

Rastreio neonatal da homocistinúria clássica revela uma elevada frequência da deficiência em MAT I/III na Península Ibérica

Newborn screening for homocystinuria revealed a high frequency of MAT I/III deficiency in Iberian Peninsula

Ana Marcão¹, María L. Couce², Célia Nogueira¹, Helena Fonseca¹, Filipa Ferreira¹, José M. Fraga², M. Dolores Bóveda², Laura Vilarinho¹

ana.marcao@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética. Departamento de Genética Humana, INSA, Porto.

(2) Unidade de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Metabólicas Congénitas. Departamento de Pediatria, Hospital Clínico Universitário de Santiago de Compostela; CIBER-Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras.

_Resumo

A homocistinúria devida à deficiência da enzima cistationina β -sintetase ou "homocistinúria clássica" é uma doença metabólica rara (1/344 000 RN), de transmissão autossómica recessiva e caracterizada por elevada heterogeneidade clínica, que frequentemente contribui para o diagnóstico tardio. Existe tratamento efetivo, se instituído antes de se instalarem sintomas irreversíveis, pelo que tem sido incluída num número considerável de programas de rastreio neonatal. O rastreio baseia-se na determinação dos níveis plasmáticos de metionina, por espectrometria de massa em *tandem* (*ms/ms*), mas conduz à identificação de muitos casos falsos-positivos, portadores de uma condição com significado clínico não completamente esclarecido, a deficiência em metionina adenosiltransferase (MAT I/III). Ambas as condições são rastreadas na Galiza e em Portugal desde 2000 e 2004, respetivamente. Desde então, foram identificados três doentes com homocistinúria clássica e 44 doentes com deficiência em MAT I/III. Uma forma dominante, e aparentemente benigna, desta última condição, associada à mutação p.R264H, parece ser muito frequente na Península Ibérica. A implementação de um teste de segunda linha, consistindo na determinação da homocisteína total, permitiria reduzir consideravelmente o número de RN identificados com deficiência em MAT I/III e melhorar a especificidade e valor positivo preditivo do rastreio da homocistinúria clássica.

_Abstract

Homocystinuria due to cystathionine β -synthase deficiency or "classical homocystinuria" is a rare autosomal recessive condition characterized by high clinical heterogeneity, which contributes to frequent late clinical diagnosis. Treatment is effective if started before irreversible clinical symptoms, which led to its inclusion in a number of newborn screening programs, based on the analysis of methionine levels by tandem mass spectrometry (*ms/ms*). Nevertheless, false-positive results can be frequently obtained and lead to the unwanted identification of methionine adenosyl transferase (MAT I/III) deficiency, a condition with clinical significance not completely elucidated. Both these metabolic disorders are screened in Galicia and Portugal since the introduction of the *ms/ms* technology, in 2000 and 2004, respectively, resulting in the identification of three patients with classical homocystinuria and 44 patients with MAT I/III deficiency. A dominant form of MAT I/III deficiency, associated with mutation p.R264H, seems to be very frequent in the Iberian Peninsula and usually is associated with a clinically benign course. The implementation of a second-tier test for homocysteine determination in dried blood spots would considerably reduce the number of MAT I/III-deficient patients identified and improve the specificity and positive predictive value for classical homocystinuria screening.

_Introdução

A Homocistinúria Clássica (CBS, MIM 236200) é uma doença genética, de transmissão autossómica recessiva, mundialmente rara (1/344 000) ⁽¹⁾, e devida à deficiência na enzima cistationina β -sintetase (CBS, EC 4.2.1.22). Esta enzima, que atua no ciclo da metionina, é maioritariamente expressa no fígado e no pâncreas e é ativa sob a forma de um homotetrâmero. Bioquimicamente, esta deficiência resulta na elevação da metionina e homocisteína no plasma e da homocistina na urina. Clinicamente multissistémica, destaca-se a miopia, subluxação do cristalino, atraso mental, alterações esqueléticas (síndrome de Marfan) e eventos tromboembólicos.

