of Metabolic Diseases, HPC, Coimbra, Portugal^g Department of Metabolic Diseases, HSJ, Oporto, Portugal^h Department of Clinical Neurology, University of São Paulo, School of Medicine, São Paulo, Brazilⁱ Department of Metabolic Diseases, HDE, Lisbon, Portugal

Received 5 September 2007; received in revised form 8 November 2007; accepted 8 November 2007

Available online 27 December 2007

Abstract

Methylmalonic aciduria (MMA) and homocystinuria, cblC type (MIM 277400) is the most frequent inborn error of vitamin B₁₂. The recent identification of the disease gene, *MMACHC*, has permitted preliminary genotype–phenotype correlations.

We studied 24 Italian and 17 Portuguese patients with cblC defect to illustrate the spectrum of mutations in a southern European population and discuss the impact that mutation identification has on routine diagnostic procedures. Since the metabolic defect raises the serum levels of homocysteine, we also tested if variants in *MTHFR*—playing a key role in homocysteine remethylation pathway—could act as genetic modifier in cblC defect.

We found that the c.271dupA (accounting for 55% of the *MMACH* alleles in our cohort) followed by c.394C > T (16%) and c.331C > T (9%) were the most frequent mutations. In our study we also identified a novel mutation (c.544T > C). On the other hand, the *MTHFR* genotype did not appear to influence age at onset, the clinical phenotype and outcome of patients with cblC defect.

This study shows that mutation screening for the most common *MMACH* mutations occurring in early-onset forms (c.271dupA and c.331C > T) seems to have a high diagnostic yield in a southern European population with cblC defect. Although the identification of the gene defect *per se* does not predict completely time and severity of disease appearance, our data corroborate the importance of a molecular testing to offer accurate prenatal diagnosis to couples at high risk of having affected children.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: *MMACHC*; cblC; Methylmalonic aciduria and homocystinuria; *MTHFR*; Vitamin B₁₂

Methylmalonic acidurias (MMAs) encompass a group of genetically heterogeneous autosomal recessive disorders of methylmalonate and cobalamin metabolism caused by a defect in the conversion of methylmalonyl-CoA to succi-

* Corresponding authors. Fax: +39 0668592024.

E-mail address: fms3@na.flashnet.it (F.M. Santorelli).¹ These authors contributed equally and share the first authorship.

nyl-CoA. The different forms of MMAs share the biochemical marker of increased methylmalonic acid in body fluids (reviewed in [1]). Methylmalonic aciduria with homocystinuria is an inborn error of intracellular cobalamin metabolism resulting from impaired conversion of dietary vitamin B₁₂ or cobalamin to its two metabolically active forms, methylcobalamin (MeCbl) and adenosylcobalamin (AdoCbl). MeCbl and AdoCbl are essential coenzymes to methionine synthase and methylmalonyl-CoA mutase, respectively. The defect of these two cofactors causes the accumulation of methylmalonic acid and homocysteine in body fluids and a decrease of methionine. Three genetic defects of intracellular cobalamin metabolism, *cbiC* (MIM 277400), *cbiD* (MIM 277410), and *cbiF* (MIM 277380) cause combined MMA and homocystinuria.

cbiC defect is the most frequent form and patients present with a heterogeneous clinical picture [2]. Based on the age at onset, two distinct clinical forms have been recognized. The clinical features of the early-onset (EO) form, with appearance of symptoms within the first year of life, include a multisystemic disease with feeding difficulties, hypotonia, hydrocephalus, progressive developmental delay, seizures, mild dysmorphic features [3], anemia and hemolytic uremic syndrome. Patients with the later-onset form (LO), present a relatively milder clinical phenotype, characterized by progressive neurological symptoms and behavioral disturbances [2]. The long-term outcome is usually poor, with frequent neurological impairment. Treatment with hydroxycobalamin, betaine and folic acid decreases metabolite levels, although without their complete normalization.

The recent cloning of the disease gene (*MMACHC*) and the identification of 43 different mutations in 205 *cbiC* patients has permitted preliminary genotype–phenotype correlations and to relate specific gene variants to distinct ethnicities [4,5]. We present our recent experience in 41 new *MMACHC* cases from a combined Italian and Portuguese study, illustrate the spectrum of mutations in a southern European population, and discuss the impact that mutation identification has on routine diagnostic procedures. Since the metabolic defect raises the serum levels of homocysteine, we also tested the hypothesis that polymorphic variants in the *MTHFR* gene—playing a key role in homocysteine remethylation pathway—could act as genetic modifier for the phenotypic expression of *cbiC* defect.

Patients and methods

Over the past years our centers have been collecting clinical information and biological materials (cultured skin fibroblasts, blood, serum, urine, post-mortem tissue, DNA) from patients suspected of having an inborn error of metabolism. Patients in this study were selected after sharing and matching our databases. The diagnosis of *cbiC* defect was based on the identification of urinary and circulating metabolites and, whenever possible, confirmed with fibroblast studies [6]. Patients were defined as “early-onset” (EO) when the landmark features of *cbiC* defect appeared within the first year of life, and as “late-onset” (LO) when the disease

started later in life [2]. The whole coding sequence, the flanking exon-intron sequences, and the non-coding portion of exon 4 and exon 5 of the *MMACHC* gene (MIM 609831) were PCR amplified from genomic DNA as described [4]. Agarose-gel purified amplicons were directly sequenced using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Version 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA), and analyzed on an ABI 3130XL DNA Analyzer. A similar PCR-based approach was used to analyze the whole coding sequence of the *MTHFR* gene (MIM 607093).

Multiple linear regression analysis was used to identify significant predictors of the genotype in the entire sample, including gender, age, clinical features, and *MTHFR* genotype. Statistical analyses were performed using a Chi-square test with Yates corrections (or, when appropriate, Fisher's exact test). Statistical significance was set at $p < 0.01$.

Results

A total of 28 boys and 13 girls were identified (M/F ratio 2:1) in 24 Italian and 17 Portuguese kindred, two of which were of Brazilian origin. No multiple affected cases were found in our families. Median age at onset was 3 months (range 6 days–25 years), age at diagnosis ranged between 0 and 25 years.

As shown in Table 1, 36 patients (25M, 11F) presented the landmark description of *cbiC* defect within the first year of life (EO) and five (3M, 2F) showed the disease later in life (LO). Late-onset cases accounted for 24% and for 8% of the Portuguese and Italian patients, respectively. Following diagnosis and treatment start, bouts of biochemical decompensation were not recorded. The diagnosis was reached post-mortem in seven patients (5F, 2M; 5 EO, 2 LO). Median age at death was 2 months, with the cause of death being a metabolic related event.

At diagnosis, EO infants in whom clinical information could be retrieved showed signs of prenatal events such as intrauterine growth retardation (10%) and microcephaly at birth (34%). Failure-to-thrive, feeding difficulties, and delayed development occurred practically in all patients; signs of acute metabolic decompensation (e.g., acidosis, thrombocytopenia, anemia, leukopenia, etc.) were observed in 51%, hydrocephalus in four patients (14%, cases #21, 30, 37, 40), and hemolytic uremic syndrome in three patients (10%, cases #13, 39, 41). At follow up, almost all patients presented cognitive impairment/developmental delay. A total of 45% patients were microcephalic; seizures occurred in 62%, nystagmus in 41% of patients. The clinical phenotype in LO patients consisted of mild-to-moderate cognitive impairment, corticospinal tract signs, seizures, and psychiatric disturbances in all. Mielopathy was documented by MRI only in patient #24, and nystagmus was recorded in patients #4 and 7.

Table 1 lists the *MMACHC* genotype and the clinical phenotype identified in our study. Regardless of the age at onset, the so-called “common” c.271dupA mutation accounted for 55% of the *MMACHC* alleles in our cohort (48% in Italian; 65% Portuguese) followed by the c.394C>T (16%) and the c.331C>T (9%) variants (Fig. 1). Homozygosity for c.271dupA accounted for 34% (14 cases, of which seven were Italian) and that of c.394C>T for 5% (two Portuguese cases) (Table 1). In

Table 1
Genotype and clinical subgroup of patients with combined methylmalonic aciduria and homocystinuria, cblC type

Patient	Sex	Onset	Age of diagnosis	MMACHC Genotype	MTHFR c.677C>T	MTHFR c.1298A/C	Country
1	M	EO	28D	c.271dupA/c.271dupA	C/T	A/C	Pt
2	M	EO	1Y	c.271dupA/c.544T>C	C/C	A/A	Pt
3	M	EO	1Y	c.271dupA/c.271dupA	T/T	A/A	Pt
4	M	LO	8Y	c.271dupA/c.394C>T	T/T	A/A	Pt
5	M	EO	2M	c.271dupA/c.394C>T	C/T	A/A	Pt
6	F	EO	18D	c.271dupA/c.271dupA	C/C	A/A	Pt
7	F	LO [†]	15Y	c.394C>T/c.394C>T	C/T	A/C	Pt
8	M	EO	1M	c.271dupA/c.565C>A	C/C	A/A	Pt
9	F	EO	3M	c.271dupA/c.394C>T	C/C	A/A	Pt
10	M	EO [‡]	1M	c.271dupA/c.271dupA	T/T	A/A	Pt
11	F	EO [‡]	43D	c.271dupA/c.271dupA	C/C	A/A	Pt
12	M	LO [‡]	16Y	c.394C>T/c.394C>T	C/T	A/A	Pt
13	F	EO [‡]	4Y	c.271dupA/c.394C>T	C/T	A/C	Pt
14	F	EO [‡]	1M	c.271dupA/c.271dupA	C/C	A/C	Pt
15	M	EO	6D	c.271dupA/c.271dupA	C/C	A/A	Pt
16	M	EO	8M	c.271dupA/c.394C>T	C/T	A/A	Pt
17	M	EO	2D	c.271dupA/c.565C>A	T/T	A/A	Pt
18	M	EO	3M	c.271dupA/c.457C>T	T/T	A/A	It
19	F	EO	2M	c.271dupA/c.271dupA	T/T	A/A	It
20	F	EO	2M	c.271dupA/c.271dupA	T/T	A/A	It
21	F	EO [‡]	2M	c.666C>A/c.666C>A	C/T	A/C	It
22	F	EO	1M	c.271dupA/c.271dupA	C/C	A/C	It
23	M	EO	3M	c.271dupA/c.331C>T	C/T	A/A	It
24	F	LO	17Y	c.388T>C/c.481C>T	T/T	A/A	It
25	M	EO	1M	c.271dupA/c.271dupA	C/T	A/C	It
26	M	EO	2M	c.394C>T/c.666C>A	C/C	A/C	It
27	M	EO	7M	c.394C>T/c.468_469delCT	C/C	A/C	It
28	M	EO	18M	c.331C>T/c.331C>T	C/C	A/A	It
29	M	EO	2M	c.331C>T/c.457C>T	C/C	A/C	It
30	M	EO	5M	c.271dupA/c.271dupA	T/T	A/A	It
31	M	LO	25Y	c.271dupA/c.482G>A	C/T	A/A	It
32	M	EO	3.5Y	c.271dupA/c.394C>T	C/T	A/C	It
33	F	EO	1M	c.271dupA/c.331C>T	C/T	A/A	It
34	M	EO	2M	c.271dupA/c.331C>T	C/C	A/C	It
35	M	EO	3M	c.271dupA/c.271dupA	C/C	A/C	It
36	M	EO	2Y	c.271dupA/c.394C>T	C/C	C/C	It
37	M	EO	1M	c.271dupA/c.271dupA	C/C	A/C	It
38	F	EO	8M	c.3G>A/c.481C>T	C/T	A/A	It
39	M	EO	2M	c.271dupA/c.468_469delCT	C/T	A/A	It
40	M	EO	2M	c.331C>T/c.331C>T	T/T	A/A	It
41	M	EO	5M	c.3G>A/c.271dupA	C/T	A/A	It

M, male; F, female; EO, early-onset; LO, late-onset; [‡], died; D, days; M, months; Y, years; Pt, Portugal; It, Italy.

Italian patients, the second most frequent genotype was c.271dupA/c.331C>T (three cases) with the c.331C>T change representing 16% of the mutant alleles (Fig. 1). In Portuguese patients, the second most frequent genotype was c.271dupA/c.394C>T (five patients) with the c.394C>T accounting for 26% of *MMACHC* alleles (Fig. 1). The remaining alleles harbored less common variants. In a single Portuguese patient we identified a novel heterozygous mutation (c.544T>C) predicting a p.Cys182Arg variant. The latter mutation was not detected in 200 control chromosomes.

When a correlation to the clinical phenotype was attempted, homozygosity for c.271dupA appears to be uniformly associated with an EO phenotype. In particular, we found that 60% of EO alleles harbored the c.271dupA—and this group includes the 14 patients harboring the homozygous mutation—whereas the c.394C>T and the

c.331C>T mutations accounted each for 10% of the EO alleles. In the LO cases, these frequencies were different with the c.271dupA found in 20% and the c.394C>T mutation in 50% of the alleles (Fig. 2). The latter mutation was never detected at the homozygous status in EO patients whereas it was found in compound heterozygosity with c.271dupA in six cases with early disease onset. Based on data from this study, the c.394C>T appears to be protective from developing an EO phenotype, although a still greater number of LO subjects needs to be studied.

