

# LA PREVENZIONE DELL'ENCEFALOPATIA NELL'ACIDURIA METILMALONICA: REVISIONE CRITICA ED ATTUALI CONTROVERSIE ATTRAVERSO LA DESCRIZIONE DI DUE PAZIENTI DIAGNOSTICATI IN FASE PRESINTOMATICA E TRATTATI PRECOCEMENTE

*Preventing encephalopathy in methylmalonic aciduria: a review of present controversies through the description of two, early treated, asymptomatic cases*

A. Celato  
V. Vitale  
Cl. Carducci\*  
Ca. Carducci\*  
V. Leuzzi

*Dipartimento di Scienze Neurologiche Psichiatriche e Riabilitative dell'Età Evolutiva, Sapienza Università di Roma; \* Dipartimento di Medicina Sperimentale e Patologia, Sapienza Università di Roma*

## RIASSUNTO

L'aciduria metilmalonica (MMAs), isolata o combinata con omocistinuria, comprende un gruppo eterogeneo di malattie causate dalla mutazione di più possibili geni che codificano per la metilmalonil-CoA mutasi (MCM) o per una delle proteine coinvolte nella sintesi dei derivati della cobalamina. In questo articolo viene descritto il fenotipo clinico-biochimico di due pazienti sottoposti a screening neonatale il cui profilo biochimico, nei due spot di sangue raccolti in terza giornata di vita, analizzato tramite spettrometria tandem mass (MS/MS), ha evidenziato un aumento della propionilcarnitina (C3) ed una alterazione del rapporto fra propionilcarnitina/acetilcarnitina (rapporto C3/C2) associati ad un aumento dell'acido metilmalonico nelle urine, non correggibile a seguito di implementazione con idrossicobalamina. Il quadro biochimico, compatibile con una diagnosi di aciduria metilmalonica isolata, è stato confermato con sequenziamento diretto del gene della metilmalonil-CoA mutasi che ha evidenziato un quadro di eterozigosi composta per due mutazioni (N219Y, R694W) precedentemente descritte in letteratura ed associate ad un fenotipo clinico mild ( $mut^0/mut^-$ ). I due pazienti, attualmente di 5 ed 1 anno e mezzo d'età rispettivamente, sono stati sottoposti a controlli clinici seriati a partire dai primi giorni di vita ed hanno mostrato un normale sviluppo psicomotorio con uno sfumato ritardo di crescita staturale-ponderale e seguono tuttora un regime dietetico dedicato. Lo screening neonatale tramite spettrometria tandem mass ha permesso di dimostrare come, nel caso dell'aciduria metilmalonica, il rapporto C3/C2 rappresenti, prima ancora dello studio genetico, un marker affidabile per una diagnosi precoce. I due casi di aciduria metilmalonica descritti hanno presentato un decorso clinico completamente asintomatico sottolineando nuovamente l'importanza di un intervento terapeutico precoce nella prevenzione dei sintomi associati alla malattia.

## SUMMARY

*Methylmalonic acidurias (MMAs) comprise an heterogeneous group of disorders, isolated or combined with homocystinuria, due to a deficiency in methylmalonyl-CoA mutase or to a defect in any of the proteins involved in cobalamin cofactors synthesis. In this paper we critically discuss the role of newborn screening in methylmalonic aciduria patients through the description of the biochemical and clinical phenotype of two early detected MMA brothers. Tandem mass spectrometry (MS/MS) was used in the analysis of derivatized acylcarnitines in blood spots collected at 3 days of life revealing an elevations in propionylcarnitine (C3) and a higher propionylcarnitine/acetylarnitine (C3/C2) ratio. Urine methylmalonic acid excretions were increased, not reducing after hydroxocobalamin administration, consistent with an isolated MMA diagnosis. Direct sequencing of methylmalonyl-CoA mutase genes demonstrated a compound heterozygosity for two previously described mutations (N219Y, R694W), associated to a mild clinical phenotype ( $mut^0/mut^-$ ). Patients are now 5 and 1 and a half years old of age respectively, follow a specific dietary regimen and have been regularly evaluated since the first days of life showing a normal psychomotor development and a slight statural-ponderal delay. Neonatal screening based on tandem mass spectrometry demonstrate that C3/C2 ratio represent, in advance to molecular genetic testing, a reliable marker for early MMA patients detection. Our cases, though the mild infantile onset methylmalonic aciduria genotype, are presently asymptomatic rising the question on how a precocious therapeutic intervention play a key role in preventing symptoms.*

### PAROLE CHIAVE

Acidurie organiche - Aciduria metilmalonica - Propionilcarnitina (C3) - Acetilcarnitina (C2)

### KEY WORDS

Organic acidurias - Methylmalonic aciduria - Propionylcarnitine (C3) - Acetylarnitine (C2)

## INTRODUZIONE

L'aciduria metilmalonica rappresenta, insieme all'aciduria propionica, la forma più frequente di aciduria organica a catena ramificata (branched-chain organic acidurias, BCOA)<sup>1</sup> secondaria ad un difetto nel catabolismo degli amminoacidi a catena ramificata e di altri precursori dell'acido propionico. La malattia, nella sua forma classica, presenta una incidenza variabile fra 1:50.000 ed 1:80.000 nati<sup>2</sup> e può presentarsi in forma isolata oppure in forma combinata con omocistinuria (Fig. 1).

