

Rastreio neonatal da deficiência em 3-metilcrotonil-CoA carboxilase em Portugal, 2004-2024

Neonatal Screening for 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency in Portugal, 2004-2024

Helena Fonseca, Ana Marcão, Carmen Sousa, Hugo Rocha, Laura Vilarinho

helenafonseca@insa.min-saude.pt

Unidade de Rastreio Neonatal Metabolismo e Genética. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

Resumo

A deficiência de 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase (3-MCC) é uma acidúria orgânica autossómica recessiva que está incluída nos programas de rastreio neonatal de vários países. Neste estudo são apresentados resultados obtidos principalmente do Programa de Rastreio Neonatal, recolhidos ao longo de um período de 19 anos. A análise dos genes MCCC1 e MCCC2 em 67 casos, permitiram identificar 39 mutações novas das quais 27 mutações descritas anteriormente pela Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Pretende-se com este trabalho dar a conhecer os resultados do rastreio neonatal da deficiência de 3-MCC em Portugal entre outubro de 2004 e março de 2024, e identificar e caracterizar as mutações causais destes doentes. Além disso, estas mutações foram analisadas no contexto do que é conhecido dos espectros mutacionais MCCC1 e MCCC2, informação que será útil na prática clínica e laboratorial.

Abstract

The deficiency of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase (3-MCC) is an autosomal recessive organic aciduria that is included in the newborn screening programs of several countries. This study reports data mainly obtained from the newborn screening program, collected over a nineteen years period. Analysis of the MCCC1 and MCCC2 genes in 67 cases, allowed the identification of 39 unreported mutations, including 27 mutations previously described by the Neonatal Screening, Metabolism and Genetics Unit of the National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge, Portugal.

The aim of this work is to make known the results of newborn screening for 3-MCC deficiency in Portugal, and to identify and characterize the causal mutations in these patients. In addition, these mutations were analyzed in the context of what is known of the MCCC1 and MCCC2 mutational spectra, information that will be useful in both clinical and laboratory practice.

Introdução

Em 2004, a introdução da espectrometria de massa em tandem (MS/MS), no rastreio neonatal, veio permitir a deteção de várias acidúrias orgânicas, incluindo a 3-metilcrotonilglicinúria. Esta acidúria orgânica é a mais frequente em programas de rastreio em populações europeias, americanas e australianas (1-6).

A metilcrotonilglicinúria (MCG; MIM 210200 e 210210) é uma doença genética de transmissão autossómica recessiva, causada pela deficiência na enzima 3-metilcrotonil-CoA carboxilase (3-MCC; EC 6.4.1.4). Esta enzima é uma das enzimas responsáveis pelo catabolismo do aminoácido leucina e é uma de quatro carboxilases dependentes de biotina conhecidas nos humanos; as outras três são a acetil-CoA carboxilase (ACC; EC: 6.4.1.2), a propionil-CoA carboxilase (PCC; EC: 6.4.1.3) e a piruvato carboxilase (PC; EC: 6.4.1.1). A deficiência em 3-MCC leva à acumulação de 3-metilcrotonil CoA, dentro da mitocôndria, e por vias alternativas à formação dos biomarcadores 3-metilcrotonilglicina (3-MCG) e ácido 3-hidroxisovalérico (3-HIVA).

O diagnóstico bioquímico é realizado pelo estudo dos ácidos orgânicos urinários, observando-se o aumento dos biomarcadores acima referidos, e pelo estudo do perfil de acilcarnitinas no sangue, onde é relevante o aumento da concentração de 3-hidroxisovalericarnitina (C5-OH) (7). É comum estes doentes terem uma deficiência secundária de carnitina, devido a sua conjugação com o 3-HIVA para uma posterior excreção urinária. Clinicamente, os doentes com deficiência de 3-MCC têm um crescimento e desenvolvimento normais até à ocorrência de um episódio agudo de descompensação metabólica, o que normalmente acontece entre 6 meses e 3 a 5 anos de idade (8). Este episódio é geralmente desencadeado por uma infeção ou pela introdução de alimentos ricos em proteínas na dieta.

A 3-MCC compreende duas hetero-subunidades organizadas num dodecâmero do tipo $\alpha_6\beta_6$. A subunidade α do 3-MCC é codificada pelo gene MCCC1, que está localizado no cromossoma 3q27 e abrange cerca de 70 kb de DNA genómico (9).