Analysis of the whole coding sequence of the *MTHFR* gene in 41 patients with cblC defect did not reveal new mutations and evidenced a frequent occurrence of two known polymorphic variants, c.677C>T (p.Ala222Val) and c.1298A>C (p.Glu429Ala). The distributions of all genotypes followed the Hardy–Weinberg equilibrium. We did not detect statistically significant differences when the

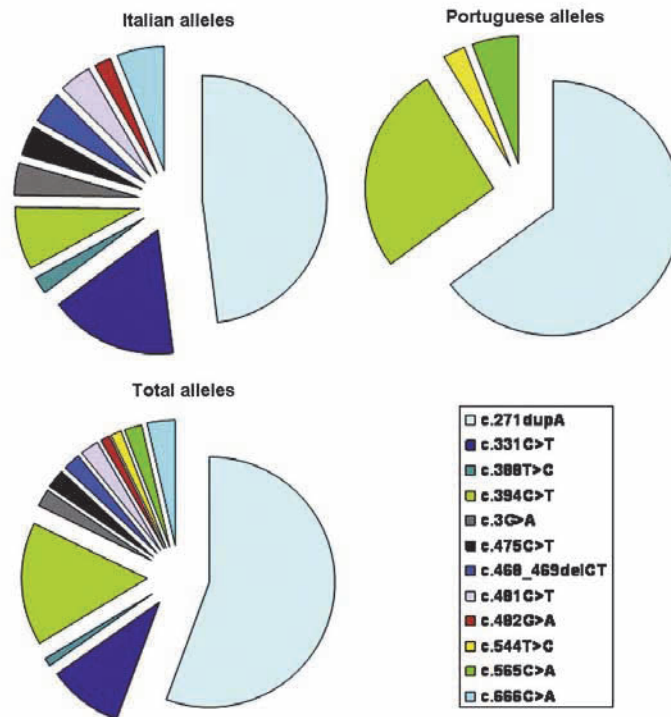


Fig. 1. Allele distribution in a southern European study. Allelic variants in the *MMACHC* gene identified in Italian ($n = 24$), Portuguese ($n = 17$) or Total ($n = 41$) patients with *cblC* defect are represented as relative percentage of total.

relative frequency of *c.677C > T* and *c.1298A > C* variants were compared with reported data in Italian [7,8] and Portuguese [9] individuals and with a subset of 25 Italian and 14 Portuguese controls—who were free of defects of cobalamin metabolism and MMA. The *677C* allele occurred in 57% of the *MMACHC* alleles with an odd ratio (OR) of 1.55 [95% CI 0.87–2.85] whereas the *1298A* allele accounted for 80% of patients (OR = 1.62 [0.87–3]). The *677C* allele was equally distributed among Italian and Portuguese whereas the *1298A* allele was slightly more frequent in Portuguese (88%) than in Italian (75%) ($p = 0.048$). No correlation was found between age at onset, the clinical phenotype and outcome of patients with *cblC* defect, and *MTHFR* genotype.

Discussion

The recent identification of the gene mutated in *cblC* defect [4] allowed the recognition of apparent phenotype–genotype correlations as well as the association of mutations with specific ethnicities as outlined in a large French-Canadian study [10]. This new information proves immediately useful for carrier-status detection in families

where mutations are known, and in setting up initial screening programs in molecular diagnostic laboratories.

Our study in 41 southern European individuals with *cblC* defect allowed us to confirm some of the previous findings and to add some slightly different considerations. Similarly to the large French-Canadian study [9], we found that the *c.271dupA* mutation represents the most “common” *MMACHC* allele (55% total). This is particularly true for EO cases and implies that a quick testing for this specific variant might have a high diagnostic yield. Also, it would enable a confirmatory diagnosis reducing the need of more laborious and time-consuming biochemical testing in cultured cells. Despite a large number of EO patients in our study, we detected the *c.331C > T* mutation—so far considered to be associated with this phenotype—only in 10% of *cblC* defect alleles. This finding differs from the French-Canadian study (24% of EO alleles) most likely because of the high number of *cblC* patients of Cajun background enrolled in that study. Consistent with data observed in the previous multiethnic study [10], also in the southern European patients we found that the *c.331C > T* occurred only in early-onset cases. In as far as it concerns mutation *c.394C > T*—believed to be associ-

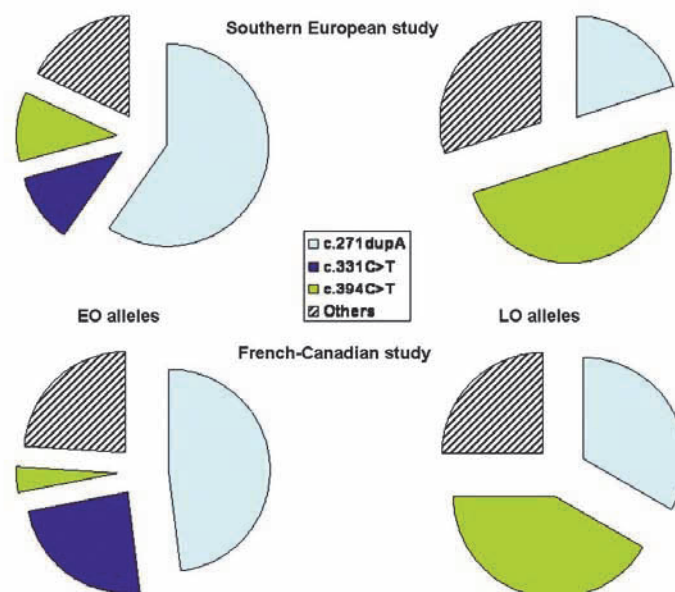


Fig. 2. Distribution of the most frequent *MMACHC* variants in this study according to their clinical presentation. Frequencies (%) are compared to those derived from a previously published French-Canadian study [10]. EO, early-onset; LO, late-onset.

ated mostly with a late-onset disease—we found a relatively high number of early-onset patients carrying this panethnic variant. However, the presence of a number of compound heterozygotes, in whom the age of onset is unpredictable, calls for caution in the interpretation of our findings. Therefore, the issues of genotype–phenotype correlation remain to be further investigated.

We identified a single *cbiC* allele harboring a novel *MMACHC* variant (c.544T > C, predicting a p.Cys182Arg change), suggesting that the likelihood of detecting new southern European variants is rather low. Molecular strategies aimed at the simultaneous detection of the two more common mutation (i.e. c.271dupA and c.394C > T) would be profitable since they might detect practically the whole set of Portuguese patients, 75% of the Italian cases and more than 50% of patients with different genetic background. This is beneficial in terms of achieving rapidly a confirmatory diagnosis and reducing our current reliance on a laborious biochemical test of the MMA subtypes. These observations are particularly useful if one considers the recent policies for expanded newborn screening in MMAs [11,12]. In this regard, a quick testing for the common c.271dupA mutation allowed the rapid confirmation of two infants (cases 6 and 17 in Table 1) detected by expanded newborn screening. Application of this strategy will be important to identify *cbiC* infants pre-symptomatically or early in the course of the disease.

Remarkably, we found a prevalence of affected males when compared to the published Quebec study [10], and higher than expected in autosomal recessive inborn errors of metabolism [13]. We have not clear explanation for this phenomenon, and we did not record a high frequency of female fetus or miscarriages in our kindred. It will be useful to verify these findings in other population before investigating further this point.

Given that it remains still questioned if other factors, either genetic or environmental, may play a role in explaining phenotypic expression and heterogeneity, we tested whether *MTHFR* might influence the clinical presentation in patients with *cbiC* defect, a disorder that affects homocysteine metabolism. *MTHFR* codes for methylenetetrahydrofolate reductase, a critical regulator of cellular methylations by catalyzing the conversion of 5,10-methylenetetrahydrofolate to 5-methyltetrahydrofolate, the methyl donor for the remethylation of homocysteine to methionine. We found that common *MTHFR* polymorphisms (i.e. c.677C > T, c.1298A > C) did not influence clinical presentation. However, we cannot exclude that more subtle effects might emerge upon reconsidering the complete spectrum of clinical features and metabolic findings in our patients.

In summary, we presented the genotype of 41 southern European patients with *cbiC* defect, their allele frequencies, and showed additional arguments to genetic heterogeneity and phenotypic expression. Although the identification of

the gene defect *per se* does not predict straightforwardly time and severity of disease appearance, our data corroborate the importance of a molecular testing. This will be important for an accurate genetic counseling and to possibly improve the natural course of the disease. Also, it would enable a confirmatory diagnosis reducing the need of complex, costly, laborious and time-consuming biochemical testing in cultured skin fibroblasts.

Acknowledgments

This work was supported in parts from grants of the Italian Ministry of Health, the Istituto Superiore di Sanità (to FMS and CDV), and a research scholarship to CN. CA is a fellow of the Bambino Gesù-Roma Tre University PhD program.

References

- [1] F. Deodato, S. Boenzi, F.M. Santorelli, C. Dionisi-Vici, Methylmalonic and propionic aciduria, *Am. J. Med. Genet. C* 142 (2006) 104–112.
- [2] D.S. Rosenblatt, A.L. Aspler, M.I. Shevell, B.A. Pletcher, W.A. Fenton, M.R. Seashore, Clinical heterogeneity and prognosis in combined methylmalonic aciduria and homocystinuria (cblC), *J. Inherit. Metab. Dis.* 20 (1997) 528–538.
- [3] R. Cerone, M.C. Schiaffino, U. Caruso, S. Lupino, R. Gatti, Minor facial anomalies in combined methylmalonic aciduria and homocystinuria due to a defect in cobalamin metabolism, *J. Inherit. Metab. Dis.* 22 (1999) 247–250.
- [4] J.P. Lerner-Ellis, J.C. Tirone, P.D. Pawelek, C. Dore, J.L. Atkinson, D. Watkins, C.F. Morel, T.M. Fujiwara, E. Moras, A.R. Hosack, G.V. Dunbar, H. Antonicka, V. Forgetta, C.M. Dobson, D. Leclerc, R.A. Gravel, E.A. Shoubridge, J.W. Coulton, P. Lepage, J.M. Rommens, K. Morgan, D.S. Rosenblatt, Identification of the gene responsible for methylmalonic aciduria and homocystinuria, cblC type, *Nat. Genet.* 38 (2006) 93–100.
- [5] Y.P. Yuen, C.K. Lai, Y.W. Chan, C.W. Lam, S.F. Tong, K.Y. Chan, DNA-based diagnosis of methylmalonic aciduria and homocystinuria, cblC type in a Chinese patient presenting with mild developmental delay, *Clin. Chim. Acta* 375 (2007) 171–172.
- [6] E.R. Baumgartner, Cobalamins, in: C.A. Hall (Ed.), *Methods in Hematology*, Churchill Livingstone, Edinburg, NY, 1983, p. 10.
- [7] R.M. Gueant-Rodriguez, J.L. Gueant, R. Debar, S. Thirion, L.X. Hong, J.P. Bronowicki, F. Namour, N.W. Chabi, A. Sanni, G. Anello, P. Bosco, C. Romano, E. Amouzou, H.R. Arrieta, B.E. Sánchez, A. Romano, B. Herbeth, J.C. Guillard, O.M. Mutchinick, Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations, *Am. J. Clin. Nutr.* 83 (2006) 701–707.
- [8] I. Scala, B. Granese, M. Sellitto, S. Salome, A. Sammartino, A. Pepe, P. Mastroiacovo, G. Sebastio, G. Andria, Analysis of seven maternal polymorphisms of genes involved in homocysteine/folate metabolism and risk of Down syndrome offspring, *Genet. Med.* 8 (2006) 409–416.
- [9] C. Marinho, I. Alho, D. Arduño, L.M. Falcão, J. Brás-Nogueira, M. Bicho, GST M1/T1 and MTHFR polymorphisms as risk factors for hypertension, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353 (2007) 344–350.
- [10] C.F. Morel, J.P. Lerner-Ellis, D.S. Rosenblatt, Combined methylmalonic aciduria and homocystinuria (cblC): phenotype genotype correlations and ethnic-specific observations, *Mol. Genet. Metab.* 88 (2006) 315–321.
- [11] M. Natowicz, Newborn screening setting evidence-based for protection, *N. Engl. J. Med.* 353 (2005) 867–870.
- [12] <http://mchb.hrsa.gov/screening/summary.htm>.
- [13] C. Dionisi-Vici, C. Rizzo, A.B. Burlina, U. Caruso, G. Sabetta, G. Uziel, D. Abeni, Inborn errors of metabolism in the Italian pediatric population: a national retrospective survey, *J. Pediatr.* 140 (2002) 321–327.

V. DISCUSSÃO

5.1 - Contributo do Programa Nacional de Diagnóstico Precoce para a Evolução Clínica dos Doentes Metabólicos

5.1.1 - Aspectos gerais

Os rastreios são uma prática comum da medicina actual e visam um diagnóstico tão precoce quanto possível das patologias em fase pré-sintomática ou subclínica, como sucede na área da oncologia com os cancros da mama, do útero, da próstata e colo-rectal. Assim, podemos afirmar que a única justificação para rastrear uma doença é poder obter algum tipo de benefício a nível clínico. Nas DHM, este benefício está totalmente provado num grupo restrito de doenças e são poucas aquelas em que o rastreio foi suspenso por ausência benefício (Wilcken B, 2011).

A demonstração inequívoca de ganhos efectivos no rastreio das DHM, está repleta de dificuldades. A necessidade de criar grupos de controlo não sujeitos a rastreio, para definição de caso e para observar a história natural, é evidente mas difícil, dada a necessidade de equidade no acesso à saúde. Por outro lado, o número de diagnósticos efectuados na sequência do rastreio é maior, com reconhecimento de fenótipos provavelmente mais benignos em algumas das patologias, dificultando uma comparação correcta. Além disso, a necessidade de um período de seguimento longo, indispensável para afirmar o benefício resultante, é um factor limitativo. Há ainda a acrescentar a limitação em termos de número de casos, o que acarreta uma difícil análise estatística das amostras obtidas, dado tratar-se de doenças raras (Wilcken B, 2010).

Neste contexto, é importante a conjugação e divulgação de toda a experiência no seguimento das doenças rastreadas, na tentativa de avaliar os ganhos efectivos para cada uma delas.

Podemos afirmar que Portugal reúne condições apropriadas, sem problemas éticos de discriminação e desigualdade, causados pelo alargamento do rastreio, em contraste com países onde existem vários centros de rastreio com opções próprias e painéis heterogéneos.

A existência de centros de tratamento com profissionais experientes no tratamento e seguimento destes doentes é também fundamental. Na Unidade de Doenças Metabólicas do Hospital Maria Pia do Centro Hospitalar do Porto, tive oportunidade de durante anos

tratar e acompanhar a evolução de dezenas de doentes que foram diagnosticados de forma sintomática. O meu apoio e ligação à consulta de seguimento de doentes rastreados com fenilcetonúria do Instituto de Genética Médica Doutor Jacinto de Magalhães, entre Abril de 1995 e Setembro de 1998 e à qual continuei ligada posteriormente como consultora, deu-me também experiência no seguimento desta doença. O alargamento do rastreio a mais DHM, a partir de 2004, veio colocar novos desafios no tratamento de doentes assintomáticos. Algumas doenças têm alta probabilidade de ser benignas e o seguimento deverá ser orientado de forma informada e cuidadosa, mas sem causar iatrogenia na criança e ansiedade na família.