L'aciduria metilmalonica isolata (determinata da un deficit di metilmalonil-CoA mutasi, MCM), nello specifico, è una malattia autosomica recessiva dovuta ad una mutazione di un gene localizzato sul cromosoma 6p21 che codifica per l'enzima responsabile della conversione del L-metilmalonil CoA in succinil CoA. Sinora sono state descritte circa 200 mutazioni differenti<sup>12</sup> che determinano deficit parziali (*mut*<sup>+</sup>) o completi dell'enzima (*mut*<sup>0</sup>) ma risulta di difficile definizione una correlazione genotipo/fenotipo ed una correlazione fenotipo/attività enzimatica residua visto il fenomeno di complementazione interallelica dovuto alla prevalenza di pazienti eterozigoti composti<sup>13-15</sup>. Su un piano clinico la malattia presenta una ampia variabilità fenotipica e può manifestarsi sotto forma di una patologia neonatale grave, come malattia infantile di gravità intermedia, come quadro ad andamento intermittente oppure sotto forma di un fenotipo lieve ad esordio nell'adulto. Nella maggioranza dei casi la malattia esordisce in fase neonatale con uno scompenso metabolico acuto (vomito ricorrente, disidratazione, distress respiratorio, letargia progressiva, ipotonia, convulsioni e coma), mentre nelle varianti ad esordio tardivo episodi di scompenso acuto si alternano a segni e sintomi di interessamento cronico (distonia progressiva, deficit di crescita e di sviluppo, cardiomiopatia, nefropatia, pancreatopatia, interessamento oculare, leuco e trombocitopenia).

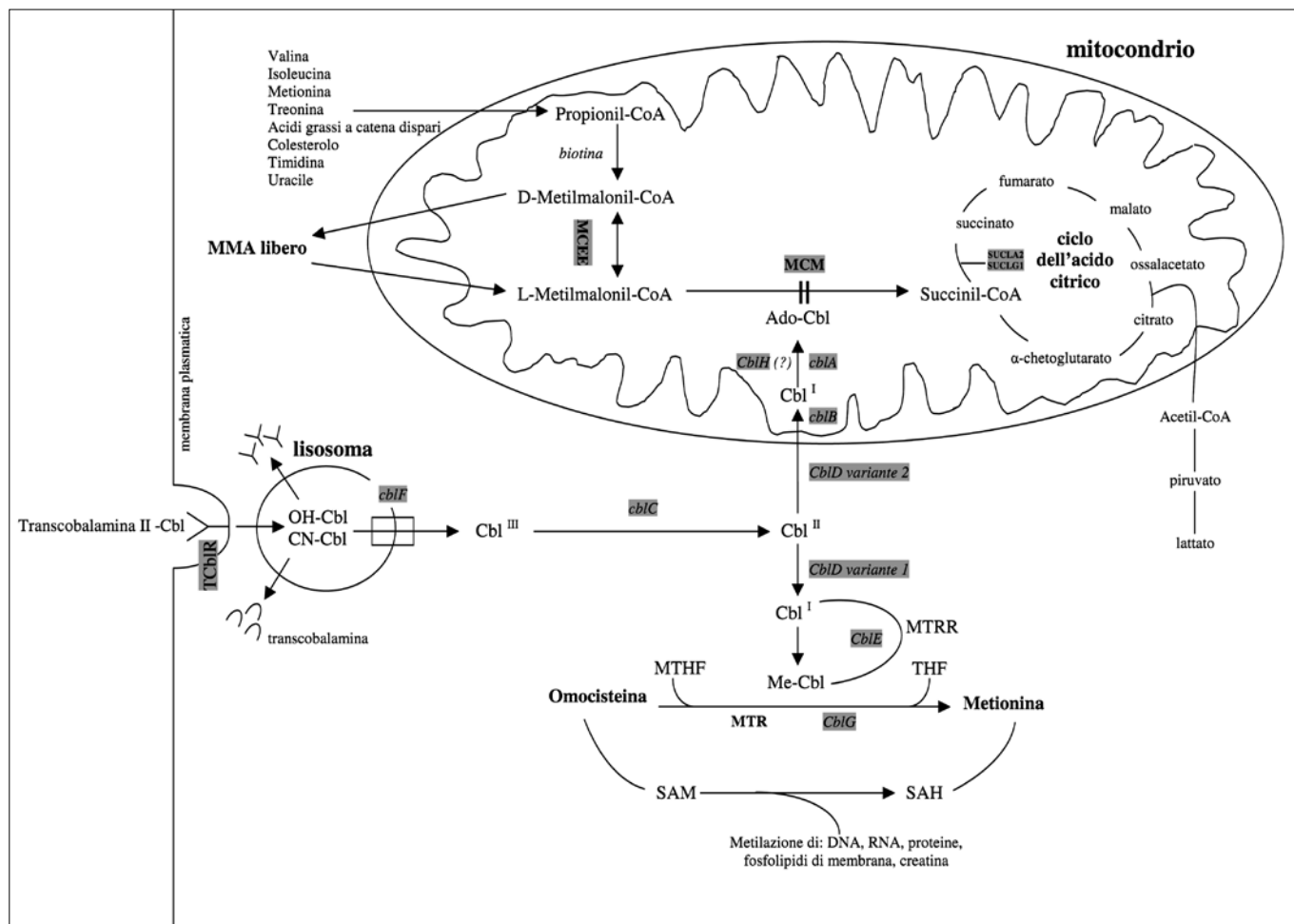
Su un piano neurologico la malattia si associa ad un quadro encefalopatico progressivo caratterizzato su un piano clinico da ritardo mentale, epilessia e disturbi del movimento e su un piano dell'interessamento cerebrale da lesioni necrotico-cistiche simmetriche dei gangli della base (con interessamento prevalente del globus pallidus), dilatazione ventricolare, atrofia