Este gene codifica uma proteína de 725 aminoácidos que tem um peso molecular de aproximadamente 80 kDa (7). A subunidade β é uma proteína de 563 aminoácidos, com um peso molecular de aproximadamente 61,8 kDa, codificado pelo gene MCCC2, localizado no cromossoma 5q12-q13 (1,710). Indivíduos com deficiência de 3-MCC possuem mutações nos genes MCCC1 ou MCCC2. As mutações identificadas na literatura estão distribuídas uniformemente em toda a sequência dos dois genes, sem qualquer evidência de “hot-spots” mutacionais (5). Estudos anteriores não estabelecem uma correlação genótipo-fenótipo nesta patologia, uma vez que nenhuma mutação parece estar exclusivamente associada a casos sintomáticos ou assintomáticos, ou a fenótipos leves ou graves da doença (1,5,7,10,11). Assim, é importante realçar que os dados clínicos, bioquímicos e genéticos parecem apoiar a conclusão de que outros fatores além dos genótipos dos loci MCCC1 e MCCC2 podem influenciar as consequências fenotípicas da deficiência de 3-MCC, incluindo genes modificadores e, talvez mais importante, até que ponto a via metabólica é sobrecarregada pela dieta ou outros fatores ambientais, como a metabolização excessiva de proteínas associada a infeções (12).

_Objetivo

Apresentar os resultados de 19 anos do rastreio neonatal da deficiência de 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase (3-MCC) em Portugal (entre outubro de 2004 e março de 2024), e identificar e caracterizar as mutações causais dos doentes MCG na população portuguesa.

_Material e métodos

Este estudo inclui 1.871.169 amostras de sangue em papel de filtro de recém-nascidos (RN) portugueses, colhidas maioritariamente entre o 3º e o 6º dia de vida, entre outubro de 2004 e março de 2024. A análise do perfil de acilcarnitinas por MS/MS permitiu identificar 62 RN com valores elevados de C5OH, biomarcador primário das acilcarnitinas para 3-MCC. O “cut-off” de C5OH > 1uM foi estabelecido pelo laboratório de rastreio neonatal (13).

Foram pedidas segundas amostras aos 62 RN e às respetivas mães após envio para Centro de Tratamento, para confirmar os valores elevados de C5OH e excluir aumento por causa materna. Foram excluídas outras doenças metabólicas através da análise bioquímica do perfil de ácidos orgânicos urinários.

Em 20 casos, as mães também tinham um valor aumentado de C5OH. Para além destes casos foram estudados 4 casos identificados no rastreio neonatal espanhol (duas mães e dois doentes) e um caso sintomático com 3 anos de idade de origem espanhola que apresentava atraso de desenvolvimento.

Os estudos genéticos foram efetuados por sequenciação direta de fragmentos amplificados por PCR, a partir de DNA genómico extraído de sangue seco em papel de filtro. Todos os exões dos genes MCCC1 e MCCC2, e as respetivas regiões intrónicas flanqueadoras, foram sequenciados pelo método de Sanger ou next generation sequencing (NGS).

Foram utilizadas ferramentas bioinformáticas para fazer as previsões *in silico* das mutações *missense* identificadas, bem como foram consultadas as bases de dados dos 1000 genomas e ExAC.

_Resultados e discussão

Foram identificados 67 casos, 62 portugueses e 5 espanhóis, com C5OH elevado. Em todos os casos foram estudados os genes MCCC1 e MCCC2, e em 65 casos foi identificado pelo menos um dos alelos mutado (tabela 1). Em dois casos (casos 15 e 16) não foi identificada nenhuma mutação em ambos os genes. Neste estudo foram identificadas 53 mutações diferentes: 27 destas mutações foram descritas em 2016 (14) e 12 são mutações ainda não descritas (figura 1A e B). A maioria das mutações foi identificada no gene MCCC2 (69%) (figura 1C) o que esta de acordo com publicações anteriores (11,15). A maioria dos casos (em 26 casos) são compostos heterozigóticos com mutações nos genes MCCC1 (3 casos) e MCCC2 (23 casos). Em 19 casos foram identificadas mutações em homozigotia, sete no gene MCCC1 (casos 1,

27, 39, 49, 50, 51 e 52) e doze no gene *MCCC2* (casos 5, 9, 14, 17, 26, 31, 37, 44, 46, 56, 58 e 64). Em 20 casos foi identificado apenas um alelo mutado (casos 2, 3, 4, 13, 20, 28, 33, 41, 42, 47, 53, 54, 55, 57, 61, 62, 63, 65, 66 e 67).