É compreensível que o rastreio não inclua as mesmas doenças em diferentes países e que factores epidemiológicos e económicos justifiquem as diferentes opções. Assim se compreende que o painel português inclua doenças como a argininemia e a 3HMG que são particularmente frequentes entre nós (Vilarinho *et al.*, 2010).

5.1.2 - Aminoacidopatias e acidúrias orgânicas

Das doenças do metabolismo das proteínas abrangidas pelo rastreio, serão discutidas apenas aquelas mais relevantes na nossa experiência e que fazem parte dos trabalhos incluídos nos resultados.

Embora esta dissertação tenha como finalidade avaliar as repercussões das novas doenças passíveis de diagnóstico por MS/MS, incluídas no painel português, referir-me-ei brevemente à fenilcetonúria, que além de ser a base do sucesso a partir da qual se iniciaram posterior e progressivamente todos os outros rastreios metabólicos neonatais, é a única da qual se dispõe de um *follow-up* significativo a longo prazo.

Fenilcetonúria

O rastreio desta doença, faz-se há mais de 30 anos em Portugal e a incidência na nossa população é de 1/10.082. O número de doentes em seguimento no CGM (total de 160 sendo 139 rastreados), permite um conhecimento seguro dos dois grupos de doentes, rastreados e não rastreados, e uma avaliação comparativa. Efectuei consulta de seguimento destes casos durante três anos e meio e tive oportunidade de conhecer doentes pertencentes a vários grupos etários, desde RN até à idade adulta, e perceber todas as vantagens do rastreio em termos neurológicos, cognitivos, ganhos em qualidade

de vida para os doentes e para a família bem como as repercussões em termos sociais. Com o passar dos anos e a entrada na adolescência e vida adulta, novas constatações e novos desafios, inicialmente desconhecidos no início do rastreio, se foram colocando.

O diagnóstico dos primeiros casos de fetopatia (restrição de crescimento intra-uterino, microcefalia, cardiopatia congénita) alertou para o efeito tóxico dos níveis da Phe nos fetos de mães com fenilcetonúria e para a necessidade de manter os valores deste aminoácido muito próximo do normal durante a gravidez (Campistol *et al.*, 1999). As doentes com fenilcetonúria rastreadas em seguimento, acima referidas, e que já deram à luz, fizeram-no na sequência de uma gravidez programada e cuidadosamente monitorizada para evitar as sequelas fetais. Presentemente, são seguidas quatro crianças que têm 3 anos, 6 e 2 meses respectivamente e um desenvolvimento normal (dados não publicados).

As alterações comprovadas a nível da mielinização cerebral, no comportamento e na capacidade de desempenho, observados nos doentes quando suspendiam o tratamento aos 6 – 7 anos de idade, como inicialmente foi aceite, levaram a concluir que o tratamento nesta doença deve ser vitalício (Smith I, 1994). Entretanto, a investigação realizada tem demonstrado que, além dos efeitos neurotóxicos causados pelos níveis elevados de Phe, a consequente deficiência de outros aminoácidos neutros no cérebro e dos neurotransmissores (dopamina, norepinefrina e serotonina) estão também envolvidos na regulação do humor, da emoção e da cognição. E se é verdade que os efeitos dos níveis plasmáticos de Phe elevados parecem diminuir com a idade, devido a uma maior sensibilidade dos doentes mais jovens às flutuações nas concentrações deste aminoácido, alguns estudos mostram evidências de disfunções neuropsicológicas e neurofisiológicas, em doentes adolescentes e adultos tratados precoce e continuamente. Estes adultos demonstram défices cognitivos específicos, alguns dos quais associados à área frontal e temporal do cérebro (Paus *et al.*, 1999; Smith e Knowles J, 2000; Anderson, 2010) que não podem ser justificados exclusivamente pela não adesão ao tratamento. Por isso, ao estudar estes doentes devemos ter em consideração não só os efeitos de níveis de Phe elevados na cognição, mas também no funcionamento emocional e comportamental.

A dieta restrita em proteínas, pode também a longo prazo, aumentar o risco de osteopose, pela repercussão que a dieta restrita em proteínas tem na deposição do cálcio osseo (Nagasaka *et al.*, 2011).

Apesar destes problemas, a evolução e estado actual de conhecimento sobre fenilcetonúria são assinaláveis e os doentes são monitorizados de forma mais cuidada e evoluem mais favoravelmente.

Leucinose

A incidência desta DHM estimatimada, com base nos doentes sintomáticos é de 1/113 000 entre nós, sendo superior à descrita na literatura que é de 1/185 000. Este facto pode ser explicado pelo elevado número de casos identificados na população de etnia cigana do sul de Portugal. Com o rastreio sistemático, verificamos que a incidência é na realidade superior, 1/86 000 (Quental *et al.*, 2010), seguindo a tendência esperada de um maior número de doentes pré-sintomáticos em relação aos com diagnóstico pós-sintomático. Provavelmente vários casos não eram diagnosticados atempadamente e faleciam sem diagnóstico devido à evolução rápida e fatal da patologia.

Estudos retrospectivos indicam que, para um desenvolvimento cognitivo normal o mais importante é a precocidade de diagnóstico (le Roux *et al.*, 2006) e a rapidez com que se obtêm níveis de Leu abaixo do valor crítico de 1000 $\mu\text{mol/L}$ (Simon *et al.*, 2006).

Nos casos diagnosticados de forma sintomática, há um predomínio de formas de apresentação neonatal com uma idade média na altura do diagnóstico de 15 dias (12 dias nos casos diagnosticados no Hospital Maria Pia), que diminuiu para 11 dias com o rastreio. Em relação ao valor médio de Leu aquando do diagnóstico, foi de 2703 $\mu\text{mol/L}$ nos não rastreados e 2145 $\mu\text{mol/L}$ nos doentes rastreados.

O diagnóstico de RN assintomáticos ou com sintomas iniciais ligeiros, como recusa alimentar e letargia, como aconteceu com três casos rastreados, permite uma abordagem menos invasiva, a qual pode passar apenas pela depuração endógena, evitando manobras de depuração exógena que, além de serem dispendiosas, comportam riscos acrescidos para o doente. Exemplo de uma evolução desfavorável devido à diálise peritoneal, foi o caso de uma doente que teve diagnóstico aos 8 dias de vida, com encefalopatia grave e valores de Leu superiores a 3000 $\mu\text{mol/L}$. Teve uma abordagem inicial favorável com melhoria do estado neurológico e valores de Leu inferiores a 1000 $\mu\text{mol/L}$, mas devido a uma peritonite, teve uma nova subida de Leu com deterioração neurológica e sequelas graves permanentes (Martins *et al.*, 2008).

O primeiro doente detectado no início do estudo piloto, tinha 20 dias de vida e evoluiu de forma desfavorável, com ataxia e atraso de desenvolvimento. Neste caso, decorreram 10 dias entre a data de colheita, que foi aos 5 dias de vida, e a data de recepção no Laboratório Nacional de Rastreio. Este atraso no processamento analítico ocorreu porque a ficha de diagnóstico tinha ficado retida no Centro de Saúde. Constatou-se que havia locais que aguardavam até obter um número “suficiente” de fichas para as colocar no

correio. Este caso contribuiu para que essa falha operacional fosse detectada e corrigida pelo PNDP.

É importante que a abordagem terapêutica inicial seja protocolada de forma a que os níveis de Leu desçam o mais rapidamente possível para níveis não neurotóxicos, e deverá ser efectuada necessariamente em centros de tratamento experientes. O seguimento a longo prazo com protocolos uniformes e actualizados é também importante de forma a manter valores de controlo o mais próximo possível dos ideais e providenciar uma actuação rápida e eficaz nos episódios de descompensação (Kner *et al.*, 2011).

Os dados obtidos na nossa população, vêm corroborar que o rastreio para os casos de leucinoze com apresentação clássica é importante, uma vez que os níveis de Leu encontrados no momento da admissão hospitalar estão directamente correlacionados com a idade no diagnóstico, sendo fundamental a precocidade para obter uma evolução clínica favorável.

Argininemia

O défice em arginase é extremamente raro a nível mundial com uma incidência entre 1/363.000 e 1/1.000.000 (Brusilow e Horwich, 2001; Cederbaum e Crombez, 2010). Contudo, antes da implementação do rastreio alargado de DHM, já havia entre nós dez casos sintomáticos de argininemia diagnosticados (Vilarinho *et al.*, 1990; Braga *et al.*, 1997; Fidalgo *et al.*, 1997; Cardoso *et al.*, 2001; Santos Silva *et al.*, 2001), o que justifica a sua inclusão no painel português, contrariamente ao que sucede noutros programas de rastreio europeus (Vilarinho *et al.*, 2010). Efectivamente, em Portugal a argininemia é a segunda doença do ciclo da ureia mais frequente, a seguir ao défice em ornitina carbamiltransferase, com uma frequência calculada ao rastreio de 1/181.558 (Relatório PNDP, 2010).

Na nossa Unidade de Doenças Metabólicas, todos os doentes com défice em arginase, diagnosticados de forma sintomática, desenvolveram sintomatologia neurológica, entre os 2 e 4 anos de idade, excepto no caso da doente com apresentação hepática neonatal, que mantém um exame neurológico normal aos 19 anos de idade (Martins *et al.*, 2008). Esta jovem, iniciou tratamento aos 2 meses de vida o que provavelmente terá protegido o sistema nervoso central da exposição aos compostos guanidínicos neurotóxicos (Deignan *et al.*, 2010). Os doentes diagnosticados na sequência do rastreio, iniciaram tratamento em média aos 16 dias de vida, têm actualmente 9 meses, 2 e 5 anos de idade, e registam um desenvolvimento psicomotor e exame neurológico normais. Se para o último doente a ser diagnosticado é ainda cedo para emitir um parecer em relação à evolução, para os outros

dois podemos dizer que o diagnóstico precoce foi vantajoso. A criança mais velha tem uma apresentação clássica, e aos 5 anos de idade apresenta um exame neurológico e imagem cerebral normais. Não tem registos de internamento por descompensação aguda e a avaliação de QD é normal. A doente de 2 anos de idade teve uma forma de apresentação neonatal e, embora aparentemente assintomática, na primeira observação já apresentava uma hiperamoniémia (Martins *et al.*, 2010). Esta apresentação neonatal, que é rara na argininemia, manifesta-se com um quadro de falência hepática e encefalopatia sendo o prognóstico neurológico normalmente desfavorável (Schiff *et al.*, 2009). O rastreio neonatal foi fundamental no prognóstico, ao permitir o início de tratamento antes de se instalarem lesões neurológicas irreversíveis no doente. O exame neurológico o QD são normais aos dois anos de idade. A imagem cerebral é também normal (Martins *et al.*, 2011).

O único caso de argininemia rastreado descrito na literatura, apresentava um desenvolvimento e exame neurológico normais aos 6 anos de idade (Edwards *et al.*, 2009). Outros casos identificados em rastreio familiar sugerem também que um tratamento iniciado precocemente pode prevenir a instalação de lesões neurológicas (Cederbraum *et al.*, 2004).

A experiência adquirida, no tratamento de doentes com argininemia, permitiu-nos ser pioneiros no transplante hepático, que revelou ser a terapêutica de eleição para os casos de doença neurológica evolutiva, apesar do tratamento conservador (Santos Silva *et al.*, 2001, Martins *et al.*, 2005). Presentemente, a divulgação da nossa experiência no tratamento e seguimento dos casos de argininemia rastreados é também extremamente importante em termos científicos e clínicos, podendo servir de orientação a outros grupos com menor experiência nesta patologia.

Homocistinúria Clássica

Contrariamente às demais patologias incluídas no painel português de rastreio neonatal alargado, cuja incidência se verificou ser superior à previamente estimada, a homocistinúria apresenta uma incidência de 1/544.675, passados 6 anos de rastreio com apenas um caso positivo (Relatório PNDP, 2010).

O total de 7 doentes diagnosticados em idade pediátrica, detectados de forma sintomática, antes do início do rastreio, e em seguimento na região Norte, são formas graves da doença, portadores da mutação T191M e resistentes ao tratamento com a piridoxina (Martins *et al.*, 2008), e nos quais os valores de Met na primeira semana de vida deveriam estar teoricamente, aumentados. Apesar de, até à presente data, não terem sido referidos casos de falsos negativos no despiste para esta doença, sabemos que a homocistinúria

pode evoluir de forma indolente, sendo os primeiros sintomas detectados apenas no início da idade escolar (luxação do cristalino), ou mais tardiamente, na adolescência ou mesmo na idade adulta (acidentes trombóticos). Esta hipótese não pode ainda ser excluída, tendo em conta o período de tempo que decorreu desde o início do rastreio alargado em Portugal. Eventualmente o doseamento da homocistina na ficha de DP como segundo marcador, pode reduzir os falsos negativos nesta doença caso os mesmos existam (Gran Schreier *et al.*, 2010).

Acidúria 3-hidroxi-3-metilglutárica

Esta patologia, com uma incidência de 1/112.248, era a acidúria orgânica diagnosticada com maior frequência em Portugal antes do início do rastreio neonatal alargado (Cardoso *et al.*, 2004). É uma doença metabólica com incidência particularmente elevada no Médio Oriente e norte de África (Barosh *et al.*, 1990), sendo rara na maioria dos países europeus.

Uma revisão do total de 13 doentes portugueses diagnosticados em fase sintomática (Cardoso *et al.*, 2000), mostra uma mortalidade de 20%, sobreponível à descrita na literatura, sendo ainda de referir na história familiar outras crianças falecidas de forma aguda e com etiologia não esclarecida, mas com possibilidade de serem afectadas da mesma DHM. Segundo a literatura, existe ainda um risco significativo de sequelas neurológicas com atraso cognitivo nos doentes com 3HMG (van der Knaap *et al.*, 1998).

