

Deficiência da descarboxilase dos L-aminoácidos aromáticos: possibilidade de inclusão no Programa Nacional de Rastreio Neonatal

Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: possibility for inclusion in Portuguese Newborn Screening Program

Raquel Santos^{1,2}, Filipa Ferreira², Laura Vilarinho², Hugo Rocha^{1,2}

hugo.rocha@insa.min-saude.pt

(1) Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto, Porto, Portugal

(2) Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética, Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal

_Resumo

A deficiência da descarboxilase dos L-aminoácidos aromáticos (AADC) é uma doença genética rara que afeta a síntese de neurotransmissores, resultando em sintomas neurológicos e de desenvolvimento graves. A quantificação da 3-O-metildopa (3-OMD), em amostras de sangue seco, tem-se mostrado um método fiável, sensível e específico para a deteção desta patologia no período neonatal. Este facto, associado ao desenvolvimento de novas terapias com vantagens de início precoce, tem feito equacionar o rastreio neonatal desta patologia.

Este estudo teve como objetivo avaliar a possibilidade de integrar a quantificação de 3-OMD no protocolo existente, de espectrometria de massa, no Programa Nacional de Rastreio Neonatal (PNRN), assim como implementar uma prova de segundo nível para melhorar a sensibilidade e especificidade da deteção da patologia.

A quantificação da 3-OMD foi incorporada no procedimento existente, sem comprometimento do mesmo, sendo eficaz na quantificação de valores de concentração clinicamente relevantes. Como prova de segundo nível foi desenvolvida uma abordagem por LC-MS/MS que se revelou eficaz na deteção de eventuais interferentes.

A possibilidade de inclusão da quantificação da 3-OMD, incluída na abordagem multiplex de MS/MS já utilizada, sem custos diretos relevantes associados, permite que se equacione a eventual inclusão desta patologia no PNRN.

_Abstract

Aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) deficiency is a rare genetic disorder that affects neurotransmitter synthesis, resulting in severe neurological and developmental symptoms.

Quantification of 3-O-methyl dopa (3-OMD), a metabolite accumulated in this condition, in dried blood spot's (DBS) has proven to be a sensitive and specific method for newborn screening. This fact, combined with the development of new therapies offering advantages when started earlier, has led to discussions about considering the neonatal screening for this condition.

This study aimed to assess the possibility of integrating the quantification of 3-OMD into the existing mass spectrometry protocol of the Portuguese Neonatal Screening Program (PNRN), as well as to implement a second-tier test to improve the sensitivity and specificity of the detection. The quantification of 3-OMD was incorporated into the existing procedure without compromising it, being effective in quantifying clinically relevant concentration values. A second-tier test was developed using an LC-MS/MS approach, which proved effective in discriminating potential interferences.

The possibility of including 3-OMD quantification, as part of the already used multiplex MS/MS approach, with no significant associated direct costs, allows for the consideration of including this condition in the PNRN.

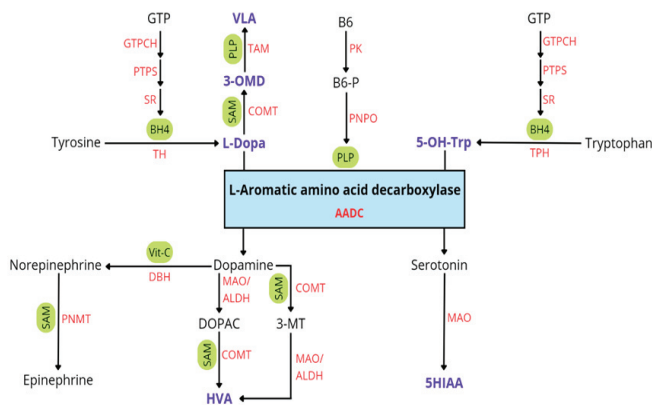
_Introdução

A deficiência da descarboxilase dos L-aminoácidos aromáticos (AADC) é uma doença genética rara, de transmissão autossómica recessiva, causada por variantes patogénicas no gene DDC (1). A enzima AADC desempenha um papel crucial na biossíntese dos neurotransmissores dopamina e serotonina (figura 1), e a sua deficiência resulta em manifestações neurológicas, neuromusculares e comportamentais (2). Esta patologia foi descrita pela primeira vez em 1990 por Hyland, *et al.* (3) e, atualmente, estão documentados cerca de 350 casos na literatura (4). A prevalência global permanece desconhecida, variando entre 1:32.000 no Taiwan e 1:190.000 nos Estados Unidos da América (4).