Quarenta e uma das mutações encontradas estão descritas na literatura, das quais 27 foram descritas por Fonseca *et al.* (figura 1A a vermelho) (1,10,11,14-19), enquanto 12 mutações são novas (p.Ser406Cys, p.Lys284Argfs*15, IVS10+2T>G, IVS15-1G>T e del exão1-6 no gene *MCCC1* e p.Asp340Gly, p.Phe359Leu, p.Asn480Ser, p.Ser498Phe, p.Glu456Serfs*10, c.1151delG e del exão7-8) no gene *MCCC2* (figura 1B).

Figura 1: ↓ Espectro molecular dos genes *MCCC1* e *MCCC2*.



Tabela 1: Fenótipo bioquímico e genótipo dos casos estudados.

Caso	Género	Origem	Fenótipo bioquímico			Genótipo			Fenótipo clínico
			CSOH	3-HIVA	3MCG	Gene afetado	alteração nucleotídeo	consequência na proteína	
1	M	portuguesa	4	++	++	MCCC1	c.388G>A/c.388G>A	p.Gly130Ser/p.Gly130Ser	assintomático
2	F	portuguesa	1.5	+	+	MCCC1	c.1147G>A/wt	p.Glu383Lys/wt	assintomático
3	M	portuguesa	1.3	nd	nd	MCCC1	c.924_925delAG/wt	p.Arg308Serfs*3/wt	assintomático
4	F	portuguesa	2.3	nd	nd	MCCC1	c.1155A>C/wt	p.Arg385Ser/wt	assintomático
5	F	portuguesa	14	++	++	MCCC2	c.100C>T/c.100C>T	p.Gln34*/p.Gln34*	assintomático
6	M	portuguesa	4.2	nd	nd	MCCC2	c.688A>G/c.641G>C	p.Asn230Asp/p.Gly214Ala	assintomático
7	F	portuguesa	1.9	+	nd	MCCC2	c.463C>T/c.1015G>A	p.Arg155Trp/p.Val339Met	assintomático
8	F	portuguesa	1	+	nd	MCCC2	c.203G>T/c.688A>G	p.G68V/p.Asn230Asp	assintomático
9	M	portuguesa	13.2	nd	nd	MCCC2	c.1229G>A/c.1229G>A	p.Gly410Asp/p.Gly410Asp	assintomático
10	F	portuguesa	4	+	nd	MCCC2	c.463C>T/c.1423G>A	p.Arg155Trp/ p.Gly475Arg	assintomático
11	F	portuguesa	2.4	+	nd	MCCC2	c.1015G>A/c.1635dupT	p.Val339Met/ p.Ser546*	assintomático
12	F	portuguesa	na	++	++	MCCC2	c.313G>C/c.487A>G	p.Gly105Arg/p.Asn230Asp	mãe assintomática
13	F	portuguesa	5.5	nd	nd	MCCC2	c.1015G>A/wt	p.Val339Met/wt	mãe assintomática
14	F	portuguesa	3	nd	nd	MCCC2	c.688A>G/c.688A>G	p.Asn230Asp/p.Asn230Asp	mãe assintomática
15	F	portuguesa	1	+	nd		wt/wt		mãe assintomática
16	F	portuguesa	1.2	nd	nd		wt/wt		mãe assintomática
17	M	espanhola	3.7	+	nd	MCCC2	c.517_518insT/c.1015G>A	p.Ser173Phefs*25/p.Val339Met	sintomático atraso de desenvolvimento
18	M	portuguesa	2.8	+	nd	MCCC2	c.1015G>A/c.1159T>G	p.Val339Met/p.Phe387Val	assintomático
19	F	portuguesa	2.9	nd	nd	MCCC2	c.599T>A/c.1216+2T>C	p.Ile200Asn/ IVS 13+2T>C	mãe assintomática
20	F	portuguesa	1.7	+	nd	MCCC1	c.98delT/wt	p.Val33Glyfs*7/wt	assintomático