As duas crianças diagnosticadas na sequência do rastreio e em seguimento na Unidade de Doenças Metabólicas do Hospital Maria Pia iniciaram o tratamento, em média, ao quinto dia de vida. Estavam assintomáticas e sem alterações bioquímicas detectáveis (hipoglicemia, acidose metabólica ou hiperamoniémia). Têm actualmente 2 e 5 anos de idade, crescimento normal, exame somático, neurológico e desenvolvimento psicomotor normais (avaliação de desenvolvimento efectuada com a escala de Griffiths - dados não publicados). A progressão do perímetro cefálico está dentro dos percentis normais, sem macrocrânia, e a imagem cerebral não mostra evidência de attingimento da substância branca, a qual está descrita em alguns doentes aparentemente assintomáticos (van der Knaap *et al.*, 1998). O exame oftalmológico é também normal.

O diagnóstico precoce de 3HMG pode reduzir a elevada mortalidade associada ao primeiro episódio de descompensação, bem como a morbilidade decorrente das situações de descompensação graves posteriores e tem vantagens a curto prazo. Em relação à evolução a longo prazo, nomeadamente ao attingimento neurológico, é necessário um *follow-up* criterioso de todos os doentes com avaliação seriada por neuropediatria,

neurofisiologia e imagiologia cerebral, no sentido de avaliar adequadamente a evolução dos casos diagnosticados precocemente.

Acidúrias metilmalónica e propiónica

No universo das DHM actualmente passíveis de rastreio, o grupo das acidúrias orgânicas clássicas (metilmalónica, propiónica e isovalérica), é formado por doenças cujos benefícios do rastreio neonatal são particularmente discutíveis. Na sua forma de apresentação precoce, cerca de 50% dos doentes estão já sintomáticos ao 4^a dia de vida e as terapêuticas existentes parecem melhorar a sobrevida a curto prazo, mas não alteraram as repercussões neurológicas e do desenvolvimento observadas mais tardiamente (Leonard *et al.*, 2003, Ogier de Baulny, 2005)

Em 2006 Dionisi Vici e colaboradores e o grupo de Horster em 2009 mostraram que em doentes diagnosticados na sequência do rastreio neonatal havia uma morbidade menor e uma evolução mais favorável quer nas formas de apresentação tardia quer nas formas com apresentação clínica neonatal. O diagnóstico mais precoce permite reverter o quadro encefalopático rapidamente e obter assim um desenvolvimento psicomotor normal num número superior de doentes. Posteriormente o controlo rápido dos episódios de descompensação é também fundamental na evolução a longo prazo.

Os nossos doentes com formas neonatais sintomáticas, , foram internados muito precocemente, entre o 3^o e 6^o dias de vida, altura em que ainda não tinham efectuado a colheita para o “teste do pezinho”. A forma tardia da acidúria metilmalónica respondeu ao tratamento com a vitamina B12 e o exame somático e neurológico são normais, aos 12 anos, bem como o desenvolvimento cognitivo (Martins *et al.*, 2008). Dos doentes identificados no rastreio, está apenas em seguimento uma criança de 4 anos com acidúria isovalérica, que é portadora da mutação c.932C>T associada a uma apresentação benigna e eventualmente assintomática e que tem sido descrita frequentemente em doentes rastreados (Ensenauer *et al.*, 2004). A doente não efectua qualquer tratamento de base e tem somente indicação para em períodos de maior stress metabólico aumentar o aporte de hidratos de carbono, uma vez que foi observada uma tendência para desenvolver cetonúria e acidose metabólica nas situações mais exigentes em termos fisiológicos (dados não publicados).

As **acidúrias metilmalónicas** por alteração do metabolismo da **vitamina B12 - variantes C** (Cbl-C) são particularmente frequentes nos distritos de Porto e de Braga. Seguimos na Unidade do Hospital Maria Pia um total de 6 doentes diagnosticados de forma sintomática. Destes, apenas um teve manifestações no PNN com hipoglicemia,

acidose metabólica e hipotonia. A evolução foi desfavorável com atingimento neurológico e oftalmológico graves. Dos cinco casos com manifestações mais tardias, quatro têm clínica neurológica com atraso cognitivo moderado e epilepsia e um apresenta um desenvolvimento cognitivo normal (Martins *et al.*, 2008). Tal como descrito noutras séries (Martinelli *et al.*, 2011), verificamos que nestes doentes mesmo após normalização bioquímica, não há uma regressão completa do quadro nomeadamente da clínica neurológica. É possível que estes casos (mais tardios) tivessem beneficiado com um tratamento iniciado mais precocemente, no entanto, de acordo com a bibliografia as variantes de apresentação tardia não têm uma resposta ao tratamento tão favorável como as formas da acidúria metilmalónica clássica (Fowler *et al.*, 2008).

Foram detectados três casos de défice da Cbl C no PNDP (através de um aumento da propionilcarnitina) sendo o único falso negativo do rastreio alargado em Portugal, identificado até à presente data, um caso de défice em Cbl D, forma tardia, diagnosticado com clínica neurológica aos 8 meses de vida. Segundo a literatura, a execução de testes adicionais, em que se doseie o AMM, a homocisteína e a Met na ficha de diagnóstico precoce, vai contribuir para reduzir os falsos negativos quando o marcador primário não for conclusivo (Shigematsu *et al.*, 2010; Weisfeld-Adams *et al.*, 2010). Para colmatar estas situações já é executado por alguns centros o rastreio simultâneo em sangue e urina recolhida na primeira semana de vida, como é o caso de Centro de Santiago de Compostela em Espanha (Cocho *et al.*, 2010).

Efectivamente, dado o facto de a colheita ser efectuada muito precocemente entre o 3º e 5º dia de vida, podem ocorrer falsos negativos nos casos com apresentação tardia ou intermitente (Bhattacharya *et al.*, 2006), nomeadamente na leucínose e nalgumas acidúrias orgânicas como a metilmalónica por défice no metabolismo da cobalamina em que as manifestações clínicas podem surgir alguns anos ou décadas mais tarde.

Em termos de estudo retrospectivo, não foi possível uma avaliação por MS/MS dos valores de propionilcarnitina da ficha de rastreio dos doentes sintomáticos com aciduria metilmalónica por défice da vitamina B12, por estes terem nascido antes do início do rastreio alargado no nosso país e as respectivas fichas já não terem qualidade que o permitisse.

5.1.3 - Defeitos da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos

Neste segundo grupo de patologias abrangidas pelo rastreio, serão discutidas apenas aquelas com maior frequência no nosso país, ou aquelas nas quais foram elaborados

registos a nível nacional e que fazem parte dos artigos incluídos no capítulo dos resultados.

Défice em MCAD

O rastreio desta doença é globalmente aceite nos países ocidentais que efectuam rastreio por MS/MS. Dos 24 erros hereditários do metabolismo que fazem parte do painel português de DHM rastreadas por espectrometria de massa, o défice em MCAD é o mais frequente: 1/9.977 (Vilarinho *et al.*, 2010). Os 6 doentes em seguimento na nossa Unidade de Doenças Metabólicas, têm entre 10 meses e 6 anos de idade e apresentam crescimento estatoponderal, bem como desenvolvimento psicomotor e cognitivo normais (Martins *et al.*, 2009; Nascimento *et al.*, 2009). Não há registo de descompensações e os internamentos efectuados ocorreram por situações de infecção, associadas a recusa alimentar e vômito, com necessidade de fluidoterapia endovenosa para evitar descompensação (total de seis internamentos, quatro de curta duração).

O seguimento destes doentes está de acordo com o que foi descrito noutras séries (Hass *et al.*, 2007; Ratzel *et al.*, 2005). Com a introdução no rastreio neonatal do défice em MCAD, a mortalidade associada, que era de 30% no primeiro episódio de descompensação, desceu para níveis praticamente nulos, e a morbilidade causada pelas alterações metabólicas diminuiu significativamente (van der Hilst *et al.*, 2007).

MADD

É a mais grave das doenças da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos, estando associada a uma mortalidade e morbilidade elevadas sobretudo nas formas de apresentação precoce (Schiff *et al.*, 2006). A sua inclusão nos programas de rastreio neonatal é objecto de debate e a sua efectividade equacionada (Angle e Burton, 2008).

Nos casos de apresentação mais precoce, com início ainda na vida intra-uterina e evidentes logo após o nascimento, com quadros de dismorfia e hipotonia, habitualmente fatais nos primeiros dias de vida, é consensual que o rastreio neonatal não apresenta benefício directo na evolução da doença (Vockley J, 2008). Os três casos de MADD sintomáticos, referidos no capítulo dos resultados (artigo 6 - resultados) morreram na primeira semana de vida. Nos casos assintomáticos aquando do rastreio, os marcadores bioquímicos não nos permitem avaliar, de uma forma evidente, o potencial de gravidade da doença. O risco de morte súbita no primeiro ano de vida é elevado, como aconteceu com

uma doente nossa e pode ocorrer em crianças tratadas, que aparentemente estão bem, sendo desencadeada por gastroenterites ou outras intercorrências infecciosas, aparentemente banais (Angle e Burton, 2008). Pelo contrário, nos casos de evolução mais arrastada e silenciosa com miopatia progressiva, o tratamento é eficaz sobretudo nas formas que respondem à riboflavina (Ohkuma *et al.*, 2009).

As formas de apresentação mais tardia, com marcadores bioquímicos presentes de modo intermitente, podem dar falsos negativos no rastreio neonatal e na investigação metabólica efectuada fora da crise (experiência pessoal).

Dos casos que seguimos, fica a noção de que o rastreio da MADD é importante, devendo ser orientado por protocolos de tratamento mais interventivos, com ensinamento detalhado à família e associado a estudos moleculares que podem ser orientadores em relação ao prognóstico se houver correlação genótipo-fenótipo. A avaliação do atingimento multiorgânico é importante mas não permite excluir o risco de morte súbita, por arritmia, em doentes que têm coração com morfologia aparentemente normal.

Défice em SCHAD

Nos resultados, apresentamos uma compilação dos casos publicados desta patologia rara, recentemente descrita, e que consiste num defeito da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos (Martins *et al.*, 2011), causado por défice na desidrogenase dos hidroxíácidos de cadeia curta. Descrevemos, detalhadamente, a história clínica, fenótipo e genótipo de quatro doentes portugueses, provenientes de duas famílias não relacionadas, e que foram diagnosticados sintomaticamente. A recuperação da ficha de diagnóstico precoce do último doente e a análise do sangue remanescente permitiu verificar que um dos marcadores bioquímicos da patologia, hidroxibutirilcarnitina (C4OH), já se encontrava elevado no momento da colheita para rastreio neonatal. Este novo dado é importante pois foi a primeira vez que se pode evidenciar a presença deste marcador em doentes com défice em SCHAD no período neonatal, abrindo uma porta à inclusão de mais uma patologia da β -oxidação no PNDP.

Posteriormente, e com base nesta experiência, foi detectado no rastreio um aumento da concentração de C4OH, numa outra criança no período neonatal, que se veio a confirmar ter também défice em SCHAD (Marques *et al.*, 2008). Assim, apesar do défice em SCHAD não fazer parte do painel oficial de doenças rastreadas, a sua suspeita e diagnóstico precoce é possível, como foi comprovado por estes dois casos, evitando os episódios de hipoglicemia e convulsões associados ao hiperinsulinismo característico do fenótipo, que podem ocasionar lesões neurológicas irreversíveis (Di Candia *et al.*, 2009). Acrescente-se

que o tratamento é económico e fácil de administrar e a raridade da patologia não é factor limitante no actual enquadramento do rastreio de DHM por MS/MS.

5.1.4 – Monitorização bioquímica dos doentes

Em várias das doenças diagnosticadas no rastreio, fenilcetonúria, argininemia, hipermetioninémia, tirosinemias, défice no transportador da creatinina, défices em MCAD e LCHAD e MADD é possível fazer o follow-up bioquímico básico dos doentes através dos marcadores doseados no sangue do cartão. A colheita é feita pelos pais no domicílio, de acordo com a periodicidade combinada com o médico, e enviada pelo correio para a Unidade de rastreio neonatal que fornece o resultado rapidamente, permitindo ajustar a terapêutica telefonicamente. Este tipo de controlo é minimamente invasivo e confortável para o doente e para a família, pois não há necessidade de deslocação do doente ao hospital nem interferência com as actividades diárias das respectivas famílias.

5.2 - Importância do Rastreio Alargado nas Famílias

A expectativa dos pais em relação a um RN é sempre grande e a comunicação de que algo poderá não estar bem, constitui um momento de elevado stress.

O facto dos resultados anormais no rastreio serem comunicados aos casais por profissionais experientes, conjuntamente com informação apropriada sobre a situação, reduz a ansiedade dos pais e aumenta a segurança da família quanto ao futuro. Permite ainda que sejam feitas rapidamente as colheitas necessárias para confirmação do diagnóstico, seja iniciado precocemente o tratamento e que o seguimento da criança a longo prazo seja o mais adequado.

O síndrome da criança “vulnerável”, que consiste em tratar situações benignas como se fossem doenças graves (Waisbren *et al.*, 2003), descrito para a 3-metilcrotonilglicinúria e para as formas mais ligeiras de citrulinemia e acidúria isovalérica, é menos evidente com o passar dos anos pela maior segurança que os clínicos foram adquirindo no seguimento de crianças assintomáticas detectadas, com base nas alterações bioquímicas no rastreio. Mesmo na ausência de qualquer tratamento, o seguimento destes casos é importante para o conhecimento da história natural da doença e para o alerta preventivo das situações de *stress* metabólico. Estes cuidados, sem serem invasivos, podem evitar situações de morbilidade e mortalidade com intervenções mínimas. Perante o

desconhecimento da evolução a longo prazo, é mais grave a negligência que a atitude vigilante, embora tentando ser minimamente interventivo (Wilken *et al.*, 2009).