cerebrale, difetto di mielinizzazione ed ipoplasia del corpo calloso<sup>16</sup>. Le lesioni dei gangli della base o "metabolic stroke"<sup>17</sup>, spesso correlati con gli attacchi acuti di scompenso metabolico, sono osservabili anche in altre forme di aciduria organica.

La diagnosi deriva, su un piano biochimico, da uno studio del profilo degli acidi organici urinari e delle acilcarnitine che mostra, nei pazienti affetti, un aumento dei valori dell'acido metilmalonico associato ad un incremento dei derivati del propionil-CoA (acido metilcitricono, acido idrossipropionico) e, in seconda istanza, dallo studio genetico-molecolare. In questo articolo ci occuperemo di delineare il fenotipo clinico-biochimico di due pazienti affetti da aciduria metilmalonica isolata, dovuta ad un deficit di MCM, diagnosticati tramite screening neonatale con la finalità di discutere criticamente il ruolo di una diagnosi precoce e di un intervento terapeutico mirato nel prevenire sintomi acuti e cronici della malattia.

## CASI CLINICI

Il *paziente 1*, figlio di genitori non consanguinei, nato a termine da parto eutocico (peso alla nascita 3,270 kg, Apgar 10 al 1° e 5° minuto) è stato sottoposto, in terza giornata di vita, a screening metabolico neonatale tramite spettrometria tandem mass (MS/MS) su spot di sangue (PerkinElmer MS2 kit) che ha mostrato un incremento dei livelli di propionilcarnitina (C3: 4,38  $\mu$ M) di poco inferiore al cut off (cut off: 4,60  $\mu$ M) ed un aumento del rapporto propionilcarnitina/acetilcarnitina (C3/C2:0,20; cut off: 0,18). Alla gascromatografia/spettrometria di massa (GC/MS) veniva rilevato un incremento dell'escrezione urinaria di acido metilmalonico non correggibile a seguito di implementazione con vitamina B<sub>12</sub>. Il sequenziamento diretto dei 13 esoni e delle giunzioni introni-esoni del gene della MCM ha evidenziato un genotipo eterozigote composto per due mutazioni precedentemente descritte in letteratura, c.655A > T (p.N219Y) e c.2080C > T (p.R694W), associate ad un fenotipo mild (*mut*<sup>0</sup>/*mut*<sup>+</sup>). Il paziente ha, da allora, seguito una dieta ipoproteica associata ad assunzione di carnitina, vitamina B<sub>12</sub> ed integratori ad elevato contenuto energetico e privi di valina, treonina, metionina ed isoleucina.