21	M	portuguesa	4.7	nd	nd	MCCC2	c.688A>G/c.641G>C	p.Asn230Asp/p.Gly214Ala	assintomático
22	F	portuguesa	17	nd	nd	MCCC2	c.688A>G/c.1178A>C	p.Asn230Asp/p.Gln393Pro	assintomático
23	M	portuguesa	2.3	+	nd	MCCC2	c.1015G>A/c.1635_36insT	p.Val339Met/ p.Ser546*	assintomático
24	F	portuguesa	1.2	+	nd	MCCC2	c.1015G>A/c.1423G>A	p.Val339Met/ p.Gly475Arg	assintomático
25	F	espanhola	Na	++	++	MCCC2	c.648C>G/c.1176C>A	p.Cys216Trp/p.Cys392*	mãe assintomática
26	M	portuguesa	3.9	++	++	MCCC2	c.688A>G/c.688A>G	p.Asn230Asp/p.Asn230Asp	assintomático
27	F	portuguesa	15.5	nd	nd	MCCC1	c.1888_1892delGACAT/ c.1888_1892delGACAT	p.D630Sfs*27/ p.D630Sfs*27	mãe assintomática
28	F	espanhola	Na	nd	nd	MCCC1	c.640-2A>G/wt	IVS6-2A>G /wt	assintomático
29	M	portuguesa	4.3	+	nd	MCCC2	c.1015G>A/c.1228G>C	p.Val339Met/p.Gly410Arg	assintomático
30	M	portuguesa	2.9	+	nd	MCCC2	c.1015G>A/c.1570G>A	p.Val339Met/p.Ala524Thr	assintomático
31	F	portuguesa	27.6	++	++	MCCC2	c.1228G>C/c.1228G>C	p.Gly410Arg/p.Gly410Arg	mãe assintomática
32	F	portuguesa	2.1	+	nd	MCCC2	c.1015G>A/c.1381T>G	p.Val339Met/p.Phe461Val	assintomático
33	M	portuguesa	1.1	nd	nd	MCCC1	c.841C>A/wt	p.Arg281*/wt	assintomático
34	M	portuguesa	1.9	+	nd	MCCC2	1-100 A>G/c.652G>A	?/p.Ala218Thr	assintomático
35	F	portuguesa	5	nd	nd	MCCC2	1-100 A>G/c.1228G>C	?/ p.Gly410Arg	mãe assintomática
36	F	portuguesa	13.9	++	++	MCCC2	c.249delC/c.641G>C	p.Arg84Glyfs*8/p.Gly214Ala	assintomático
37	F	espanhola	Na	nd	nd	MCCC2	c.953A>G/c.953A>G	p.Tyr318Cys/ p.Tyr318Cys	mãe assintomática
38	F	portuguesa	2.8	nd	nd	MCCC2	c.100C>T/ c.599T>A	p.Gln34*/ p.Ile200Asn	mãe assintomática
39	F	portuguesa	18.6	nd	nd	MCCC1	c.359C>T/c.359C>T	p.Ser120Phe/p.Ser120Phe	mãe assintomática
40	M	portuguesa	0.9	+	nd	MCCC2	c.304C>T/c.1322T>G	p.Gln102*/p.Ile441Thr	sintomático
41	M	espanhola	0.7	+	+	MCCC1	c.873G>A/ WT	?/WT	assintomático
42	M	portuguesa	1.36			MCCC1	c.388G>A/WT	p.Gly130Ser/WT	assintomático
43	M	portuguesa	3.4			MCCC1	c.872C>T/ c.640-2A>G	p.Ala291Val/?	assintomático
44	F	portuguesa	16.1	+	+	MCCC2	c.688A>G/c.688A>G	p.Asn230Asp/p.Asn230Asp	mãe assintomática
45	M	portuguesa	2.2	+	+	MCCC1	c.1155A>C/c.1772G>A	p.Arg385Ser/p.Ser591Asn	assintomático
46	F	portuguesa	5	+	+	MCCC2	c.1075T>C/c.1075T>C	p.Phe359Leu/p.Phe359Leu	mãe assintomática
47	F	portuguesa	1.27	+	na	MCCC2	c.1439A>G/WT	p.Asn480Ser/WT	assintomático
48	F	portuguesa	2.7	+	na	MCCC2	c.1015G>A/c.1381T>G	p.Val339Met/p.Phe461Val	assintomático