O rastreio familiar e diagnóstico dos casos assintomáticos em risco de desenvolver sintomas em qualquer idade, por vezes com mortalidade elevada, é especialmente importante e foi frequente para as doenças da β -oxidação dos ácidos gordos, em particular para o défice em MCAD. Estão em seguimento na consulta 4 casos desta DHM detectados no rastreio familiar (Nascimento *et al.*, 2009). A avaliação das famílias permitiu também reconhecer doentes sintomáticos, ainda sem diagnóstico, em seguimento noutras consultas não especializadas. Entre estes, realçamos o pai de um doente com MADD diagnosticado no rastreio, a quem foi detectada a doença aos 32 anos, após múltiplos internamentos e avaliação em várias especialidades e que está clinicamente bem, após início de tratamento (artigo 6 - resultados), e uma criança de 8 anos de idade com tirosinemia tipo III com hiperactividade e défice de atenção que está também actualmente em tratamento (dados não publicados).

O doseamento da Met no rastreio permite detectar alterações da remetilação deste aminoácido. O défice em metionina adenosiltransferase (MAT) na sua forma de transmissão dominante é particularmente frequente, estando em seguimento 12 crianças. Todas as crianças afectadas apresentam uma elevação ligeira da homocisteína total (artigo 8 - resultados). Este facto, faz com que neste défice haja um risco acrescido de acidentes trombóticos em idade jovem (Linnebank *et al.*, 2005), tal como se constatou na recolha da história familiar (Martins *et al.*, 2007). Neste estudo, foram também identificados outros familiares com a mesma alteração, estando indicada uma abordagem personalizada de acordo com os factores de risco eventualmente associados (Barié I, 2009).

Vários casos de DHM materna têm também sido detectados no rastreio (Vilarinho *et al.*, 2010). Os primeiros três casos de acidúria glutárica tipo I foram detectados na sequência da investigação de valores baixos de carnitina livre no recém-nascido e estão descritos nos resultados (Garcial *et al.*, 2008). Outros casos de doença materna têm sido identificados, quer pelos baixos níveis de carnitina (défice primário em carnitina, défice em MCAD) ou pelos valores elevados de 3-hidroxi-isovalericarnitina (C5OH) na metilcrotonilglicinúria (Schimmenti *et al.*, 2007, Leydiker *et al.*, 2011, Gibson *et al.*, 1998). Estes diagnósticos maternos foram confirmados por estudos enzimáticos e/ou moleculares e as mães encaminhadas para Centros de Tratamento de adultos, onde iniciaram terapêutica sempre que justificado.

O diagnóstico do caso índice no rastreio possibilita um aconselhamento genético e permite um diagnóstico pré-natal se necessário. Este ponto é extremamente importante para a família, uma vez que a informação permite uma atitude preventiva. É esta perspectiva que leva os pais a considerarem lícito a introdução no rastreio de doenças não tratáveis (Plass *et al.*, 2010).

5.3 - Interesse do Estudo Epidemiológico nas Novas Doenças Rastreadas

Uma das vantagens da centralização do rastreio num centro único, como sucede em Portugal, é a redução de custos por análise, dada a maior rentabilização dos equipamentos, aproveitamento de reagentes e formação do pessoal, dado o trabalho em larga escala.

Para além disso, o rastreio neonatal sistemático centralizado, permite concentrar e processar a informação de uma forma global e obter uma imagem mais real da incidência destas patologias numa população.

Os estudos moleculares efectuados a nível nacional para a leucínose (Quental *et al.*, 2008), argininemia (Cardoso *et al.*, 2001), fenilcetonúria (Riviera *et al.*, 2000), 3-HMG (Cardoso *et al.*, 2004), Cbl C (Nogueira *et al.*, 2008) e MADD (artigo 6 – resultados), permitem-nos conhecer as características da nossa população, estabelecer a correlação genótipo-fenótipo existente em algumas doenças e é importante na classificação dos subtipos de doença, na resposta aos cofatores enzimáticos e na monitorização clínica posterior. Permite-nos ainda oferecer às famílias um aconselhamento genético e um diagnóstico pré-natal. Nas doenças em que o diagnóstico pré-natal tem que ser feito por biópsia das vilosidades coriónicas ou cordocentese, como é o caso da leucínose, a identificação da mutação no caso índice permite oferecer um pré-natal menos invasivo como aconteceu com um dos nossos doentes (Quental *et al.*, 2007). Estes estudos publicados, foram feitos essencialmente nos doentes sintomáticos e agora terão que ser comparados e completados com os resultados obtidos nos doentes rastreados, de modo a obter um conhecimento mais completo da população portuguesa. Efectivamente, só o rastreio, ao permitir-nos conhecer todos os casos de uma determinada patologia, desde os mais graves que anteriormente faleciam no PNN sem diagnóstico etiológico ou com falsos diagnósticos, às formas menos graves, que por serem assintomáticas ou oligosintomáticas não eram também diagnosticadas, nos pode levar ao verdadeiro conhecimento do nosso

património genético (Wilken B, 2011). É agora importante continuar a fazer o *follow-up* criterioso, que nos permita uma análise fidedigna a longo prazo.

Na 3-HMG está bem patente a nossa herança árabe e os nossos doentes são maioritariamente portadores da mutação E37X, descrita na população árabe e no sul de Espanha (Mitchell *et al.*, 1998, Casals *et al.*, 1998). Esta associação é frequente entre nós e também nos países para onde a emigração portuguesa ocorreu, como é o caso do Brasil (Vargas *et al.*, 2007) e Canadá (Cardoso *et al.*, 2000), onde tem sido diagnosticada em crianças filhas de emigrantes açorianos.

Há patologias que têm uma maior incidência na população de etnia cigana como acontece no défice em MCAD e na leucinose. Na primeira, este predomínio acontece em todo o território português. Na segunda, este predomínio está restrito à zona sul do Tejo e está associado à mutação c.117delC no gene *BCKDHA*, que também é frequente no sul de Espanha (Quental *et al.*, 2008).

Há doenças como a MAT e a acidúria metilmalónica por défice da Cbl C e D, que têm uma grande incidência, numa área muito restrita. Na região norte todos os casos de acidúria metilmalónica por défice da Cbl C são oriundos dos distritos de Porto e Braga e todos os de MAT são dos conselhos de Mirandela, Valpaços e Macedo de Cavaleiros. Estas situações, podem talvez ser explicadas pelo isolamento e consanguinidade nas pequenas comunidades ou eventual efeito fundador (artigo 8 – resultados).

Além da importância epidemiológica e da utilidade preditiva e preventiva, o estudo molecular é fundamental na nova medicina molecular personalizada. A avaliação estrutural e funcional ao mostrar como a mutação interfere na acção da enzima alterada permite procurar terapêuticas génicas e farmacológicas (vitaminas, cofactores e substâncias sintéticas), no sentido de minimizar o efeito da mutação na função enzimática. Foram efectuados estudos de análise estrutural, um para a leucinose e outro para a MADD que estão incluídos nos resultados (artigos 6 e 10 dos resultados).

5.4 - Alargamento do Rastreio a Novas Patologias

A nível mundial, o número de doenças rastreadas varia de país para país, e no mesmo país ainda conforme as províncias, consoante o painel aprovado para os mesmos. Em muitos casos, os painéis não estão fechados, pelo que mais patologias podem ser incluídas ou retiradas em função dos resultados encontrados e de uma reflexão cuidada sobre os mesmos, bem como da evolução, não só técnica mas também do conhecimento que vamos adquirindo sobre as DHM e comportamento dos seus biomarcadores no

período neonatal. Assim, por exemplo, a 3HMG foi retirada do painel do rastreio alemão e o rastreio da acidúria glutárica I foi adicionado ao painel inglês. Também no nosso país, na sequência do diagnóstico de vários casos de déficit em SCHAD (Martins *et al.*, 2011) e do doseamento retrospectivo das acilcarnitinas na ficha de DP ter mostrado a presença do marcador C4OH, foi possível diagnosticar um caso no rastreio e ponderar incluir esta patologia no nosso painel.

A realização de estudos de custo benefício analisando cada doença por si mas também globalmente já mostrou a vantagem em países que rastreiam em simultâneo mais de 20 doenças como é o caso da Austrália e Canadá (Norman *et al.*, 2009 e Cipriano *et al.*, 2010).

Há doenças metabólicas tratáveis, cuja frequência é comparativamente elevada, mas que não é possível rastrear por MS/MS porque não existe um marcador de rastreio que seja fidedigno. É o caso do déficit em ornitina carbamiltransferase, em que a diminuição da citrulina está associada a uma percentagem enorme de falsos negativos que não é compatível com a inclusão no DP, com os marcadores actualmente disponíveis (Cavicchi *et al.*, 2009). Estas doenças colocam desafios no sentido da descoberta de novas abordagens que permitam a sua inclusão no futuro.

Nas doenças para as quais não existe um tratamento, é relativamente consensual a sua não inclusão nos painéis de rastreio. Há porém quem advogue que a informação sobre a sua existência seria útil para a criança, evitando manobras de diagnóstico mais invasivas para esclarecer a etiologia, além de permitir à família um conhecimento e um aconselhamento genético atempado, evitando outros nascimentos de mais filhos com o mesmo EIM.

VI. CONCLUSÕES

Novas oportunidades representam novos desafios e este princípio também se aplica no alargamento do rastreio neonatal às novas patologias. É utópico pensar-se em iniciar um programa de rastreio, apenas quando há a certeza de quais os benefícios que se vão obter. Na realidade parte-se de um planeamento que visa atingir determinadas metas e simultaneamente avaliar os benefícios associados. Esta prática, exige um *follow-up* longo e cuidado e a certeza de que o tratamento é efectuado da melhor forma e por profissionais experientes. Prova da necessidade de um seguimento ao longo de vários anos são os desafios e imprevistos com que se tem deparado o rastreio da fenilcetonúria, que é efectuado no nosso país há mais de três décadas.

A utilização da MS/MS permite um diagnóstico mais rápido e menos invasivo que as metodologias clássicas e é importante para conseguir um diagnóstico, que seja tanto quanto possível, pré-sintomático. Podemos considerar dois tipos de benefício, para os doentes que advêm desta intervenção: (i) aquele que é obtido a curto prazo e (ii) aquele que se vai reflectir a longo prazo, na qualidade de vida dos doentes com DHM.

A curto prazo, concluímos que o rastreio é vantajoso nos casos de leucínose, argininemia e défice em MCAD. Na leucínose, porque o diagnóstico mais rápido reduz o tempo a que o sistema nervoso central fica exposto à toxicidade da Leu e diminui assim a probabilidade de sequelas neurológicas futuras. Na argininemia o tratamento iniciado precocemente evita as lesões agudas irreversíveis, causadas pela toxicidade da amónia nas formas de apresentação neonatal, e as lesões crónicas e progressivas causadas essencialmente pelos compostos guanidínicos nas formas infantis. Já no défice em MCAD a redução dramática da mortalidade e morbilidade, associado ao facto de ser uma doença relativamente frequente e ter um tratamento minimamente invasivo e pouco dispendioso, fazem dela a doença rastreável por excelência.

Ainda é cedo para comparações generalizadas de evolução a longo prazo. No entanto, verifica-se que o seguimento de longa duração é fundamental na validação dos ganhos do rastreio alargado e na decisão futura das patologias para as quais os benefícios são efectivos. O uso de protocolos de seguimento e tratamento que contemplem o actual conhecimento da doença são fundamentais para ter a certeza que nenhum aspecto é descurado.

Ao longo do período de tempo em que decorreu o presente estudo, foram feitos menos diagnósticos sintomáticos de DHM do que nos anos anteriores, como seria de esperar, mas também o número de internamentos por descompensação aguda está a diminuir, mostrando que o rastreio está a diminuir as crises de descompensação e por conseguinte as sequelas devidas ao período mais ou menos arrastado que mediava entre a crise

inaugural e a instituição do tratamento. Com a detecção da patologia através do rastreio neonatal, a qualquer momento que surja a primeira crise segue-se a instituição pronta do tratamento adequado, o que tem inúmeros benefícios para o doente, para a família e para os serviços de saúde. Os casos que beneficiaram de rastreio familiar usufruíram indirectamente do programa pois, apesar de não terem feito rastreio alargado, beneficiaram de um diagnóstico atempado que de outra forma poderia ter sido feito já numa fase de grave atingimento neurológico.

Acresce-se que o rastreio permitiu identificar patologias que não tinham sido previamente diagnosticadas na nossa população, como a acidúria isovalérica, 3-metilcrotonilglicinúria e o défice em VLCAD. A última, beneficiou de metodologia apropriada ao estudo das acilcarnitinas, que não estava anteriormente disponível. Quanto às duas outras DHM, são situações de fenótipos pouco severos que poderiam passar despercebidos e nunca ser sujeitas a estudo metabólico. Assim, um conhecimento mais aprofundado das patologias metabólicas na população portuguesa e da sua epidemiologia, tem sido conseguida na sequência do rastreio alargado, permitindo o reconhecimento de formas ligeiras associadas a mutações específicas. Foi também possível aprofundar o conhecimento de várias patologias, nomeadamente da argininemia, défice em SCHAD e MADD, cujo interesse científico foi reconhecido com a publicação dos respectivos artigos em revistas internacionais indexadas.

O facto das DHM serem patologias raras, reveste os estudos multicêntricos e a colaboração em bases de dados internacionais de uma importância fundamental. Vários dos artigos que fazem parte dos resultados desta dissertação, foram elaborados em colaboração com outros centros e dão-nos uma perspectiva nacional das patologias.

Fica-nos a certeza de que com o painel actualmente disponível no rastreio, estão cobertas grande parte das doenças do metabolismo intermediário no nosso país. A comunicação do resultado anómalo à família, por parte de um clínico experiente no diagnóstico e tratamento destas patologias, o acompanhamento da equipa multidisciplinar, o carácter gratuito da medicação/alimentação, o aconselhamento e estudo familiar quer a nível bioquímico quer genético e a possibilidade de diagnóstico pré-natal, fazem desta intervenção integrada na área da pediatria, uma mais-valia para os doentes metabólicos portugueses, ao nível do melhor que se disponibiliza no continente europeu.

VII. BIBLIOGRAFIA

A bibliografia aqui referida é a que está mencionada na introdução e discussão. A bibliografia dos resultados está incluída nos respectivos manuscritos.

Irwin, Notricasin HR, Fleming W Blood phenylalanine levels of newborn infants. A routine screening program for the hospital newborn nursery. *Calif Med.* 1964 ;101:331-3.