Os sintomas geralmente surgem nos primeiros seis meses de vida, sendo os mais frequentes a hipotonia, distúrbios do movimento (como crises oculogíricas e distonia), atraso de desenvolvimento e disfunções autonómicas (por exemplo, ptose e sudorese excessiva). Adicionalmente, incluem-se problemas comportamentais (irritabilidade e choro excessivo), perturbações do sono (insónia e hipersonia) e sintomas gastrointestinais (diarreia, obstipação, entre outros) (6).

Segundo o mais recente consenso (6), o diagnóstico da deficiência da AADC requer resultados positivos em pelo menos duas das três principais abordagens diagnósticas: (1) análise dos neurotransmissores no líquido cefalorraquidiano (LCR), que revela um padrão característico, com um redução significativa do ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) e do ácido homovanílico (HVA), aumento de precursores como L-DOPA, 5-hidroxitriptofano (5-OH-Trp) e 3-OMD, com níveis normais de pterinas; (2) avaliação da atividade enzimática no plasma, que se encontra reduzida; e (3) diagnóstico molecular, com identificação de variantes patogénicas no gene DDC (6).

Figura 1: Via metabólica da síntese de dopamina e serotonina, adaptada de Himmelreich N., *et al* (5).



Estudos internacionais demonstraram que esta pode ser incluída nos métodos multiplex de MS/MS, já utilizado pelos laboratórios para o rastreio neonatal de doenças metabólicas, apresentando elevada sensibilidade e especificidade, associada a uma baixa taxa de falsos positivos (14-18).

_Objetivos

O objetivo deste estudo é avaliar a possibilidade técnica de integrar a quantificação de 3-OMD no método de MS/MS utilizado no Programa Nacional de Rastreio Neonatal (PNRN) e desenvolver e implementar uma prova de segundo nível para eliminar possíveis interferentes na quantificação da 3-OMD no rastreio inicial, permitindo aumentar a sensibilidade e especificidade do teste.

_Material e métodos

O método de MS/MS utilizado no PNRN é um protocolo desenvolvido e validado internamente, baseado na técnica descrita por Rashed, *et al.* (19). Este procedimento permite a análise de aminoácidos e acilcarnitinas através de Injeção de Fluxo acoplada a Espectrometria de Massa em Tandem (FIA-MS/MS) (Sciex Qtrap4500 e 4000Qtrap). Para a quantificação de 3-OMD, foi adicionado o padrão interno 3-OMD-D₃, numa concentração final de 0,1 µM, à solução de extração. As transições 268,1 m/z → 166,1 m/z (3-OMD) e 271,1 m/z → 169,1 m/z (3-OMD-D₃) foram otimizadas e integradas no método de aquisição MS/MS.

Foram analisadas amostras residuais de sangue seco em papel de filtro (DBS) anonimizadas, provenientes do PNRN, bem como amostras DBS anonimizadas de adultos em terapia com DOPA, fornecidas por um laboratório parceiro. Amostras com concentrações de 3-OMD acima do cut-off estabelecido foram sujeitas a uma prova de segundo nível, utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS), com condições de extração idênticas às do método FIA-MS/MS. Para a análise por LC-MS/MS, foi utilizada uma coluna *Penomex Gemini 3u C6-phenyl* 110A, com uma fase móvel composta por acetonitrilo/água, utilizando um sistema HPLC Agilent série 1100 acoplado a um MS/MS 4000Qtrap da Sciex (gráfico 1).