(cont.)

artigos breves_ n. 10

Caso	Género	Origem	Fenótipo bioquímico			Genótipo			Fenótipo clínico
			C5OH	3-HIVA	3MCG	Gene afetado	alteração nucleotídeo	consequência na proteína	
49	M	portuguesa	2.7	+	+	MCCC1	c.1302T>G/c.1302T>G	p.Ile434Met/p.Ile434Met	assintomático
50	F	portuguesa	17.9	+	+	MCCC1	c.872C>T/c.872C>T	p.Ala291Val/p.Ala291Val	mãe assintomática
51	F	portuguesa	5.6	+	+	MCCC1	c.1302T>G/c.1302T>G	p.Ile434Met/p.Ile434Met	mãe assintomática
52	F	portuguesa	15.2	+	+	MCCC1	c.388G>A/c.388G>A	p.Gly130Ser/p.Gly130Ser	mãe assintomática
53	F	portuguesa	1.1	+	na	MCCC1	c.1083+2T>G/wt	?/WT	assintomático
54	F	portuguesa	2.9	+	+	MCCC2	c.1019A>G/WT	p.Asp340Gly/WT	assintomático
55	M	portuguesa	1.5	-	+	MCCC1	c.851delA/WT	p.Lys284Argfs*15/WT	assintomático
56	F	portuguesa	24.2	+	+	MCCC2	del7-8/del7-8	?	mãe assintomática
57	M	portuguesa	1	+	na	MCCC1	c.1155A>C/WT	p.Arg385Ser/WT	assintomático
58	F	portuguesa	10.2	+	+	MCCC2	c.688A>G/c.688A>G	p.Asn230Asp/p.Asn230Asp	mãe assintomática
59	M	portuguesa	2.8	+	+	MCCC1	c.872C>T/c.1217C>G	p.Ala291Val/p.Ser406Cys	assintomático
60	M	portuguesa	1.97	+	na	MCCC2	c.1493C>T/c.1632dupT	p.Ser498Phe/p.Ser546*	assintomático
61	M	portuguesa	1.5	na	na	MCCC1	c.924_925delAG/WT	p.Arg308Serfs*3/WT	assintomático
62	F	portuguesa	1.2	+	+	MCCC1	c.1732-1G>T/WT	?/WT	assintomático
63	F	portuguesa	1.5	na	na	MCCC2	c.1426delG/WT	p.Glu456Serfs*10/WT	mãe assintomática
64	F	?	19.9	+	+	MCCC2	c.653C>T/ c.653C>T	p.Ala218Val/p.Ala218Val	mãe assintomática
65	M	portuguesa	1	na	na	MCCC1	c.872C>T/WT	p.Ala291Val/WT	assintomático
66	M	portuguesa	1.1	+	na	MCCC1	del1-6/WT	?/WT	assintomático
67	F	portuguesa	1.6	na	na	MCCC2	c.1151delG/WT	?/WT	assintomático

Em dois doentes não foi identificada nenhuma mutação nos genes MCCC1 e MCCC2 (casos 15 e 16), enquanto que em vinte doentes foi identificada uma única mutação, 15 no gene MCCC1 (casos 2, 3, 4, 20, 28, 33, 41, 42, 53, 55, 57, 61, 62, 65 e 66) e cinco no gene MCCC2 (caso 13, 47, 54, 63 e 67), embora todos apresentassem um aumento de C5OH. Nestes casos, é possível estarmos perante uma grande deleção/ inserção, mutações em zonas regulatórias ou mutações intrónicas profundas podendo contribuir para o fenótipo bioquímico observado (20; 21; 22; 23), portanto, mais estudos são necessários para validar estas hipóteses. No entanto, há evidências recentes que sugerem que a presença de uma única mutação patogénica em heterozigotia nos genes MCCC1 ou MCCC2 pode levar à elevação dos metabolitos característicos da deficiência de 3-MCC, embora os autores ressalvem a necessidade de ensaios da atividade enzimática para confirmar a deficiência da enzima envolvida (24). Em relações quinze doentes portadores de uma única mutação no gene MCCC1, em dois deles foi identificada uma mutação descrita (Arg385Ser) como tendo um efeito dominante negativo na presença do alelo *wild-type* (25); cinco são mutações *frameshift*,