Agarwal RK (2008). Routine immunization, India's Achilles heel. *Indian Pediatr* 45:625-8.

Allard P, Grenier A, Korson MS, Zytovicz TH (2004). Newborn screening for hepatorenal tyrosinemia by tandem mass spectrometry: analysis of succinylacetone extracted from dried blood spots. *Clin Biochem* 37(11):1010-5.

American Academy of Pediatrics (2000). Serving the family from birth to the medical home. Newborn screening: a blue print for the future. *Pediatrics* 106: 389-42.

Anderson PJ, Leuzzi V (2010). White matter pathology in phenylketonuria. *Mol. Genet. Metab* 99:S3 – S9.

Angle B, Burton B (2008). Risk of sudden death and acute life-threatening events in patients with glutaric aciduria type II. *Molec Genet Metab* 93:36-9.

Bachmann C (2003). Outcome and survival of 88 patients with urea cycle disorders: a retrospective evaluation. *Eur J Pediatr* 162:410-6.

Bain BJ (2009). Neonatal/newborn haemoglobinopathy screening in Europe and Africa. *J Clin Pathol* 62(1):53-6.

Barić I (2009). Inherited disorders in the conversion of methionine to homocysteine. *J Inherit Metab Dis* 32(4):459-71.

Baumgartner M and Suormala T (2006). Biotin responsive disorders. In: Fernandes J, Saudubray JM, van den Berghe G, editors. *Inborn metabolic diseases – diagnosis and treatment.* 3^a Ed . Berlin Springer 331-9.

Bhattacharya K, Khalili V, Wiley V, Carpenter K, Wilcken B (2006). Newborn screening may fail to identify intermediate forms of maple syrup urine disease. *J Inherit Metab Dis* 29(4):586.

Bickel H, Gerrard J, Hickmans E (1953). Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. *Lancet* 2:812-3.

Blau N, Duran M, Blaskovics M, Gibson M, editors (2003). *Laboratory diagnosis of metabolic diseases.* 2nd ed Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Bodamer OA, Hoffmann GF, Linder M (2007). Expanded newborn screening in Europe 2007. *Inherit. Metab* 30:439-44.

Botkin JR, Clayton EW, Fost NC, Burke W, Murray TH, Baily MA, et.al (2006). Newborn screening technology: proceed with caution. *Pediatrics* 117(5):1793-9.

Braga AC, Vilarinho L, Ferreira E, Rocha H (1997). Hyperargininemia presenting as persistent neonatal jaundice and hepatic cirrhosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 24:218-21.

- Brusilow SW, Horwich AL (2001). Urea cycle enzymes. In: Scriver Ch R, Scriver ChR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler KW, Vogelstien B, editors. The metabolic and molecular basis of inherited disease. 8th edition. Mc Graw-Hill eds New York. 1909-63.
- Buist NR (1993). Concluding Remarks. New horizons in neonatal screening. Em Fariaux JP, Dhout JL (editors). Proceedings of the 9th Meeting of the International Society of Neonatal Screening 383-86.
- Campistol J, Arrelano M, Poo P, Escofet C, Pérez P, Vilasseca MA (2003). Embriopatía por fenilcetonuria maternal. Una causa de retard mental poco diagnosticada. Revision de 8 observaciones. Na Esp Ped 112:1534-6.
- Cardoso M.L, Martins E, Vasconcelos R, Vilarinho L, Rocha J (2001). Identification of a novel R21X mutation in the liver-type arginase gene (ARG1) in four Portuguese patients with argininemia. Hum Mutat 14: 355-6
- Cardoso ML, Leão E, Rodrigues E, Martins E, Vilarinho L (2000). Aciduria 3-hidroxi-3-metilglutárica na população portuguesa. Arq Med 14 202-6.
- Cardoso ML, Rodrigues MR, Leão E, Martins E, Diogo L, Rodrigues E et al (2004). The E37X is a common HMGCL mutation in Portuguese patients with 3-hydroxy-3-methylglutáric CoA lyase deficiency. Mol Gen Metab 82:334-8.
- Casale CH, Casals N, Pié J, Zapater N, Pérez-Cerdá C, Merinero B, et al (1998). A nonsense mutation in the exon 2 of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase (HL) gene producing three mature mRNAs is the main cause of 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria in European Mediterranean patients. Arch Biochem Biophys 349(1):129-37.
- Cavedon CT, Bourdoux P, Mertens K, Van Thi HV, Herremans N, de Laet C, et al (2005). Age-related variations in acylcarnitine and free carnitine concentrations measured by tandem mass spectrometry. Clin Chem 51(4):745-52.
- Cavicchi C, Malvagía S, la Marca G, Gasperini S, Donati MA, Zammarchi E, et al (2009). Hypocitrullinemia in expanded newborn screening by LC-MS/MS is not a reliable marker for ornithine transcarbamylase deficiency. J Pharm Biomed Anal 49(5):1292-5.
- Cederbaum S, Crombez EA (2010). Arginase Deficiency. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, editors. GeneReviews [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; (1993-.2004 Oct 21 [updated 2010 Oct 5].
- Cederbaum SD, Yu H, Grody W (2004). Arginases I and II: do their functions overlap? Mol Genet Metab 81: 538-44.
- Chace DH, Kalas TA, Naylor EW (2003). Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. Clin Chem 49(11):1797-17.
- Chakrapani A, Holme E (2006). Disorders of tyrosine metabolism. In: Fernandes J, Saudubray JM, van den Berghe G, Walter JH editors. Inborn metabolic diseases: diagnosis and treatment. Berlin: Springer 235-43.
- Chance DH, DiPerna JC, Naylor EW (1999). Laboratory integration and utilization of tandem mass spectrometry in neonatal screening: a model for the clinical mass spectrometry in the next millennium. Acta Paediatr Suppl 432:47-7.
- Chien YH, Chiang SC, Huang A, Hwu WL (2005). Spectrum of hypermethioninemia in neonatal screening. Early Hum Dev 81(6):529-33.
- Cipriano LE, Rupa CA, Zaric GS (2007). The cost-effectiveness of expanding newborn screening for up to 21 inherited metabolic disorders using tandem mass spectrometry: results from a decision-analytic model. Value Health 10(2):83-97.

- Cocho JA, Castiñeiras DE, Bóveda MD, Colón Mejeras C, Fraga Bermúdez JM (2010). Cribado neonatal de los errores congénitos del metabolismo. In Sanjurjo P, Baldellou A, editors. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. 3ª ed. Madrid: Ergon; 43-62.
- Connock M, Juarez-Garcia A, Frew E, Mans A, Dretzke J, Fry-Smith A, Moore D (2006). A systematic review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of enzyme replacement therapies for Fabry's disease and mucopolysaccharidosis type 1. *Health Technol Assess* 10(20):iii-iv, ix-113.
- Costello PM, Beasley MG, Tillotson SL, Smith I (1994). Intelligence in mild atypical phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 153: 260-3.
- Couce ML, Fraga JM (2006). Homocistinuria y alteraciones del metabolismo de folate e vitamina B12. In : P. Sanjurjo, A. Baldellou, editors. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. 4ª ed. Madrid: Ergon; 357-75.
- de Baulny HO, Benoist JF, Rigal O, Touati G, Rabier D, Saudubray JM (2005). Methylmalonic and propionic acidemias: management and outcome. *J Inher Metab Dis* 28(3):415-23.
- Deignan JL, De Deyn PP, Cederbaum SD, Fuchshuber A, Roth B, Gsell W, Marescau B (2010). Guanidino compound levels in blood, cerebrospinal fluid, and post-mortem brain material of patients with argininemia. *Mol Genet Metab* 100 (Suppl 1):S31-6.
- Devun AMA, Hajipour L, Gholkar A, , Fernández H, Armes V, Morris AAM (2004). Cerebral edema associated with betaine treatment in classical homocystinuria. *J Pediatr* 144: 545-8.
- Dhondt JL (2010). Expanded newborn screening: social and ethical issues. *J. Inher. Metab. Dis* 33(Suppl 2): S211-7.
- Di Candia S, Gessi A, Pepe G, Sogno Valin P, Mangano E, Chiumello G et.al.(2009) Identification of a diffuse forme of hyperinsulinemic hypoglycemia by 18-fluoro-L-3,4 dihydroxyphenylalanine positron emission tomography/CT in a patient carrying a novel mutation of the HADH gene. *Eur J Endocrinol* 160: 1019-23.
- Dias C, de la Vega A, Jara P, Tirosinemias. In Sanjurjo P, Baldellou A, editors (2010). Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. 3ª ed. Madrid: Ergon; 449-54.
- Dionisi-Vici C, Deodato F, Röschinger W, Rhead W, Wilcken B (2010). 'Classical' organic acidurias, propionic aciduria, methylmalonic aciduria and isovaleric aciduria: long-term outcome and effects of expanded newborn screening using tandem mass spectrometry. *J Inher Metab Dis* 29(23):383-9.
- Donlon J, Levy H, Scriver CR (2008). Hyperphenylalaninemia. Phenylalanine hydroxylase deficiency. In Valle D, Beaudet A, Vogelstein B, Sly WS, Ballabio A, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw Hill; 77, <http://genetics.accessmedicine.com>.
- Dussault JH, Laberge C (1973). Thyroxine (T4) determination by radioimmunological method in dried blood eluate: new diagnostic method of neonatal hypothyroidism?. *Union Med Can* 102(10):2062-4.
- Edwards RL, Moseley K, Watanabe Y, Wong LJ, Ottina J, Yano S (2009). Long-term neurodevelopmental effects of early detection and treatment in a 6-year-old patient with argininaemia diagnosed by newborn screening. *J Inher Metab Dis* 27. DOI 10.1007/s10545-009-1148-2.
- Fernandes J, Saudubray JM, van den Berghe G, Walter JH editors (2006). *Inborn metabolic diseases: diagnosis and treatment*. 4th ed. Berlin Heidelberg: Springer.
- Fidalgo A, Eusébio F, Tasso T, Pedroso H, Tavares de Almeida I, Cabral A (1997). Hiperargininemia. A propósito de 3 casos clínicos. *Acta Pediatr Port* 28:231-5.
- Folling I (1994). The discovery of phenylketonuria. *Acta Paediatr Suppl* 407:4-10.

- Fowler B, Leonard JV, Baumgartner MR (2008). Causes of and diagnostic approach to methylmalonic acidurias. *J Inher Metab Dis* 31(3):350-60.
- Gan-Schreier H, Kebbewar M, Fang-Hoffmann J, Wilrich J, Abdoh G, Ben-Omran T, et al (2010). Newborn population screening for classic homocystinuria by determination of total homocysteine from Guthrie cards. *J Pediatr* 2010 Mar;156(3):427-32.
- Garcia P, Martins E, Diogo L, Rocha H, Marcão A, Gaspar E, Almeida M, Vaz C, Soares I, Barbot C, Vilarinho L (2008). Outcome of three cases of untreated maternal glutaric aciduria type I. *Eur J Pediatr* 167:569-73.
- Garrod AE (1908). The Croonian Lectures on inborn errors of metabolism. Lecture II. *Lancet* 2:73-79.
- Gibson, Q. H. (1948). The reduction of methaemoglobin in red blood cells and studies on the cause of idiopathic methaemoglobinaemia. *Biochem J.* 42: 13-23s1948.
- Gibson KM, Breuer J, NyhanWL (1948). 3-Hydroxy-3-methylglutaric CoA lyase deficiency: review of 18 reported patients. *Eur J Pediatr* 148:180-6.
- Green A, Pollitt R.J (1999). Population newborn screening for inherited metabolic disease: current UK perspectives. *J. Inher.Metab.Dis* 22:572-9.
- Griffiths WJ, Jhonson PA, Liu S, Rai DK, WangY (2001). Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. *Biochem J* 355:545-61.
- Guthrie R, Susi A (1963). A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 32:318-43.
- Haas H, Chaplin M, Joy P, Wiley V, Black C, Wilcken B (2007). Healthcare use and costs of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in Australia: screening versus no screening. *J. Pediatr* 108-10.
- Hörster F, Garbade SF, Zwickler T, Aydin HI, Bodamer OA, Burlina AB, et al (2009). Prediction of outcome in isolated methylmalonic acidurias: combined use of clinical and biochemical parameters. *J Inher Metab Dis* 32(6):762-3.
- Howell RR, Engelson G (2007). Structures for clinical follow-up:newborn screening. *J. Inherit. Metab. Dis* 30: 600-5.
- Iafolla AK, Thompson RJ Jr, Roe CR (1994). Medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: clinical course in 120 affected children. *J Pediatr* 124(3):409-15.
- James PM, Levy HL (2006). The clinical aspects and importance of newborn screening follow-up. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 12:246-54.
- Joubert Phi, Touati G, Lesage F, Dupic L, Tucci M, Saudubray JM. et al (2007). Impact of inborn errors of metabolism on admission and mortality in a pediatric intensive care *Eur J Pediatr* 166:461-5.
- Kluijtmans LAJ, Boers GHL, Kraus JP, van den Heuvel LP, Cruysberg JR, Trijbels FG, et al (1999). The molecular basis of cystathionine beta-synthase deficiency in Dutch patients with homocystinuria: effect of CBS genotype on biochemical and clinical phenotype and on response to treatment. *AM J Hum Genet* 36: 372-79.
- Knerr I, Weinhold N, Vockley J, Gibson KM (2011). Advances and challenges in the treatment of branched-chain amino/keto acid metabolic defects. *J Inher Metab Dis* DOI 10.1007/s10545-010-9269-1.