O tratamento, baseado numa dieta restrita em metionina e suplementada com betaína, vitamina B12 e ácido fólico, é eficaz se iniciado precocemente, mas o diagnóstico é frequentemente tardio devido à inespecificidade dos sintomas. Aproximadamente metade dos doentes apresenta uma forma da doença que responde à piridoxina ⁽¹⁾. A CBS é codificada pelo gene *CBS*, e estão descritas mais de 170 mutações patológicas (<http://cbs.lfl.cuni.cz>), sendo a maioria esporádica. Verifica-se a existência de correlação genótipo-fenótipo, com associação das variantes genéticas conducentes a menor atividade enzimática, às formas clínicas mais graves ⁽²⁾.

A adaptação da espectrometria de massa em *tandem* (*ms/ms*) ao rastreio neonatal permite, desde o final dos anos 90, o rastreio neonatal desta patologia, baseado na elevação da concentração da metionina plasmática. No ciclo da metionina existe ainda outra enzima, a metionina adenosiltransferase (MAT I/III, EC 2.5.1.6) cuja deficiência origina também a elevação da concentração da metionina plasmática desde os primeiros

dias de vida, podendo em alguns casos verificar-se um ligeiro aumento dos níveis de homocisteína no plasma. A deficiência nesta enzima, codificada pelo gene *MAT1A*, está associada a uma condição de significado clínico não esclarecido (Def. MAT I/III, MIM 250850), o que levanta algumas questões relativamente à sua inclusão nos programas de rastreio neonatal (2). Apesar de habitualmente transmitida de forma autossómica recessiva, está descrita em várias populações uma mutação frequente (p.R264H), associada à sua transmissão autossómica dominante (3-4). A introdução da tecnologia de *ms/ms* no rastreio neonatal, na Galiza em 2000 e em Portugal em 2004, permitiu a identificação de 44 recém-nascidos (RN) com MAT I/III e 3 RN com deficiência de CBS, revelando na Península Ibérica, por um lado, uma baixa prevalência desta patologia, e por outro, uma elevada frequência da Def. MAT I/III, associada à mutação p.R264H.

_Objetivo

Caracterizar os casos de deficiência em MAT I/III e de CBS identificados em recém-nascidos na Península Ibérica, com base no rastreio neonatal da Galiza e de Portugal.

_Material e métodos

Este estudo incluiu 850 000 RN portugueses (2004-2014) e 374 000 RN da Galiza (2000-2014). As amostras de sangue em papel de filtro foram colhidas maioritariamente entre o 3º e o 6º dia de vida. A determinação da concentração plasmática de metionina foi efetuada por *ms/ms* (5). Após confirmação da persistência da hipermetioninemia numa segunda amostra, os RN foram encaminhados para um centro de tratamento especializado para avaliação clínica e colheita de amostras de sangue e urina para efetuar cromatografia de aminoácidos e doseamento de homocisteína total/ homocistina. Os estudos genéticos foram efetuados por sequenciação direta de fragmentos amplificados por PCR, a partir de ADN genómico extraído de sangue. Todos os exões dos genes *CBS* e *MAT1A*, e respetivas regiões intrónicas flanqueadoras, foram sequenciados por procedimentos *standard*.