**Fig. 1.** Aciduria metilmalonica isolata e combinata: via metabolica.

Il complesso cobalamina(Cbl)-transcobalamina II viene sottoposto ad uptake a seguito del legame con uno specifico recettore di membrana (TCbIR/CD320), viene trasportato in sede lisosomiale e, come idrossi e cianocobalamina (OH-Cbl, CN-Cbl), viene convertita in forme progressivamente più attive della vitamina (Cbl<sup>III</sup>, Cbl<sup>II</sup>, Cbl<sup>I</sup>) fino alla biosintesi di adenosilcobalamina (Ado-Cbl) e di metilcobalamina (Me-Cbl), coenzimi essenziali rispettivamente della metilmalonil-Coa mutasi (MCM) e della metiltetraidrofolato:omocisteina S-metiltransferasi o metionina sintetasi (MTR). L'aciduria metilmalonica isolata può essere determinata da un deficit della metilmalonil-Coa mutasi (MCM), enzima della matrice mitocondriale che catalizza l'isomerizzazione dello L-metilmalonil-CoA in Succinil-CoA lungo la via di degradazione del propionato (propionil-CoA) attraverso il ciclo dell'acido citrico o ciclo di Krebs, o ad un difetto della sintesi e del trasporto dell'adenosilcobalamina (Ado-Cbl). Deficit parziali (*mut<sup>o</sup>*) o completi (*mut<sup>o</sup>*) della MCM, deficit di proteine coinvolte nella biosintesi della Ado-Cbl (*cblA*, *cblB* e *cblD* variante 2) o della metilmalonil-CoA epimerasi<sup>3</sup> (MCEE) determinano un accumulo di L e D- metilmalonil-CoA ed aumento dei livelli di acido metilmalonico libero (MMA libero). Una forma atipica di aciduria metilmalonica è quella determinata da una disfunzione di un enzima mitocondriale, la succinil-CoA sintetasi formante ADP, codificata dai geni *SUCLA2*<sup>4,5</sup> e *SUCLG1*<sup>6</sup>. L'aciduria metilmalonica combinata ad omocistinuria è invece un disturbo nel metabolismo dell'omocisteina-folati con deficit nella sintesi della Ado-Cbl e della metilcobalamina (Me-Cbl), coenzimi essenziali rispettivamente della MCM e della MTR ed è determinata da una disfunzione di più proteine (*cblC*, *cblD* variante 1, *cblE*, *cblG*, *cblH*), di altre coinvolte nel rilascio lisosomiale (*cblF*) o nella biosintesi della Ado e Me-Cbl (quest'ultima catalizzata dalla metionina sintasi riduttasi [MTRR]). La variante H, che sembrava appartenere ad un nuovo gruppo di complementazione<sup>7</sup>, contemporaneamente affrisce al gruppo *cblD* variante 2<sup>8</sup>. L'accumulo di omocisteina è determinato da un deficit della MTR, enzima responsabile della conversione della omocisteina in metionina con contemporanea cessione di gruppi metilici da parte del metiltetraidrofolato (MTHF) convertito in tetraidrofolato (THF). L'aciduria metilmalonica, in forma isolata o combinata, può infine essere determinata da un difetto nel recettore di membrana (TCbIR/CD320)<sup>9,10</sup>. Il metabolismo dell'omocisteina-metionina passa anche attraverso la conversione della S-adenosilomocisteina (SAH) in S-adenosilmetionina (SAM) ed alcuni Autori<sup>11</sup> hanno ipotizzato che alla base della compromissione neurologica riscontrata in alcune varianti di aciduria metilmalonica combinata (*cblC*) possa esserci un deficit del metabolismo della creatina, simile a quello riscontrato nei pazienti affetti da deficit di guanidinoacetato metiltransferasi (GAMT) con accumulo di acido guanidinoacetico (GAA), dovuto ad un deficit di gruppi metilici labili, substrati della GAMT, secondario ad una diminuzione dei livelli di SAM associato ad un feedback negativo della SAH, prodotto dalla GAMT, sull'enzima stesso.

Ai successivi controlli clinici (età attuale 5 anni) il paziente ha mostrato uno sviluppo neuromotorio adeguato all'età, un accrescimento staturoponderale nella norma (peso: 50°c altezza: 25°c) ed un normale sviluppo intellettivo (scala Wechsler Preschool and Scale Of Intelligence, WPPSI: QIT:104, QIV:110, QIP:97) e, sul piano dei dati di laboratorio, è stato possibile rilevare una progressiva normalizzazione delle acilcarnitine e degli acidi organici urinari con alterazione degli stessi rispetto alla norma in coincidenza con periodi di non completa aderenza al regime dietetico (Fig. 2). Uno studio di risonanza magnetica con spettroscopia non ha evidenziato alcuna alterazione anatomica né apparenti alterazioni dei profili spettroscopici dei metaboliti cerebrali.

La *paziente 2* (parto a termine, eutocico, peso alla nascita: 3,400 kg, Apgar 8 e 9 al 1° e 5° minuto), sorella del probando, ha mostrato alla MS/MS un incremento dei livelli di propionilcarnitina (C3: 9,56  $\mu$ M) ed un aumento del rapporto propionilcarnitina/acetilcarnitina (C3/C2:0,38) ed alla GC/MS un incremento dell'escrezione urinaria di acido metilmalonico,  $\alpha$ -chetoglutarico e piruvico associato ad un modesto aumento di quella degli acidi lattico e metilcitrato. Il successivo sequenziamento genico ha evidenziato un genotipo analogo a quello del fratello maggiore. La paziente, attualmente di 18 mesi d'età ed in trattamento dietetico, ha presentato uno sviluppo neuromotorio e cognitivo (scala Uzgiris-Hunt) nella norma, un ritardo dell'accrescimento staturale (peso: < 10°c altezza: > 3°c) ed una progressiva normalizzazione dei parametri di laboratorio (Fig. 2).