- Kölker S, Christensen E, Leonard JV, Greenberg CR, Boneh A, Burlina AB, et al (2011). Diagnosis and management of glutaric aciduria type I - revised recommendations. *J Inher Metab Dis* 23. [Epub ahead of print].
- Kure S, Hou DC, Ohura T, Iwamoto H, Suzuki S, Sugiyama N, et al (1999). Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Pediatr* 135(3):375-8.
- Laberge C (1994). Public health rationale for newborn screening and civic values. In: Farriaux JP, Dhont JL, editors. *New horizons in neonatal screening*. Excerpta Médica. Elsevier Science. Amsterdam 24-5.
- le Roux C, E Murphy, Hallam P, Lilburn M, Orlowska D, Lee P (2011). Neuropsychometric outcome predictors for adults with maple syrup urine disease. *J Inher Metab Dis* 29:201-2.
- Leydiker KB, Neidich JA, Lorey F, Barr EM, Puckett RL, Lobo RM, et al (2011). Maternal medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency identified by newborn screening. *Mol Genet Metab*. 103(1):92-5.
- Leonard J, Dezateux C, Screening for inherited metabolic disease in newborn infants using tandem mass spectrometry. *BMJ* 2002; 354: 4-5.
- Leonard J, Vijayaraghavan S, Walter J (2003). The impact of screening for propionic and methylmalonic acidemia. *Eur. J. Pediatr* 162 S21-S24.
- Leonard JV, Morris AAM (2006). Diagnosis and early management of inborn errors of metabolism presenting around the time of birth. *Acta Paediatrica* 95: 6-14.
- Leonard JV (2006). Komrower lecture: Treatment of inborn errors of metabolism: a review. *J Inher Metab Dis* 29:275-8.
- Liebl B, Niennstiel-Ratzel U, Roscher A, von Kries R (2003). Data required for the evaluation of newborn screening programmes. *Eur J Pediatr* 162:S57-S61.
- Lindner M, Ho S, Kölker S, Abdoh G, Hoffmann GF, Burgard P (2008). Newborn screening for methylmalonic acidurias--optimization by statistical parameter combination. *J Inher Metab Dis* 31(3):379-85.
- Linnebank M, Lagler F, Muntau AC, Röschinger W, Olgemöller B, Fowler B, Koch HG (2005). Methionine adenosyltransferase (MAT) I/III deficiency with concurrent hyperhomocysteinaemia: two novel cases. *J Inher Metab Dis* 28(6):1167-8.
- Loehr JP, Goodman SI, Frerman FE (1990). Glutaric acidemia type II: heterogeneity of clinical and biochemical phenotypes. *Pediatr. Res* 27:311-15.
- Maestri NE, Hauser E, Bartholomew D, Brusilow SW (1991). Prospective treatment of urea cycle disorders. *J Pediatr* 119:923-8.
- Magalhães J, Osório R (1984). O Programa Nacional de Diagnóstico Precoce. *J. Medico* 2080:322-5.
- Magalhães J, Osório R, Alves J, Soares P (1986). Le dépistage de la phénylcétonurie et l'hypothyroïdie congénitale au Portugal. *Dépeche N/S* :40-7.
- Marques J, Ramos A, Vieira A, Rocha H, Bennett M, Vilarinho L, (2009). Short-chain-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency (SCHAD): first case in the world detected by tandem-mass. VI Simposio Internacional da SPDM. Curia
- Martinelli D, Deodato F, Dionisi-Vici C (2011). Cobalamin C defect: natural history, pathophysiology, and treatment. *J Inher Metab Dis* 34(1):127-35.

- Martinez M, García M (2010). Hiperfenilalaninemias por déficit de cofactor BH4. In: Sanjurjo P, Baldellou A, editors. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. 3ª ed. Madrid: Ergon; 441-8.
- Martins E (2008). Homocistinuria – aspectos clínicos. Reunião da SPDM. Porto
- Martins E, Bandeira A, Rocha H, Marcão A, Vilarinho L (2009). Benefícios do rastreio neonatal nas doenças da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos. *Nascer e Crescer* 18:246-51.
- Martins E, Barbot C, Cardoso ML, Silva E, Vilarinho L (2008). Avaliação da efectividade do tratamento das doenças metabólicas tipo intoxicação diagnosticadas no período sintomático. *Acta Pediatr Por* 39:233-9.
- Martins E, Cardoso ML, Rodrigues E, Barbot C, Ramos A, Bennett MJ, Leão Teles E, Vilarinho L (2011). Short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: the clinical relevance of an early diagnosis and report of four new cases. *J Inherit Metab Dis* 34: 835-42.
- Martins E, Costa A, Silva E, Medina M, Cardoso ML, Vianey-Saban C, et al (1996). Lethal dilated cardiomyopathy due to long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 19(3):373-4.
- Martins E, Eusébio F, Marcão A, Rocha H, Vilarinho L (2007). Five families with hypermethioninemia associated with the dominantly inherited methionine adenosyltransferase I/III form deficiency. *J Inherit Metab Dis* 30: (supl1) 6.
- Martins E, Santos Silva E, Vilarinho S., JM Saudubray, Vilarinho L (2010). Neonatal cholestasis: an uncommon presentation of hyperargininemia. *J Inherit Metab Dis* DOI 10.1007/s10545-010-9263-7.
- Martins E, Santos Silva E, Cardoso ML, Barbot C, Medina M, Vilarinho L (2005). Follow-up of two cases of hyperargininemia after liver transplantation. *J Inherit Metab Dis* 28:64.
- Millington DS, Kodo N, Norwood DL, Roe CR (1990). Tandem mass spectrometry: a new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism. *J. Inherit. Metab. Dis* 13:321-4.
- Millington DS, Sista R, Eckhardt A, Rouse J, Bali D, Goldberg R, et al (2010). Digital microfluidics: a future technology in the newborn screening laboratory? *Semin Perinatol* 34(2):163-9.
- Mitchell GA, Ozand PT, Robert MF, Ashmarina L, Roberts J, Gibson KM, et al (1998). HMG CoA lyase deficiency: identification of five causal point mutations in codons 41 and 42, including a frequent Saudi Arabian mutation, R41Q. *Am J Hum Genet* 62(2):295-300.
- Nagasaka H, Tsukahara H, Takatani T, Sanayama Y, Takayanagi M, Ohura T, et al (2011). Cross-sectional study of bone metabolism with nutrition in adult classical phenylketonuric patients diagnosed by neonatal screening. *J Bone Miner Metab* DOI: 10.1007/s00774-011-0276-6.
- Nascimento P, Bandeira A, Vilarinho L, Martins E (2009). MCAD diagnóstico pré e pós sintomático. *Nascer e Crescer* 18(3):S224
- Nennstiel-Ratzel U, Arenz S, Maier E, Knerr I, Baumkötter J, Röschinger W, et al (2005). Reduced incidence of severe metabolic crisis or death in children with medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency homozygous for c.985A>G identified by neonatal screening. *Mol Genet Metab* 85:157-9.
- Nogueira C, Aiello C, Cerone R, Martins E, Caruso U, Moroni I, et al (2008). Spectrum of MMACHC mutations in Italian and Portuguese patients with combined methylmalonic aciduria and homocystinuria, cblC type. *Mol Genet Metab* 93(4):475-80.

- Norman R, Haas M, Chaplin M, Joy P, Wilcken B (2009). Economic evaluation of tandem mass spectrometry newborn screening in Australia. *Pediatrics* 123(2):451-7.
- Ohkuma A, Noguchi S, Sugie H, Malicdan MC, Fukuda T, Shimazu K et al (2009). Clinical and genetic analysis of lipid storage myopathies. *Muscle Nerve* 39:333-42.
- Padilla CD, Therrell BL (2007). Newborn screening in the Asia Pacific region. *J Inherit Metab Dis* 30(4):490-506.
- Pàmpols Ros T (2010). Diagnóstico prenatal de las enfermedades metabólicas hereditarias. In: Sanjurjo P, Baldellou A, editors. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. 3ª ed. Madrid: Ergon 25-42.
- Pandor A, Eastham J, Beberley C, Chilcott J, Painsley S (2004). Clinical effectiveness and cost-effectiveness of neonatal screening for inborn errors of metabolism using tandem mass spectrometry: a systematic review. *Health Technol Assess* 12 (8): 1-150.
- Partington MW, Anderson RM (1964). Case-finding in phenylketonuria. I. Report of a survey by the college of general practice of Canada. *Can Med Assoc J* 6;90:1312-4.
- Paus T, Zigedenbos A, Worsley K, Collins DL, Biumenthal J, Giedd JN, et al (1999). Structural maturation of neural pathways in children and adolescents: in vivo study. *Science* 283:1908-11.
- Peña L, Sanjurjo P (2010). Alteraciones de la β -oxidación y del sistema carnitina. In Sanjurjo P, Baldellou A, editors. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. 3ª ed. Madrid: Ergon 539-62.
- Penchaszadeh VD, Christianson AC, Guigliani R, Boulyjenkov V, Katz M (2010). Services for the prevention and management of genetic disorders and birth defects in developing countries. *Community Genet* 2; 196-201.
- Plass AM, van El CG, Pieters T, Cornel MC (2010). Neonatal screening for treatable and untreatable disorders: prospective parents' opinions. *Pediatrics* 125(1):e99-106.
- Pollit R J (2007). Introducing new screens: why are we all doing different things? *J. Inherit. Metab. Dis* 30: 243-249.
- Quental S, Macedo-Ribeiro S, Matos R, Vilarinho L, Martins E, Teles EL, e tal (2008). Molecular and structural analyses of maple syrup urine disease and identification of a founder mutation in a Portuguese Gypsy community. *Mol Genet Metab* 94(2):148-56.
- Quental S, Martins E, Vilarinho L, Amorim A, João Prata M (2007). Maple syrup urine disease due to a new large deletion at BCKDHA caused by non-homologous recombination. *J Inherit Metab Dis* DOI 10.1007/s10545-008-1046z.
- Quental S, Vilarinho L, Martins E, Teles EL, Rodrigues E, Diogo L, (2010). Incidence of maple syrup urine disease in Portugal. *Mol Genet Metab* 100(4):385-7.
- Rashed MS, Ozad PT, Bucknall MP, Little D (1995). Diagnosis of inborn errors of metabolism from blood spots by acylcarnitines and aminoacids profiling using automated eletrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 38: 324-31.
- Rivera I, Cabral A, Almeida A, Leandro P, Carmona C, Eusebio F, Tasso T, Vilarinho L, Martins E, et al (2000). The correlation of genotype and phenotype in Portuguese hyperphenylalaninemic patients. *Mol Gen Metab* 69:195-203.
- Rocha J, Martins E, Cabral A, Almeida MF (2007). Consenso para o tratamento nutricional da Leucinoze. *Acta.Pediatr Por* 38: 120-128.

- Sanjurjo Crespo P, Aquilino L, Aldámiz-Echevarría L (2001). Enfermedades congénitas del metabolismo: generalidades, grupos clínicos y algoritmos diagnósticos. In Sanjurjo P, Baldellou A. Eds. *Enfermedades Metabólicas Hereditarias*. 1ª ed. Madrid: Ediciones Ergon SA; 29-51.
- Sanjurjo P (2007). Del sintoma clínico al diagnóstico molecular. *Errors inatos del metabolismo: bases para el pediatra general*. Eds Temis Pharma, SL Barcelona.
- Santos Silva E, Martins E, Cardoso ML, Barbot C, Vilarinho L, Medina M (2001). Liver transplantation in a case of argininemia. *J Inherit Metab Dis* 24:885-7.
- Saudubray JM, Sedel F, Walter JH (2006). Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: an introduction. *J Inherit Metab Dis* 29:261-74.
- Saudubray JM, Martin D, De Lonlay P, Touaty G, Poggi-Travert F et al (1999). Recognition and management of fatty acid oxidation defects: A series of 107 patients. *J. Inherit. Metab. Dis* 22: 488-502.
- Schiff M, Benoist JF, Cardoso ML, Elmaleh-Bergès M, Forey P, Santiago J et al (2009) Early-onset hyperargininemia: A severe disorder? *J Inherit Metab Dis*. Apr 20 Online DOI 10.1007/s10545-009-1137-5.
- Schiff M, Froissart R, Olsen RK, Acquaviva C, Vianey-Saban C (2006). Electron transfer flavoprotein deficiency: functional and molecular aspects. *Mol Genet Metab*: 88:29: 153-158.
- Scriver ChR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. 8th edition. Mc Graw-Hill eds New York 2001.
- Shekhawat P.S, Matern D, Strauss AW (2005). Fetal fatty acid disorders, their effect on maternal health and neonatal outcome: impact of expanded newborn screening on their diagnosis and management. *Pediatr. Research* 57:78R-88R.
- Simon E, Fingerhut R, Baumkötter J, Konstantopoulou V, Ratschmann R, Wendel U (2006). Maple syrup urine disease: favourable effect of early diagnosis by newborn screening on the neonatal course of the disease. *J Inherit Metab Dis* 29(4):532-7.
- Smith I, Knowles J (2000). Behaviour in early treated phenylketonuria: a systematic review. *Eur J. Pediatr* 159: S89 - 93.
- Smith I (1994). Treatment of phenylalanine hydroxylase deficiency. *Acta Pediatr* 407: 60-7.
- Spiekerkoetter U, Lindner M, Santer R, Grotzke M, Baumgartner MR, Boehles H, et al (2009). Management and outcome in 75 individuals with long-chain fatty acid oxidation defects: results from a workshop. *J Inherit. Metab* 1125-9.
- Stanley C, Bennett M, Mayatepek (2006). Disorders of mitochondrial fatty acid oxidation and related metabolic pathways in Fernandes J, Saudubray JM, van den Berghe G, *Inborn metabolic diseases – diagnosis and treatment*. 4ª Ed . Berlin Springer 175-196.
- Tarini BA, Christakis DA, Welch HG (2006). State newborn screening in the tandem mass spectrometry era: more tests, more false-positive results. *Pediatrics*. 118(2):448-56.
- Therrell BL (2001). US newborn screening policy dilemmas for the twenty-first century. *Mol Genet Metab* 74: 64-74.
- Tyni T, Palotie A, Viinikka L, Valanne L, Salo MK, von Döbeln U, et al (1997). Long-chain 3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency with the G1528C mutation: clinical presentation of thirteen patients. *J Pediatr* 130(1):67-76.