_Resultados e Discussão

Foram identificados 47 RN com hipermetioninemia persistente (tabelas 1 e 2), dos quais 33 em Portugal. Destes, dois são doentes com deficiência de CBS (1/425 000) e 31 são portadores de Def. MAT I/III (1/27 400). Na Galiza foram identificados 13 casos de deficiência em MAT I/III (1/28 736) e um com deficiência de CBS (1/374 000). Apenas em dois doentes portugueses com deficiência de MAT I/III (30 e 31) não foi identificada a mutação p.R264H. Todos os RN mantinham na confirmação valores de metionina que permitiram manter dietas livres, apropriadas à idade e com ingestão proteica normal. Com exceção de um doente, que aos 2 anos de idade apresentava alterações de mielinização, de significado clínico e etiologia desconhecidos, todos os RN apresentam crescimento, desenvolvimento e avaliação neurológica normais. Todos os familiares estudados (pais, tios, irmãos e avós), e portadores da mutação p.R264H, estão clinicamente bem, exceto um pai, falecido muito novo com um enfarte do miocárdio e dois avós, falecidos com doença vascular severa, sem fatores de risco identificados (6). No doente 30, que não tem origem Ibérica, foram identificadas em heterozigotia composta duas mutações novas: p.L137V (c.409T>G) e p.S247N (c.740G>A). Ambas as mutações afetam aminoácidos conservados, não estão descritas no dbSNP nem no Exome Variant Database, e de acordo com quatro programas bioinformáticos diferentes (Condel, SIFT, MutationTaster e PolyPhen) são patogénicas. A mutação p.L355R, identificada em homozigotia no doente 31, foi recentemente publicada num primo do doente que vive em Espanha (7).

Os três doentes com deficiência em CBS, identificados neste estudo, apresentavam valores moderadamente aumentados de metionina no rastreio, mas muito elevados, de metionina e homocisteína, na confirmação (tabela 2). Todos fazem tratamento dietético incluindo restrição em metionina, e suplementação com betaína, vitamina B12 e ácido fólico. Apesar de nenhum ser respondedor à piridoxina, mantêm-se assintomáticos.

Tabela 1: Caracterização dos doentes com deficiência em MAT I/III.

Doentes	Local de rastreio	Género	Idade atual (meses/anos)	Rastreio neonatal		Confirmação (plasma)			Análise molecular
				Idade (dias)	Metionina (μM) ¹	Idade (dias)	Metionina (μM) ¹	Homocisteína total (μM) ²	Gene <i>MAT1A</i>
1-29	Portugal	11 M 18 F	3m-9a	3-7	52-124 ^a	12-30 ^b	80-254	8-26 ^c	p.R264H/N
30	Portugal	F	5a	7	67	30	85	5	p.L137V/p.S247N
31	Portugal	F	4a	3	72	19	465	n.d.	p.L355R/p.L355R
32-44	Galiza	7 M 6 F	5m-8a	2-6	45-147	35-128	91-392 ^d	8-23 ^e	p.R264H/N

¹ Normal: 4-44 μM ; ² Normal: 2-14 μM ; ^a O doente 9 tem um valor de 309 μM ; ^b A confirmação do doente 11 foi efetuada com 63 dias de idade; ^c Não determinado em 4 casos; ^d O doente 32 tem um valor de 573 μM ; ^e Não determinado em 3 casos; M: masculino; F: Feminino.

Tabela 2: Caracterização dos doentes com Homocistinúria clássica.

Doentes	Local de rastreio	Género	Idade atual (anos)	Rastreio neonatal		Confirmação (plasma)			Análise molecular	Referência
				Idade (dias)	Metionina (μM) ¹	Idade (dias)	Metionina (μM) ¹	Homocisteína total (μM) ²	Gene <i>CBS</i>	
45	Portugal	F	9	5	130	22	744	130	p.V178GfsX23/ p.K523fsX18	(8, 9)
46	Portugal	M	2	6	130	14	293	149	p.L338P/ p.L338P	(10)
47	Galiza	F	9	3	59	29	1086	148	p.T257M/ p.T257M	(11)

¹ Normal: 4-44 μM ; ² Normal: 2-14 μM ; M: masculino; F: Feminino.

Conclusão

O rastreio neonatal da deficiência de CBS faz parte de muitos programas de rastreio, uma vez que o início precoce do tratamento é inquestionavelmente benéfico para o doente. No entanto, a realização deste rastreio baseado apenas na determinação da metionina plasmática, gera alguma controvérsia devido à baixa especificidade e sensibilidade (12). Nem em Portugal, nem na Galiza foram até à data identificados casos falsos negativos, mas foi identificado um número considerável de casos com uma forma aparentemente benigna de Def. MAT I/III, desconhecida na Península Ibérica antes do rastreio neonatal por *ms/ms*.