Os tratamentos de primeira linha incluem agonistas da dopamina (que ativam diretamente os recetores de dopamina), inibidores da monoamina oxidase (que impedem a degradação da dopamina e da serotonina) e piridoxal fosfato (PLP), um cofator essencial da enzima AADC (6). Contudo, a eficácia destas terapias é limitada na maioria dos casos (2,7).

O desenvolvimento de terapias génicas tem surgido como uma estratégia promissora no tratamento de doenças raras (8). Para a deficiência de AADC, a terapia génica envolve a administração intraputamina de uma cópia funcional do gene *DDC*, utilizando vetores virais adeno-associados. Estudos clínicos demonstraram melhorias significativas nos sintomas e na função motora após o tratamento, com benefícios mais evidentes em pacientes mais jovens (9-12). Em 2022, a Agência Europeia de Medicamentos aprovou a terapia génica *Eladocagene exuparvovec* (Upstaza®) para doentes com deficiência de AADC confirmada, fenótipo grave e idade mínima de 18 meses (13).

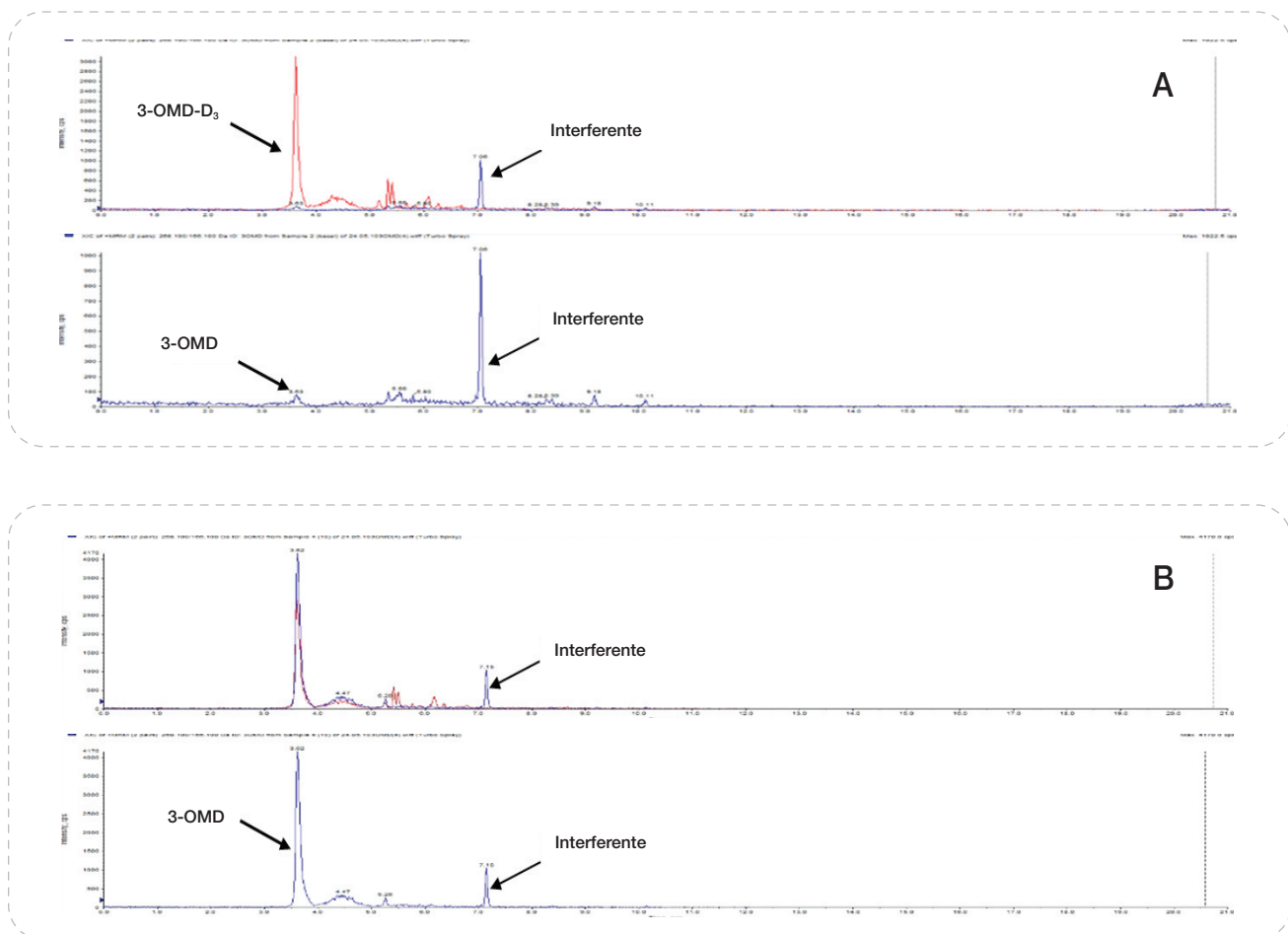
A existência de uma abordagem terapêutica que apresenta maior eficácia quando iniciada em fases pré-sintomáticas suscitou o interesse pela inclusão desta patologia nos programas de rastreio neonatal. Estes baseiam-se na quantificação de 3-OMD, um metabolito acumulado nesta condição, em amostras de sangue seco em papel de filtro (DBS), utilizando espectrometria de massa em tandem (MS/MS).