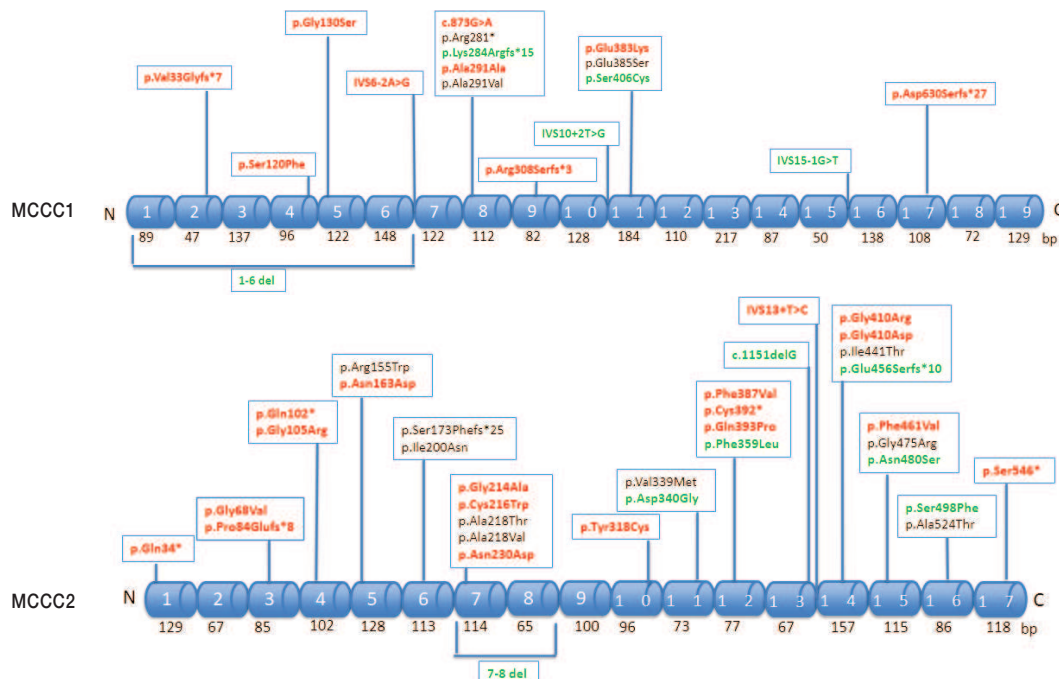
uma mutação *nonsense*; duas são mutações *missense*; três mutações de *splicing* e uma grande deleção. A outra mutação *missense* identificada num dos doentes, Glu383Lys está próxima da mutação Arg385Ser e, portanto, pode também ter um efeito dominante negativo. Todos esses doentes têm valor médio de C5OH de 1,3 µM, o que está de acordo com um fenótipo bioquímico *mild*. No gene MCCC2 foi identificado uma única mutação nos casos 13, 47, 54, 63 e 67, sendo três mutações *missense*; uma mutação *frameshift* e uma deleção que ocorre numa zona repetitiva de G, na junção intrão/ exão 13. No caso do doente 13, que apresentou um valor de C5OH de 5,5 µM, é provável que o segundo alelo afetado possa ser uma grande duplicação/deleção ou uma mutação na zona regulatória uma vez que este doente tem uma mutação *missense* que também está presente em outros doentes heterozigotos compostos com valores de C5OH mais baixos (casos 7, 11, 17, 18, 23, 24, 29, 30, 32 e 48). Apesar da maioria dos casos identificados serem devidos a mutações no gene MCCC2, como referido anteriormente, é entre os doentes com alteração no gene MCCC1 que se observa o maior número de casos apenas com um alelo identificado. As mutações

encontradas nestes casos são mutações *missense* com efeito dominante negativo ou mutações que originam um efeito severo na proteína como sejam grandes deleções ou mutações *frameshift*. Este facto poderá sugerir uma maior relevância para a subunidade α da 3-MCC, correspondente ao domínio biotina carboxilase da proteína, podendo uma ligeira diminuição da sua atividade ser suficiente para desencadear um fenótipo bioquímico e eventualmente clínico. Em relação aos casos 15 e 16, duas mães assintomáticas sem mutações identificadas nos genes MCCC1 e MCCC2, os níveis aumentados de C5OH podem estar relacionados com um défice de biotina, que comprometeria o funcionamento normal das enzimas dependentes de biotina (26). A deficiência parcial em biotinidase (OMIM 253260), também poderá explicar o perfil bioquímico observado nestas mães, uma vez que a reciclagem de biotina estaria comprometida. Mais estudos serão necessários para confirmar ou refutar estes pressupostos.

Updated espectro mutacional

Até a data foram descritas um total de 341 mutações nos genes MCCC1 e MCCC2, das quais 27 foram descritas pela Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (14) e este número continua a aumentar com o crescente número de casos descritos a partir do rastreio neonatal (*Human Gene Mutation Database*). Neste estudo, foram identificadas 12 novas mutações, correspondendo a cinco *missense*, duas microdeleções, três mutações que afetam o *splicing*. A figura 2 representa o espectro mutacional dos genes MCCC1 e MCCC2 nos doentes incluídos neste estudo. As mutações estão distribuídas ao longo dos genes MCCC1 e MCCC2 que codificam o domínio da biotina carboxilase e o domínio carboxi-transferase, respetivamente. Como seria esperado as mutações surgem nos locais mais conservados

Figura 2: Mapa linear dos genes MCCC1 (painel superior) e MCCC2 (painel inferior) com mutações encontradas neste estudo, representadas conforme ocorrem nos respetivos exões.