Em Portugal o rastreio da deficiência de CBS iniciou-se em 2004, tendo até à data sido identificados dois doentes (1:425 000 RN). Esta baixa prevalência ao nascimento e a iden-

tificação de um elevado número de indivíduos com uma condição aparentemente benigna, colocam em questão a manutenção deste rastreio no painel nacional de doenças rastreadas. A determinação da homocisteína total nas amostras de rastreio, como segundo teste a realizar nas amostras com metionina aumentada, permitirá melhorar significativamente a especificidade e sensibilidade deste rastreio, e deverá ser brevemente implementada no rastreio neonatal.

Agradecimentos:

Os autores agradecem a colaboração dos médicos que seguem os doentes identificados, nos centros de tratamento de doenças metabólicas (Centro Hospitalar do Porto, Centro Hospitalar S. João, Centro Hospitalar de Coimbra e Centro Hospitalar Lisboa Norte). Parte do trabalho realizado na Galiza foi financiado pelo projeto *European network and Registry for Homocystinurias and Methylation Defects* – EHOD (N_2012_12_02).

Artigo adaptado de: Marcão A, Couce ML, Nogueira C, et al. Newborn Screening for Homocystinuria Revealed a High Frequency of MAT I/III Deficiency in Iberian Peninsula. *JIMD Rep.* 2015;20:113-20. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4375120/

Referências bibliográficas:

- (1) Mudd SH, Levy HL, Kraus JP. Disorders of transsulfuration. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al. (eds). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill, 2001, pp. 2007-56.
- (2) Mudd SH. Hypermethioninemias of genetic and non-genetic origin: A review. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2011;157C(1):3-32.
- (3) Chamberlin ME, Ubagai T, Mudd SH, et al. Dominant inheritance of isolated hypermethioninemia is associated with a mutation in the human methionine adenosyltransferase 1A gene. *Am J Hum Genet.* 1997;60(3):540-6. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1712529/
- (4) Chamberlin ME, Ubagai T, Mudd SH, et al. Methionine adenosyltransferase I/III deficiency: novel mutations and clinical variations. *Am J Hum Genet.* 2000;66(2):347-55. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1288087/
- (5) Rashed MS, Ozand PT, Bucknall MP, et al. Diagnosis of inborn errors of metabolism from blood spots by acylcarnitines and amino acids profiling using automated electrospray tandem mass spectrometry. *Pediatr Res.* 1995;38(3):324-31.
- (6) Martins E, Marcao A, Bandeira A et al (2012) Methionine adenosyltransferase I/III deficiency in Portugal: high frequency of a dominantly inherited form in a small area of Douro High Lands. *JIMD Rep* 6:107-12.
- (7) Couce ML, Bóveda MD, García-Jiménez C, et al. Clinical and metabolic findings in patients with methionine adenosyltransferase I/III deficiency detected by newborn screening. *Mol Genet Metab.* 2013;110(3):218-21.
- (8) Cozar M, Urreiziti R, Vilarinho L, et al. Identification and functional analyses of CBS alleles in Spanish and Argentinian homocystinuric patients. *Hum Mutat.* 2011;32(7):835-42.
- (9) Castro R, Heil SG, Rivera I, et al. Molecular genetic analysis of the cystathionine beta-synthase gene in Portuguese homocystinuria patients: three novel mutations. *Clin Genet.* 2001;60(2):161-3.
- (10) Urreiziti R, Balcells S, Rodés M, et al. Spectrum of CBS mutations in 16 homocystinuric patients from the Iberian Peninsula: high prevalence of T191M and absence of I278T or G307S. *Hum Mutat.* 2003;22(1):103.
- (11) Sebastio G, Sperandio MP, Panico M, et al. The molecular basis of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency in Italian families, and report of four novel mutations. *Am J Hum Genet.* 1995;56(6):1324-33. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1801112/
- (12) Gan-Schreier H, Kebbewar M, Fang-Hoffmann J, et al. Newborn population screening for classic homocystinúria by determination of total homocysteine from Guthrie cards. *J Pediatr.* 2010;156(3):427-32. Epub 2009 Nov 14.