_Resultados e discussão

A integração do 3-OMD no método FIA-MS/MS foi realizada com sucesso, sem interferir na quantificação dos restantes biomarcadores do painel de rastreio. O método de quantificação implementado revelou um limite de deteção de 0,95 μM , o limite de quantificação de 2,87 μM , a exatidão de 1,3% e a precisão de 5,7%. A análise de 2066 amostras de sangue

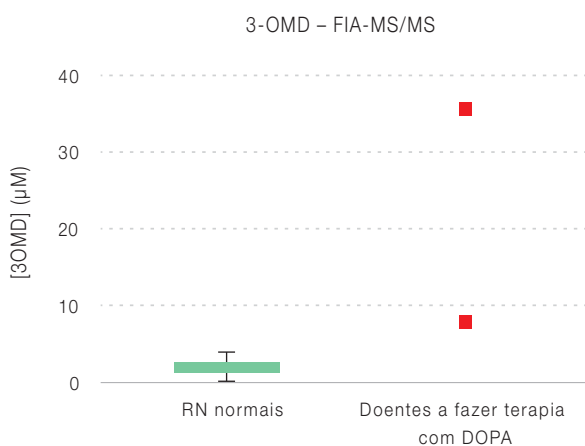
seco (DBS) anonimizadas de recém-nascidos saudáveis revelou uma concentração média de 3-OMD de 1,9 μM , com um desvio padrão de 0,4, enquanto os percentis 2,5 e 99,5 foram 1,2 μM e 3,3 μM , respetivamente. Estes dados estabeleceram uma *baseline* abrangente dos valores de 3-OMD na população neonatal.

Gráfico 1: ⚡ Separação cromatográfica de 3-OMD endógeno (azul) e 3-OMD-D₃ (vermelho) numa amostra de um indivíduo normal (A) e numa amostra enriquecida a 10 μM (B), utilizando LC-MS/MS. O pico azul aos 7,05 minutos foi identificado como um interferente.



As amostras dos dois doentes sob terapia com DOPA revelaram concentrações de 3-OMD significativamente mais elevadas em comparação com os recém-nascidos normais (8,0 μM e 35,6 μM). Estes resultados demonstram a capacidade do método em detetar concentrações de 3-OMD a níveis clinicamente relevantes (gráfico 2). As amostras de rastreio neonatal de doentes com AADC, reportadas na literatura, apresentam valores de 3-OMD entre 5,05 μM e 35,95 μM , o que suporta a validade do método implementado na identificação desta patologia.

Gráfico 2: Distribuição da concentração de 3-OMD em recém-nascidos (RN) normais (gráfico de *box-and-whiskers*, verde) e em indivíduos sob terapia com DOPA (pontos individuais, vermelho).