Os tamanhos dos exões são indicados abaixo da caixa de cada exão. Novas mutações estão a verde e as mutações descritas em 2016 por Fonseca *et al.* a vermelho, mutações descritas noutros estudos estão a preto. A nomenclatura seguiu as recomendações do HGVS (27)

dos genes, sendo também importante notar que, para ambos os genes, as mutações associadas à doença foram descritas em todas as zonas exónicas, o que aponta para a necessidade de sequenciação de todo o gene, bem como junções exão / intrão em indivíduos afetados. No gene *MCCC1* são atualmente conhecidas, 110 mutações *missense/nonsense*, 18 mutações que afetam o *splicing*, uma mutação regulatória, 26 microdeleções, nove microinserções, três indels e seis grandes deleções. No gene *MCCC2* foram descritas 125 mutações *missense/nonsense*, 22 mutações de *splicing*, nove microdeleções, seis microinserções, quatro *indels* e duas grandes deleções (*Human Gene Mutation Database*).

_Conclusões

Vários estudos mostraram que, em alguns casos de deficiência de 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase (3-MCC), o fenótipo clínico compreende a descompensação metabólica com hipoglicemia, cetonemia e acidose metabólica grave.

O diagnóstico é importante, porque pode evitar ou encurtar os períodos de descompensação metabólica associadas a doenças intercorrentes nos doentes afetados.

Embora a deficiência de 3-MCC não possa ser considerada uma deficiência com risco de vida, pode ser melhor definida como um fenótipo bioquímico com baixa penetrância clínica, o seu rastreio é importante para estabelecer um tratamento em situações de *stress* metabólico, tais como infeções recorrentes (doenças intercorrentes).

A prevenção de uma deficiência de carnitina, que é muito comum observar nestes doentes, e que pode levar à fadiga extrema, é também importante, sendo facilmente resolvida após suplementação com L-carnitina (5,15,28,29).

Referências bibliográficas:

- (1) Baumgartner MR, Almashanu S, Suormala T, et al. The molecular basis of human 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *J Clin Invest*. 2001 Feb;107(4):495-504. <https://doi.org/10.1172/JCI11948>
- (2) Frazier DM, Millington DS, McCandless SE, et al. The tandem mass spectrometry newborn screening experience in North Carolina: 1997-2005. *J Inher Metab Dis*. 2006 Feb;29(1):76-85. <https://doi.org/10.1007/s10545-006-0228-9>
- (3) Gibson KM, Bennett MJ, Naylor EW, et al. 3-Methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase deficiency in Amish/Mennonite adults identified by detection of increased acylcarnitines in blood spots of their children. *J Pediatr*. 1998 Mar;132(3 Pt 1):519-23. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(98\)70032-0](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(98)70032-0)
- (4) Koeberl DD, Millington DS, Smith WE, et al. Evaluation of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency detected by tandem mass spectrometry newborn screening. *J Inher Metab Dis*. 2003;26(1):25-35. <https://doi.org/10.1023/a:1024015227863>
- (5) Stadler SC, Polanetz R, Maier EM, et al. Newborn screening for 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: population heterogeneity of MCCA and MCCB mutations and impact on risk assessment. *Hum Mutat*. 2006 Aug;27(8):748-59. <https://doi.org/10.1002/humu.20349>
- (6) Wilcken B, Wiley V, Hammond J, et al. Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *N Engl J Med*. 2003 Jun 5;348(23):2304-12. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa02522>
- (7) Holzinger A, Röschinger W, Lagler F, et al. Cloning of the human MCCA and MCCB genes and mutations therein reveal the molecular cause of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *Hum Mol Genet*. 2001 Jun 1;10(12):1299-306. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.12.1299>
- (8) Sweetman L. Branched chain organic acidurias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al. (eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill, 2001. pp. 2125-63.
- (9) Obata K, Fukuda T, Morishita R, et al. Human biotin-containing subunit of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase gene (MCCA): cDNA sequence, genomic organization, localization to chromosomal band 3q27, and expression. *Genomics*. 2001 Mar 1;72(2):145-52. <https://doi.org/10.1006/geno.2000.6366>
- (10) Gallardo ME, Desviat LR, Rodríguez JM, et al. The molecular basis of 3-methylcrotonylglycinuria, a disorder of leucine catabolism. *Am J Hum Genet*. 2001 Feb;68(2):334-46. <https://doi.org/10.1086/318202>
- (11) Dantas MF, Suormala T, Randolph A, et al. 3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: mutation analysis in 28 probands, 9 symptomatic and 19 detected by newborn screening. *Hum Mutat*. 2005 Aug;26(2):164. <https://doi.org/10.1002/humu.9352>
- (12) Wolfe LA, Finegold DN, Vockley J, et al. Potential misdiagnosis of 3-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase deficiency associated with absent or trace urinary 3-methylcrotonylglycine. *Pediatrics*. 2007 Nov;120(5):e1335-40. <https://doi.org/10.1542/peds.2007-0674>
- (13) Vilarinho L, Rocha H, Sousa C, et al. Four years of expanded newborn screening in Portugal with tandem mass spectrometry. *J Inher Metab Dis*. 2010 Dec;33 Suppl 3:S133-8. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9048-z>
- (14) Fonseca H, Azevedo L, Serrano C, et al. 3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: Mutational spectrum derived from comprehensive newborn screening. *Gene*. 2016 Dec 15;594(2):203-210. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.09.003>
- (15) Grünert SC, Stucki M, Morscher RJ, et al. 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: clinical, biochemical, enzymatic and molecular studies in 88 individuals. *Orphanet J Rare Dis*. 2012 May 29;7:31. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-7-31>
- (16) Arnold GL, Salazar D, Neidich JA, et al. Outcome of infants diagnosed with 3-methylcrotonyl-CoA-carboxylase deficiency by newborn screening. *Mol Genet Metab*. 2012 Aug;106(4):439-41. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.04.006>
- (17) Calvo SE, Tucker EJ, Compton AG, et al. High-throughput, pooled sequencing identifies mutations in NUBPL and FOXRED1 in human complex I deficiency. *Nat Genet*. 2010 Oct;42(10):851-8. <https://doi.org/10.1038/ng.659>