## DISCUSSIONE

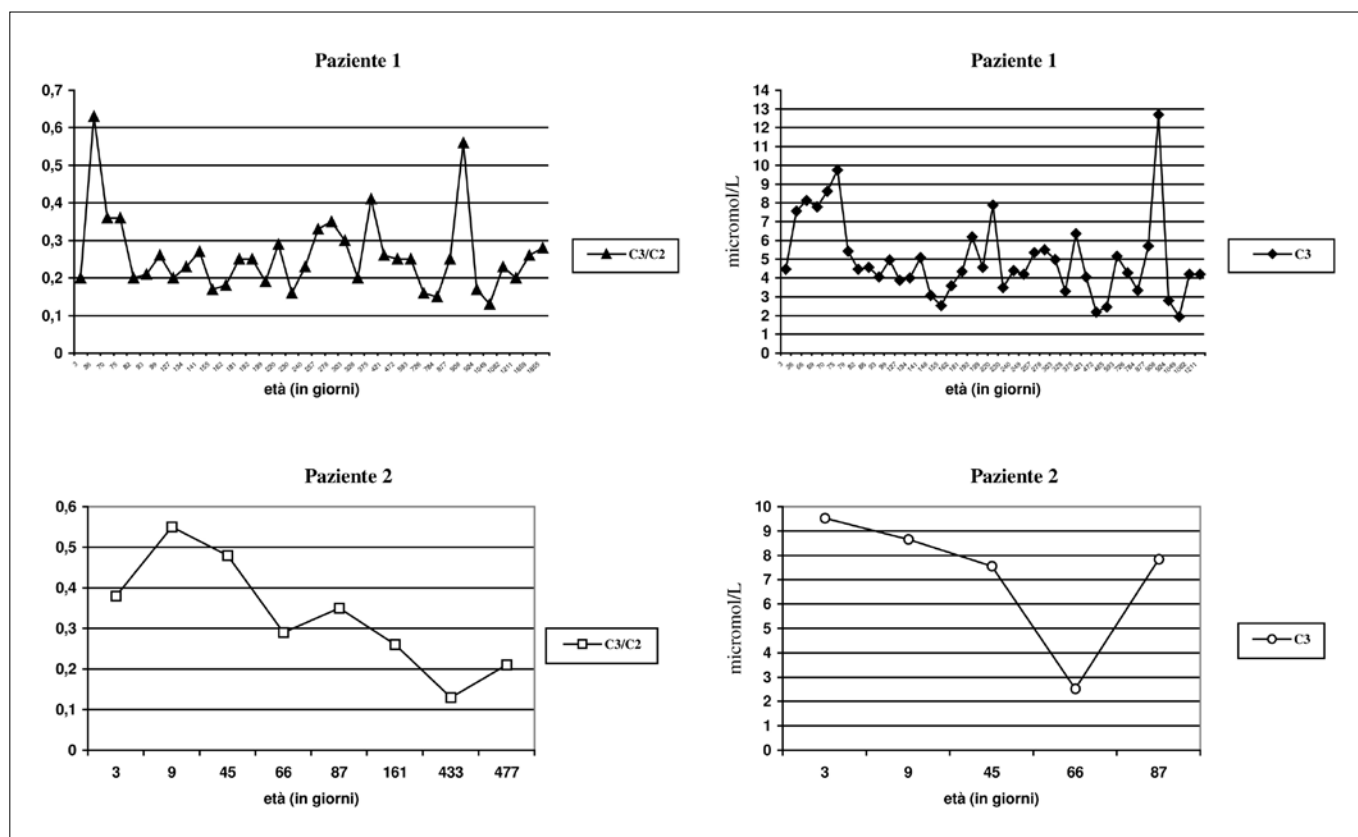
L'aciduria metilmalonica, sebbene rientri nel novero delle acidurie organiche classiche, rappresenta tuttora un modello di disturbo del metabolismo ampiamente sconosciuto<sup>18</sup>. Su un piano patofisiologico la complessità e molteplicità dei possibili meccanismi patogeni<sup>19-23</sup> hanno portato alla elaborazione e coesistenza di più modelli teorico-pratici e di ricerca: ipotesi dei metaboliti tossici, inibizione del metabolismo energetico mitocondriale, stress ossidativo e compromissione dell'omeostasi del DNA mitocondriale, acidi dicarbosilici ed ipotesi dell'intrappolamento. Recentemente

Bodamer et al.<sup>11</sup> hanno ipotizzato che in alcune forme di aciduria metilmalonica combinata (cblC) parte dei sintomi neurologici possa essere attribuita ad un aumento dei livelli di acido guanidinoacetico (GAA) riscontrando analogie e parallelismi fra questa variante ed il fenotipo clinico dei pazienti affetti da deficit del metabolismo della creatina dovuto ad una compromissione della guanidinoacetato metiltransferasi o deficit di GAMT. Seppur ancora controverso<sup>22-24</sup>, questo modello prevederebbe un ridotto pool di gruppi metilici labili ed un effetto d'inibizione sulla GAMT quale possibile causa dei disturbi neurologici (Fig. 1).