- Vallance H, Sirrs S, Bamforth F, Stockler-Ipsiroglu S (2008). In response to 'Newborn screening in North America' (Therrell and Adams (2007) *J Inherit Metab Dis* 30:447-465). *J Inherit Metab Dis* 31(6):777-8.
- van der Hilst CS, Derks TH, Reijngoud DJ, Smitt GP, TenVergert EM (2007). Cost-effectiveness of neonatal screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: the homogeneous population of the Netherlands. *J. Pediatr* 115-20.
- Vargas CR, Sitta A, Schmitt G, Ferreira GC, Cardoso ML, Coelho D, et al (2007). Incidence of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase (HL) deficiency in Brazil, South America. *J Inherit Metab Dis* DOI: 10.1007/s10545-007-0756-y
- Vaz Osório R (2004). 25 anos de história do rastreio neonatal em Portugal. Mesa Redonda. XL Conferencias de Genética.
- Vaz Osório R, Vilarinho L, Pires Soares J, Almeida M, Carmona C, Martins E (1999). Programa Nacional de Diagnóstico Precoce: 20 anos de rastreio neonatal. *Arq Med* 1999; 13:163-168.
- Vilarinho L, Rocha H, Sousa C et al (2010) Four years of expanded newborn screening in Portugal with tandem mass spectrometry. *J Inherit Metab Dis* DOI 10.1007/s510545-010-9048-z.
- Vilarinho L, Senra V, Barbosa C, Parvy P, Rabier D, Kamoun P (1990). A new case of argininaemia without spastic diplegia in a Portuguese male. *J Inherit Metab Dis* 13:751-2.
- Vockley J (2008). Glutaric aciduria type 2 and newborn screening: Comentario. *Molec Genet Metab* 93:5-6.
- Waisbren S, Read C, Ampola M, Brewster T, Demmer L, Greenstein R et al (2002). Newborn screening compared to clinical identification of biochemical genetic disorders. *J. Inherit. Metab. Dis* 25: 599-560.
- Waisbren SE, Albers S, Amato S, Ampola M, Brewster TG, Demmer L, et al (2003). Effect of expanded newborn screening for biochemical genetic disorders on child outcomes and parental stress. *JAMA* 290(19):2564-72.
- Watkins D, Rosenblatt DS (2011). Inborn errors of cobalamin absorption and metabolism. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 15;157(1):33-44.
- Weisfeld-Adams JD, Morrissey MA, Kirmse BM, Salveson BR, Wasserstein MP, McGuire PJ, et al Newborn screening and early biochemical follow-up in combined methylmalonic aciduria and homocystinuria, cblC type, and utility of methionine as a secondary screening analyte. *Mol Genet Metab.* 2010 Feb;99(2):116-23. Epub 2009 Sep 27.
- Wendel U, Ogier de Baulny H (2006). Branched-chain organic acidurias/acidemias. In Fernandes J, Saudubray JM, van den Berghe G, Walter JH editors. *Inborn metabolic diseases: diagnosis and treatment.* Berlin: Springer 246-262.
- Wilcken B, Haas M, Joy P, Wiley V, Bowling F, Carpenter K, et al (2009). Expanded newborn screening: outcome in screened and unscreened patients at age 6 years. *Pediatrics* 124(2):e241-8.
- Wilcken B, Wiley V, Hammond J, Carpenter K (2003). Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *N Engl J Med* 348;23: 2304-12.
- Wilcken B (2011). Newborn screening programmes: how are we travelling, and where should we be going? *Inherit. Metab* DOI 10.1007/s10545-011-9326-4.
- Wilcken B (2008). The consequences of extended newborn screening programmes: Do we know who needs treatment? *Inherit. Metab* 173-177.

- Wilcken B (2010). Expanded newborn screening: reducing harm, assessing benefit. *J Inherit Metab Dis* 33(Suppl 2):S205-10.
- Wilcken B (2006). Mini-symposium: Newborn screening for inborn errors of metabolism – clinical effectiveness. *J. Inherit. Metab* 366-9.
- Wilson J, Jungner F (1968). Principles and practice of screening for disease (public health papers N°34) Geneva World Health Organization 26-39.
- Yap S, Naughten E (1998). Homocystinuria due to cystathionine β -synthetase deficiency in Ireland: 25 years of experience in newborn screened and treated population with reference to clinical outcome and biochemical control. *J Inherit Metab Dis* 21:738-47.
- Zytkovicz T.H, Fitzgerald E.F, Maresden D, Larson A.C, Shih VE, Johnson DM et al (2001). Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: a two-year summary from the new England newborn screening program. *Clinical Chemistry* 47: 1945-1955.

VIII. ANEXOS

Tabela A - Doenças tipo intoxicação

Informação Geral	Iniciais:	Diagnóstico:
	Sexo:	Idade de diagnóstico:
	Nome do médico:	
	Centro de tratamento:	
Historia familiar (irmãos afectados, nado-mortos)		
Pais consanguíneos? (Grau de parentesco?)		
Período perinatal:		
Gravidez (complicações)		
Duração da gravidez (semanas de gestação)		
Peso ao nascimento (percentil)		
Perímetro cefálico (percentil)		
Índice de APGAR		
Diagnóstico		
Valores iniciais no rastreio		
Valores de confirmação no rastreio		
Idade de início dos primeiros sintomas		
Determinações analíticas ao diagnóstico:		
Alterações hematológicas	Hb:	MCV:
	Leucócitos:	Plaquetas:
Alterações bioquímicas	Glicose	Ureia/Creatinina
	TGO/TGP	Ionograma
Equilíbrio ácido-base		
Combur		
Cromatografia de aminoácidos plasmáticos		
Cromatografia de aminoácidos urinários		
Cromatografia de ácidos orgânicos urinários		
Amónia		
Lactato		

Sintomas período neonatal	Se sim especificar
Recusa alimentar	
Sintomas vegetativos (apneia, bradicardia, hipotermia)	
Hipotonia	
Letargia / Coma	
Movimentos involuntários / Convulsões	
Icterícia não fisiológica	
Dismorfias	
Outros	
Sintomas tardios	
Má evolução estatura ponderal (percentil)	
Atraso mental (ligeiro, moderado, grave)	
Micro/Macrocefalia	
Epilepsia	
Alterações no tónus	
Outras alterações neurológicas	
Alterações comportamento	
Cardiomiopatia	
Alterações função hepática	
Alterações função renal	
Alterações textura cabelo e unhas	
Outras alterações	
RMN cerebral (idade e descrição)	

Tratamento		
Restrição proteica (g proteína/kg/dia)		
Mistura de aminoácidos (tipo, g/kg/dia)		
Cofactores enzimáticos (tipo e dose)		
Carnitina (mg/kg/dia)		
Suplementos em ferro		
Suplementos vitamínicos		
Outros		
Evolução clínica		
Número de consultas programadas (por ano)		
Outras consultas (por ano)		
Internamentos após diagnóstico (número de descompensações)		
Complicações		
Controlo metabólico:	Limites:	Média:
Cromatografia de aminoácidos plasmáticos/urinários		
Cromatografia de ácidos orgânicos urinários		
Carnitina plasmática		
Outros		
Outros comentários:		

Data:

Tabela B - Doenças da β oxidação mitocondrial dos ácidos gordos

Informação Geral	Iniciais:	Diagnóstico:
	Sexo:	Idade de diagnóstico:
	Nome do médico:	
	Centro de tratamento:	
Historia familiar (irmãos afectados, nado-mortos)		
Pais consanguíneos? (Grau de parentesco?)		
Período perinatal:		
Gravidez (complicações)		
Duração da gravidez (semanas de gestação)		
Peso ao nascimento (percentil)		
Perímetro cefálico (percentil)		
Índice de APGAR		
Diagnóstico		
Valores iniciais no rastreio		
Valores de confirmação no rastreio		
Idade de início dos primeiros sintomas		
Determinações analíticas no diagnóstico:		
Alterações hematológicas	Hb:	MCV:
	Leucócitos:	Plaquetas:
Alterações bioquímicas	Glicose	Ureia/Creatinina
	TGO/TGP	Ionograma
Equilíbrio ácido-base		
Combur		
Acilcarnitinas		
Carnitina		
Cromatografia de ácidos orgânicos urinários		
Amónia		

Lactato	
Sintomas período neonatal	Se sim especificar
Recusa alimentar	
Sintomas vegetativos (apneia, bradicardia, hipotermia)	
Hipotonia	
Letargia / Coma	
Movimentos involuntários / Convulsões	
Icterícia não fisiológica	
Dismorfias	
Outros	
Sintomas tardios	
Má evolução estatura ponderal (percentil)	
Atraso mental (ligeiro, moderado, grave)	
Micro/Macrocefalia	
Epilepsia	
Alterações no tónus/miopatia	
Outras alterações neurológicas	
Alterações comportamento	
Cardiomiopatia	
Alterações função hepática	
Alterações função renal	
Alterações oculares	
Outras alterações	
RMN cerebral (idade e descrição)	

Tratamento		
Restrição TCL (g/kg/dia)/Suplementos TCM (g/kg/dia)		
Suplementos HC (tipo, g/kg/dia)		
Cofactores enzimáticos (tipo e dose)		
Carnitina (mg/kg/dia)		
Suplementos em DHA		
Suplementos vitamínicos		
Outros		
Evolução clínica		
Número de consultas programadas (por ano)		
Outras consultas (por ano)		
Internamentos após diagnóstico (número de descompensações)		
Complicações		
Controlo metabólico:	Limites:	Média:
Cromatografia de aminoácidos plasmáticos/urinários		
Cromatografia de ácidos orgânicos urinários		
Carnitina plasmática		
Outros		
Outros comentários:		

Data:

Tabela 1.2 - Aminoácidopatias que fazem parte do actual painel de rastreio (marcadores bioquímicos iniciais e testes de confirmação)

Doença	Marcador de rastreio	Confirmação bioquímica
Fenilcetonúria / Hiperfenilalaninemia	Phe >150 µM Phe / Tir >1,5	AA plasma (↑Phe e ↓Tir) Doseamento de bipterinas
Tirosinemia Tipo I	Tir > 250 µM	AA plasma (↑Tir) ↑Succinilacetona urinária
Tirosinemia Tipo II/III	Tir > 450 µM	AA no plasma (↑Tir)
Leucínose	X Leu > 342 µM Val > 250 µM	AA plasma (↑Leu, Val e Ile) Quantificação de aloisoleucina
Hipermetioninemia	Met > 50 µM	AA plasma (↑Met) Homocisteína total (plasma)
Citrulinemia Tipo I	Cit > 46 µM	Amónia (↑) AA plasma (↑Cit) Ácido orótico urinário (↑)
Hiperargininemia	Arg > 50 µM	Amónia (↑) AA plasma (↑Arg) Ácido orótico urinário (↑)
Homocistinúria Clássica	Met > 50 µM	AA plasma (↑Met, ↑homocistina, ↓Cist) Homocisteína total – plasma (↑) AA urina (↑Homocistina)
Ac Argininosuccínica	Asa >5 µM	↑ Ac argininosuccínico e seus anidros

Todas estas patologias podem ser confirmadas com estudo molecular e/ou estudo enzimático.

Na **tabela 1.3** estão discriminadas as acidúrias orgânicas que fazem parte do actual painel de rastreio, os marcadores bioquímicos iniciais e os testes de confirmação:

Doença	Marcador de rastreio	Confirmação diagnóstico AOs urina
Ac. metilmalónica	C3 > 6.23 µM, C4DC C2/C3 > 0.3	↑Metilmalónico ↑Metilcitríco e tigilglicina ↑ 3-OH propiónico
Ac. Propiónica	C3 > 6.23 µM C2/C3 > 0.3	↑3-OH propiónico ↑3 OH isovalérico ↑Propionil e tigilglicina
Ac. Isovalérica	C5 > 1 µM C5/C2	↑isovalerilglicina ↑3 OH isovalérico ↑4OH isovalerico
Ac. Glutárica tipo I	C5DC > 0.2 µM	↑Glutárico ↑3 OH glutárico ↑Glutaconico
Ac.3-Hidroxi-3-Metilglutárica	C5OH > 1 µM C6DC > 0.07 µM	↑3-OH-3-metilglutárico ↑3 OH Isovalérico ↑3 metilglutacónico
3-Metilcrotonilglicínúria	C5OH > 1 µM	↑metilcrotonilglicina ↑3 OH Isovalérico
Def. Holocarboxylase sintetase	C5OH > 1 µM	↑ AOs urina

Todas estas patologias podem ser confirmadas com estudo molecular e/ou estudo enzimático.

(C2) acetilcarnitina, (C3) propionilcarnitina, (C5DC) glutarilcarnitina/3hidroxidecanoilcarnitina, (C5) isovalerilcarnitina, (C5OH) 3hidroxi-isovalerilcarnitina/2 metil-3-hidroxibutirilcarnitina (C6DC) adipoil/metilglutarilcarnitina,

Na **tabela 1.4** estão discriminadas os defeitos da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos que fazem parte do actual painel de rastreio, os marcadores bioquímicos iniciais e os testes de confirmação:

Doença	Marcador de rastreio	Confirmação diagnóstico
Def. desidrogenase dos ac. gordos de cadeia média	C8, C8/C10	Aos urina: \uparrow Hexanoil e suberilglicina \uparrow 5-OH hexanoico \uparrow dicarboxílicos
Def. desidrogenase de 3-Hidroxi-Acil-CoA de Cadeia Longa	C16OH, C18:1OH, C18OH C16OH/C16	Aos urina: \uparrow 3-OHdicarboxílicos \uparrow dicarboxílicos
Def Múltiplo das acil-CoA desidrogenases	Elevações múltiplas de C4 a C18	AOs urina: \uparrow do glutárico e dicarboxílicos de C4 a C10
Def no transporte da Carnitina	C0	\downarrow carnitina plasma
Def. Desidrogenase dos Ác Gordos de Cadeia Muito Longa	C14:1, C14:2	AOs urina: \uparrow dicarboxílicos de cadeia longa e muito longa
Def. Carnitine palmitoil-transferase I	C0/(C16C18)	
Def Carnitina palmitoil-transferase II	C0/(C16C18)	AOs urina: \uparrow dicarboxílicos

Todas estas patologias podem ser confirmadas com estudo molecular e/ou estudo enzimático.

C0 carnitina livre, (C4) butirilcarnitina, (C8) octanoilcarnitina, (C10) decanoilcarnitina, (C14) tetradecanoilcarnitina, (C16) palmitoilcarnitina, (C18) estearoilcarnitina, (C16OH) Hidroxihexadecanoilcarnitina, (C18OH) 3-hidroxi-estearoilcarnitina