artigos breves_ n. 10

- (18) Morscher RJ, Grünert SC, Bürer C, et al. A single mutation in MCCC1 or MCCC2 as a potential cause of positive screening for 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *Mol Genet Metab.* 2012 Apr;105(4):602-6. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.12.018>
- (19) Adhikari AN, Gallagher RC, Wang Y, et al. The role of exome sequencing in newborn screening for inborn errors of metabolism. *Nat Med.* 2020 Sep;26(9):1392-97. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0966-5>
- (20) Ferreira F, Esteves S, Almeida LS, et al. Trimethylaminuria (fish odor syndrome): genotype characterization among Portuguese patients. *Gene.* 2013 Sep 15;527(1):366-70. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.05.025>
- (21) Quental R, Azevedo L, Rubio V, et al. Molecular mechanisms underlying large genomic deletions in ornithine transcarbamylase (OTC) gene. *Clin Genet.* 2009 May;75(5):457-64. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2009.01172.x>
- (22) Wang J, Zhan H, Li FY, et al. Targeted array CGH as a valuable molecular diagnostic approach: experience in the diagnosis of mitochondrial and metabolic disorders. *Mol Genet Metab.* 2012 Jun;106(2):221-30. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.03.005>
- (23) Azevedo L, Stojnaja L, Tietzeova E, et al. New polymorphic sites within ornithine transcarbamylase gene: population genetics studies and implications for diagnosis. *Mol Genet Metab.* 2003 Feb;78(2):152-7. [https://doi.org/10.1016/s1096-7192\(03\)00019-2](https://doi.org/10.1016/s1096-7192(03)00019-2)
- (24) Morscher RJ, Grünert SC, Bürer C, et al. A single mutation in MCCC1 or MCCC2 as a potential cause of positive screening for 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *Mol Genet Metab.* 2012 Apr;105(4):602-6. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.12.018>
- (25) Baumgartner MR. Molecular mechanism of dominant expression in 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *J Inher Metab Dis.* 2005;28(3):301-9. <https://doi.org/10.1007/s10545-005-7054-3>
- (26) Mock DM, Quirk JG, Mock NI. Marginal biotin deficiency during normal pregnancy. *Am J Clin Nutr.* 2002 Feb;75(2):295-9. <https://doi.org/10.1093/ajcn/75.2.2956>
- (27) den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat.* 2000;15(1):7-12. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(200001\)15:1<7::AID-HUMU4>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(200001)15:1<7::AID-HUMU4>3.0.CO;2-N). Erratum in: *Hum Mutat* 2002 Nov;20(5):403
- (28) Thomsen JA, Lund AM, Olesen JH, et al. Is L-Carnitine Supplementation Beneficial in 3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase Deficiency? *JIMD Rep.* 2015;21:79-88. https://doi.org/10.1007/8904_2014_393
- (29) Gonçalves MM, Marcão A, Sousa C, et al. Portuguese Neonatal Screening Program: A Cohort Study of 18 Years Using MS/MS. *Int J Neonatal Screen.* 2024 Mar 20;10(1):25. <https://doi.org/10.3390/ijns10010025>