Su un piano di prevenzione, diagnosi ed efficacia terapeutica, alla diffusione ormai su scala multicontinentale dello screening neonatale, si contrappone la scarsità di studi prognostici e sugli outcomes post-terapeutici. A partire dal primo lavoro retrospettivo su 45 pazienti condotto da Matsui et al. nel 1983<sup>25</sup>, sono stati effettuati un numero limitato di studi, sia prospettici sia retrospettivi, finalizzati alla definizione dell'evoluzione naturale della malattia e dell'efficacia di un intervento terapeutico nel modificarne la prognosi<sup>26-34</sup>.

In uno studio longitudinale su 35 pazienti affetti, diagnosticati tra il 1970 ed il 1996, Nicolaides et al.<sup>29</sup> hanno evidenziato una scarsa correlazione fra dati biochimico-enzimatici e progressione di malattia, riscontrando invece una correlazione fra età d'esordio dei sintomi, responsività alla cobalamina e prognosi: i pazienti affetti da aciduria metilmalonica responsiva alla cobalamina hanno mostrato una prognosi a lungo termine migliore, mentre, nei pazienti non responsivi, i risultati prognostici apparivano strettamente correlati alla precocità d'esordio dei sintomi. I pazienti ad esordio precoce non responsivi alla cobalamina hanno mostrato la prognosi peggiore, con alto rischio di mortalità precoce (mediana di sopravvivenza 6,4 anni) e più evidente compromissione su un piano neurologico.

In due studi successivi, condotti rispettivamente su 83 e 30 pazienti affetti da aciduria metilmalonica isolata, Hörster et al.<sup>31</sup> e Cosson et al.<sup>33</sup> hanno dimostrato una correlazione fra gruppo di complementazione d'appartenenza e severità e precocità d'esordio dei sintomi, con i pazienti mut<sup>0</sup> e cblB che mostravano morbidità, tassi di mortalità e complicanze su un piano neurologico e renale maggiori rispetto agli



**Fig. 2.** Andamento progressivo dei livelli di propionilcarnitina (C3) e del rapporto propionilcarnitina/acetilcarnitina (C3/C2) nei due pazienti diagnosticati tramite screening neonatale.

Si rileva una sostanziale sovrapposizione dell'andamento dei valori delle carnitine nel corso del tempo con aumento dei valori in coincidenza con periodi di incompleta aderenza al regime dietetico.

altri pazienti affetti. La responsività alla cobalamina non appariva invece un criterio certo di classificazione, almeno in senso predittivo, anche in relazione all'ampia variabilità d'esordio sintomatologico. L'assenza di dati definitivi in termini prognostici sembra risentire da una parte del dibattito sui parametri di laboratorio più efficaci per una diagnosi precoce ed un corretto follow-up<sup>35-38</sup> e dall'altra della mancata uniformità dei protocolli dietetici di trattamento<sup>39</sup>. Il secondo filone di ricerca è quello concernente l'utilità e l'impatto sulla clinica dello screening neonatale e di un intervento terapeutico precoce, quando non presintomatico. Sono numerosi i richiami in letteratura all'utilità dello screening neonatale nel trattare e prevenire scompenso metabolico acuto e sintomi ad esordio progressivo ma, nei fatti, l'utilità dello scree-

ning appare tuttora controversa<sup>31-35</sup>. Nell'unica ricerca condotta da Dionisi-Vici et al.<sup>40</sup> su pazienti affetti da aciduria organica classica (aciduria propionica, aciduria metilmalonica ed isovalerica), condotto su 29 pazienti sintomatici ed altri 29 pazienti identificati tramite screening (dati clinici tratti dalla letteratura), sono state confrontate caratteristiche cliniche alla diagnosi, sviluppo neurocognitivo e tassi di mortalità dei pazienti diagnosticati tramite screening e dei pazienti non da screening. I dati, seppur limitati dal numero ristretto di pazienti coinvolti, sembrano dimostrare come, pur nella variabilità intrinseca alla malattia, una diagnosi precoce tramite screening ed un intervento precoce riducono i tassi di mortalità e la severità dei sintomi alla diagnosi nonché sono utili nel migliorare la prognosi a breve termine. Inoltre lo screening neo-

natale sembrerebbe essere efficace nel migliorare la prognosi specialmente nei pazienti con fenotipo meno severo di malattia ed esordio sintomatologico più tardivo con maggiore efficacia terapeutica quando il trattamento viene intrapreso in fase presintomatica. I dati relativi ai pazienti da noi descritti sembrano confortare la letteratura secondo cui, da una parte screening neonatale concentrato sul rapporto C3/C2 e sui livelli di acido metilmalonico urinario consentono una diagnosi precoce di malattia e, dall'altra, scre-

ening neonatale ed intervento terapeutico precoce, soprattutto nei pazienti con genotipo mild, sembrano efficaci nel migliorare la prognosi di malattia e nel ritardare l'esordio clinico.