Com base numa análise detalhada dos dados obtidos e nos valores de 3-OMD reportados em doentes com deficiência de AADC confirmada, o percentil 99,5 (3,3 μM) foi estabelecido como o *cut-off* para o encaminhamento das amostras para prova de segundo nível. Todas as amostras que apresentaram concentrações iniciais elevadas de 3-OMD mostraram valores normais após reanálise por LC-MS/MS. Estes resultados evidenciam que a separação cromatográfica utilizada na prova de segundo nível permite discriminar de forma eficaz os níveis verdadeiramente elevados de 3-OMD de potenciais interferentes, reduzindo a ocorrência de falsos positivos e garantindo a precisão diagnóstica.

Para avaliar a viabilidade de padrões internos alternativos, foi realizada uma comparação entre FIA-MS/MS utilizando 3-OMD- D_3 e FIA-MS/MS com $^{13}\text{C}_6$ -Phe e $^{13}\text{C}_6$ -Tyr, previamente demonstrados como eficazes em fluxos de trabalho de rastreio neonatal (16,17). A análise de 24.441 amostras de recém-nascidos revelou um desempenho semelhante entre os dois métodos. Embora $^{13}\text{C}_6$ -Phe e $^{13}\text{C}_6$ -Tyr apresentem menor precisão e exatidão em comparação com o 3-OMD- D_3 , os resultados sugerem que podem ser adequados para fins de rastreio, representando uma alternativa viável com potencial para reduzir custos e simplificar o processo.

_Conclusão

Neste estudo o método FIA-MS/MS para quantificação de 3-OMD em amostras DBS foi adicionado com sucesso ao atual método multiplex de MS/MS já utilizado pelo Programa Nacional de Rastreio Neonatal (PNRN) para o rastreio neonatal de doenças metabólicas.

Quando conjugado com a prova de segundo nível desenvolvida, permite criar uma abordagem ao rastreio neonatal da deficiência em AADC com elevados níveis de sensibilidade e especificidade.

Este facto, associado à já existência na Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética, das técnicas para a confirmação das suspeitas de diagnóstico, nomeadamente a análise de neurotransmissores em LCR e estudos moleculares do gene DDC, possibilita ao PNRN equacionar a realização de um eventual estudo-piloto para o rastreio neonatal da deficiência em AADC.



Referências bibliográficas:

- (1) Hyland K, Surtees RA, Rodeck C, et al. Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: clinical features, diagnosis, and treatment of a new inborn error of neurotransmitter amine synthesis. *Neurology*. 1992 Oct;42(10):1980-8. <https://doi.org/10.1212/WNL.42.10.1980>
- (2) Brun L, Ngu LH, Keng WT, et al. Clinical and biochemical features of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Neurology*. 2010 Jul 6;75(1):64-71. Epub 2010 May 26. Erratum in: *Neurology*. 2010 Aug 10;75(6):576. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181e620ae>
- (3) Hyland K, Clayton PT. Aromatic amino acid decarboxylase deficiency in twins. *J Inher Metab Dis*. 1990;13(3):301-4. <https://doi.org/10.1007/BF01799380>
- (4) Himmelreich N, Bertoldi M, Alfadhel M, et al. Prevalence of DDC genotypes in patients with aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) deficiency and in silico prediction of structural protein changes. *Mol Genet Metab*. 2023 Jul;139(3):107624. Epub 2023 Jun 2. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2023.107624>. Erratum in: *Mol Genet Metab*. 2023 Aug;139(4):107647. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2023.107647>
- (5) Himmelreich N, Montioli R, Bertoldi M, et al. Aromatic amino acid decarboxylase deficiency: Molecular and metabolic basis and therapeutic outlook. *Mol Genet Metab*. 2019 May;127(1):12-22. Epub 2019 Mar 27. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2019.03.009>. Erratum in: *Mol Genet Metab*. 2021 Sep-Oct;134(1-2):216. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2021.06.010>
- (6) Wassenberg T, Molero-Luis M, Jeltsch K, et al. Consensus guideline for the diagnosis and treatment of aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) deficiency. *Orphanet J Rare Dis*. 2017 Jan 18;12(1):12. <https://doi.org/10.1186/s13023-016-0522-z>
- (7) Manegold C, Hoffmann GF, Degen I, et al. Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: clinical features, drug therapy and follow-up. *J Inher Metab Dis*. 2009 Jun;32(3):371-80. Epub 2009 Jan 28. <https://doi.org/10.1007/s10545-009-1076-1>
- (8) Yilmaz BS, Gurung S, Perocheau D, et al. Gene therapy for inherited metabolic diseases. *J Mother Child*. 2020 Nov 10;24(2):53-64. <https://doi.org/10.34763/jmotherandchild.20202402si.2004.000009>
- (9) Chien YH, Lee NC, Tseng SH, et al. Efficacy and safety of AAV2 gene therapy in children with aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: an open-label, phase 1/2 trial. *Lancet Child Adolesc Health*. 2017 Dec;1(4):265-73. Epub 2017 Oct 23. [https://doi.org/10.1016/S2352-4642\(17\)30125-6](https://doi.org/10.1016/S2352-4642(17)30125-6)
- (10) Kojima K, Nakajima T, Taga N, et al. Gene therapy improves motor and mental function of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Brain*. 2019 Feb 1;142(2):322-33. <https://doi.org/10.1093/brain/awy331>
- (11) Pearson TS, Gupta N, San Sebastian W, et al. Gene therapy for aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency by MR-guided direct delivery of AAV2-AADC to midbrain dopaminergic neurons. *Nat Commun*. 2021 Jul 12;12(1):4251. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24524-8>
- (12) François-Heude MC, Poulen G, Flamand Roze E, et al. Intraputamenal Gene Delivery in Two Patients with Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase Deficiency. *Mov Disord Clin Pract*. 2023 Feb 24;10(5):811-18. <https://doi.org/10.1002/mdc3.13685>
- (13) Keam SJ. Eladocagene Exuparvovec: First Approval. *Drugs*. 2022 Sep;82(13):1427-32. <https://doi.org/10.1007/s40265-022-01775-3>
- (14) Chien YH, Chen PW, Lee NC, et al. 3-O-methyl-dopa levels in newborns: Result of newborn screening for aromatic L-amino-acid decarboxylase deficiency. *Mol Genet Metab*. 2016 Aug;118(4):259-63. Epub 2016 May 16. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.05.011>
- (15) Brennenstuhl H, Kohlmüller D, Gramer G, et al. High throughput newborn screening for aromatic L-amino-acid decarboxylase deficiency by analysis of concentrations of 3-O-methyl-dopa from dried blood spots. *J Inher Metab Dis*. 2020 May;43(3):602-10. Epub 2020 Jan 6. <https://doi.org/10.1002/jimd.12208>
- (16) Burlina A, Giuliani A, Polo G, et al. Detection of 3-O-methyl-dopa in dried blood spots for neonatal diagnosis of aromatic L-amino-acid decarboxylase deficiency: The northeastern Italian experience. *Mol Genet Metab*. 2021 May;133(1):56-62. Epub 2021 Mar 13. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2021.03.009>
- (17) Chen PW, Hwu WL, Lee NC, et al. Streamlined determination of 3-O-methyl-dopa in dried blood spots: Prospective screening for aromatic L-amino-acid decarboxylase deficiency. *Mol Genet Metab*. 2023 Sep-Oct;140(1-2):107687. Epub 2023 Aug 15. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2023.107687>
- (18) Reischl-Hajjibadi AT, Okun JG, Kohlmüller D, et al. Newborn screening for aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency - Strategies, results, and implication for prevalence calculations. *Mol Genet Metab*. 2024 Mar;141(3):108148. Epub 2024 Jan 31. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2024.108148>
- (19) 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 Sep;38(3):324-31. <https://doi.org/10.1203/00006450-199509000-00009>