Studi longitudinali estesi, risultato di collaborazioni interdipartimentali, precise indicazioni e protocolli uniformi di trattamento rappresentano delle istanze di estrema importanza per meglio indirizzare l'approccio clinico-terapeutico e nel valutare l'efficacia reale dello screening allargato.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 Deodato F, Boenzi S, Santorelli FM, et al. *Methylmalonic and propionic aciduria*. Am J Med Genet C Semin Med Genet 2006;142C:104-12.
- 2 Hörster F, Hoffmann GF. *Pathophysiology, diagnosis, and treatment of methylmalonic aciduria - recent advances and new challenges*. Pediatr Nephrol 2004;19:1071-4.
- 3 Gradinger AB, Bélair C, Worgan LC, et al. *Atypical methylmalonic aciduria: frequency of mutations in the methylmalonyl CoA epimerase gene (MCEE)*. Hum Mutat 2007;28:1045-53.
- 4 Ostergaard E, Hansen FJ, Sorensen N, et al. *Mitochondrial encephalomyopathy with elevated methylmalonic acid is caused by SUCLA2 mutations*. Brain 2007;130:853-61.
- 5 Carozzo R, Dionisi-Vici C, Steuerwald U, et al. *SUCLA2 mutations are associated with mild methylmalonic aciduria, Leigh-like encephalomyopathy, dystonia and deafness*. Brain 2007;130:862-74.
- 6 Valayannopoulos V, Haudry C, Serre V, et al. *New SUCLG1 patients expanding the phenotypic spectrum of this rare cause of mild methylmalonic aciduria*. Mitochondrion 2010;10:335-41.
- 7 Watkins D, Matiaszuk N, Rosenblatt DS. *Complementation studies in the cblA class of inborn error of cobalamin metabolism: evidence for interallelic complementation and for a new complementation class (cblH)*. J Med Genet 2000;37:510-3.
- 8 Fowler B, Leonard JV, Baumgartner MR. *Causes of and diagnostic approach to methylmalonic acidurias*. J Inher Metab Dis 2008;31:350-60.
- 9 Anastasio N, Watkins D, Vezina L, et al. *Mutations in TCblR, the gene for the transcobalamin receptor, result in decreased cellular uptake of vitamin B12 and methylmalonic aciduria*. 11<sup>th</sup> International Congress of Inborn Errors of Metabolism. Mol Genet Metab 2009;98:122.
- 10 Quadros EV, Lai SC, Nakayama Y, Sequeira JM, et al. *Positive newborn screen for methylmalonic aciduria identifies the first mutation in TCblR/CD320, the gene for cellular uptake of transcobalamin-bound vitamin B12*. Hum Mutat 2010;31:924-9.
- 11 Bodamer OA, Sahoo T, Beaudet AL, et al. *Creatine metabolism in combined methylmalonic aciduria and homocystinuria*. Ann Neurol 2005;57:557-60.
- 12 Manoli I, Venditti CP. *Methylmalonic acidemia*. In: Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, et al., eds. GeneReviews [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle 1993-2005 Aug 16 [updated 2010 Sep 28].
- 13 Janata J, Kogekar N, Fenton WA. *Expression and kinetic characterization of methylmalonyl-CoA mutase from patients with the mut- phenotype: evidence for naturally occurring interallelic complementation*. Hum Mol Genet 1997;6:1457-64.
- 14 Ledley FD, Rosenblatt DS. *Mutations in mut methylmalonic acidemia: clinical and enzymatic correlations*. Hum Mutat 1997;9:1-6.
- 15 Acquaviva C, Benoist JF, Pereira S, et al. *Molecular basis of methylmalonyl-CoA mutase apoenzyme defect in 40 European patients affected by mut(o) and mut- forms of methylmalonic acidemia: identification of 29 novel mutations in the MUT gene*. Hum Mutat 2005;25:167-76.
- 16 Okun JG, Hörster F, Farkas IM, et al. *Neurodegeneration in methylmalonic aciduria involves inhibition of complex II and the tricarboxylic acid cycle, and synergistically acting excitotoxicity*. J Biol Chem 2002;277:14674-80.
- 17 Morath MA, Okun JG, Müller IB, et al. *Neurodegeneration and chronic renal failure in methylmalonic aciduria - A pathophysiological approach*. J Inher Metab Dis 2008;31:35-43.
- 18 Barić I. *Methylmalonic aciduria: current faces of a "classical" organic aciduria*. J Inher Metab Dis 2008;31:293-4.
- 19 Richard E, Alvarez-Barrientos A, Pérez B, et al. *Methylmalonic acidemia leads to increased production of reactive oxygen species and induction of apoptosis through the mitochondrial/caspase pathway*. J Pathol 2007;213:453-61.
- 20 Morath MA, Okun JG, Müller IB, et al. *Neurodegeneration and chronic renal*

- failure in methylmalonic aciduria - a pathophysiological approach. *J Inherit Metab Dis* 2008;31:35-43.
- <sup>21</sup> Mirandola SR, Melo DR, Schuck PF, et al. Methylmalonate inhibits succinate-supported oxygen consumption by interfering with mitochondrial succinate uptake. *J Inherit Metab Dis* 2008;31:44-54.
- <sup>22</sup> Ribeiro LR, Figuera MR, Oliveira MS, et al. Methylmalonate-induced seizures are attenuated in inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Int J Dev Neurosci* 2009;27:157-63.
- <sup>23</sup> Chandler RJ, Zervas PM, Shanske S, et al. Mitochondrial dysfunction in *mut* methylmalonic acidemia. *FASEB J* 2009;23:1252-61.
- <sup>24</sup> Younessi D, Moseley K, Yano S. Creatine metabolism in combined methylmalonic aciduria and homocystinuria disease revisited. *Ann Neurol* 2009;65:481-2.
- <sup>25</sup> Matsui SM, Mahoney MJ, Rosenberg LE. The natural history of the inherited methylmalonic acidemias. *N Engl J Med* 1983;308:857-61.
- <sup>26</sup> Rousson R, Guibaud P. Long term outcome of organic acidurias: survey of 105 French cases (1967-1983). *J Inherit Metab Dis* 1984;7(Suppl 1):10-2.
- <sup>27</sup> Shevell MI, Matiaszuk N, Ledley FD, et al. Varying neurological phenotypes among *mut0* and *mut* patients with methylmalonyl CoA mutase deficiency. *Am J Med Genet* 1993;45:619-24.
- <sup>28</sup> Baumgartner ER, Viardot C. Long term follow-up of 77 patients with isolated methylmalonic acidemia. *J Inherit Metab Dis* 1995;18:138-42.
- <sup>29</sup> Nicolaides P, Leonard J, Surtees R. Neurological outcome of methylmalonic acidemia. *Arch Dis Child* 1998;78:508-12.
- <sup>30</sup> de Baulny HO, Benoist JF, Rigal O, et al. Methylmalonic and propionic acidemias: management and outcome. *J Inherit Metab Dis* 2005;28:415-23.
- <sup>31</sup> Hörster F, Baumgartner MR, Viardot C, et al. Long-term outcome in methylmalonic acidurias is influenced by the underlying defect (*mut<sup>0</sup>*, *mut*, *cblA*, *cblB*). *Pediatr Res* 2007;62:225-30.
- <sup>32</sup> Merinero B, Pérez B, Pérez-Cerdá C, et al. Methylmalonic acidemia: examination of genotype and biochemical data in 32 patients belonging to *mut*, *cblA* or *cblB* complementation group. *J Inherit Metab Dis* 2008;31:55-66.
- <sup>33</sup> Cosson MA, Benoist JF, Touati G, et al. Long-term outcome in methylmalonic aciduria: A series of 30 French patients. *Mol Genet Metab* 2009;97:172-8.
- <sup>34</sup> Martín-Hernández E, Lee PJ, Micciche A, et al. Long-term needs of adult patients with organic acidemias: outcome and prognostic factors. *J Inherit Metab Dis* 2009;32:523-33.
- <sup>35</sup> Leonard JV, Vijayaraghavan S, Walter JH. The impact of screening for propionic and methylmalonic acidemia. *Eur J Pediatr* 2003;162:S21-4.
- <sup>36</sup> Lindner M, Ho S, Kölker S, et al. Newborn screening for methylmalonic acidurias-optimization by statistical parameter combination. *J Inherit Metab Dis* 2008;31:379-85.
- <sup>37</sup> Zwickler T, Lindner M, Aydin HI, et al. Diagnostic work-up and management of patients with isolated methylmalonic acidurias in European metabolic centres. *J Inherit Metab Dis* 2008;31:361-7.
- <sup>38</sup> Cheng KH, Liu MY, Kao CH, et al. Newborn screening for methylmalonic aciduria by tandem mass spectrometry: 7 years' experience from two centers in Taiwan. *J Chin Med Assoc* 2010;73:314-8.
- <sup>39</sup> Hauser NS, Manoli I, Graf JC, et al. Variable dietary management of methylmalonic acidemia: metabolic and energetic correlations. *Am J Clin Nutr* 2011;93:47-56.
- <sup>40</sup> Dionisi-Vici C, Deodato F, Roschinger W, et al. Classical organic acidurias, propionic aciduria, methylmalonic aciduria and isovaleric aciduria: Long-term outcome and effects of expanded newborn screening using tandem mass spectrometry. *J Inherit Metab Dis* 2006;29:383-9.

**Corrispondenza:** Vincenzo Leuzzi, via dei Sabelli 108, 00185 Roma - Tel. +39 06 44712282 - E-mail: vincenzo.leuzzi@uniroma1.it