

## Síndromes de deficiência em creatina cerebral: 13 anos de experiência em Portugal

### Cerebral creatine deficiency syndromes: 13 years experience in Portugal

Carla Valongo, Altina Lopes, Laura Vilarinho

carla.valongo@insa.min-saude.pt

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

#### \_Resumo

Os síndromes da deficiência em creatina cerebral são um grupo de erros inatos do metabolismo da creatina que incluem as deficiências de síntese da creatina: arginina:glicina amidinotransferase (AGAT) e S-adenosil-L-metionina:guanidinoacetato metiltransferase (GAMT) e a deficiência no transportador transmembranar (CT1/SLC6A8). O diagnóstico destas patologias pode ser efetuado através da determinação do ácido guanidinoacético e creatina urinária e plasmática e do estudo molecular. Desde 2003 que a Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética (URN) disponibiliza este tipo de diagnóstico que permitiu a identificação de nove doentes com deficiência em GAMT e 20 doentes com deficiência em CT1. O rastreio bioquímico das deficiências em creatina cerebral deve ser realizado em todos os doentes que apresentem encefalopatia epiléptica de causa desconhecida, doença do movimento, alterações cognitivas e comportamento tipo autista.

#### \_Abstract

Cerebral creatine deficiency syndromes are a group of rare inborn errors of creatine metabolism that include arginine:glycine amidinotransferase (AGAT) deficiency, S-adenosyl-L-methionine:guanidinoacetate methyltransferase (GAMT) deficiency, and the creatine transporter (CT1/SLC6A8) deficiency. All creatine disorders can be investigated through measurement of creatine metabolites in body fluids, and molecular genetics techniques. Since 2003, we have been performing the diagnosis of this group of disorders and encountered nine patients with GAMT deficiency and 20 with CT1 deficiency in the Portuguese population. Biochemical screening for creatine deficiency syndromes should be part of diagnostic workup for all patients presenting with epileptic encephalopathy of unknown origin, movement disorders, mental disability, and autistic-like behavior.

#### \_Introdução

O sistema creatina/fosfocreatina exerce um papel fundamental no metabolismo energético através da regeneração de ATP, mantendo a hemóstase energética nos tecidos e órgãos de elevada necessidade energética, tal como o músculo e o cérebro (1).

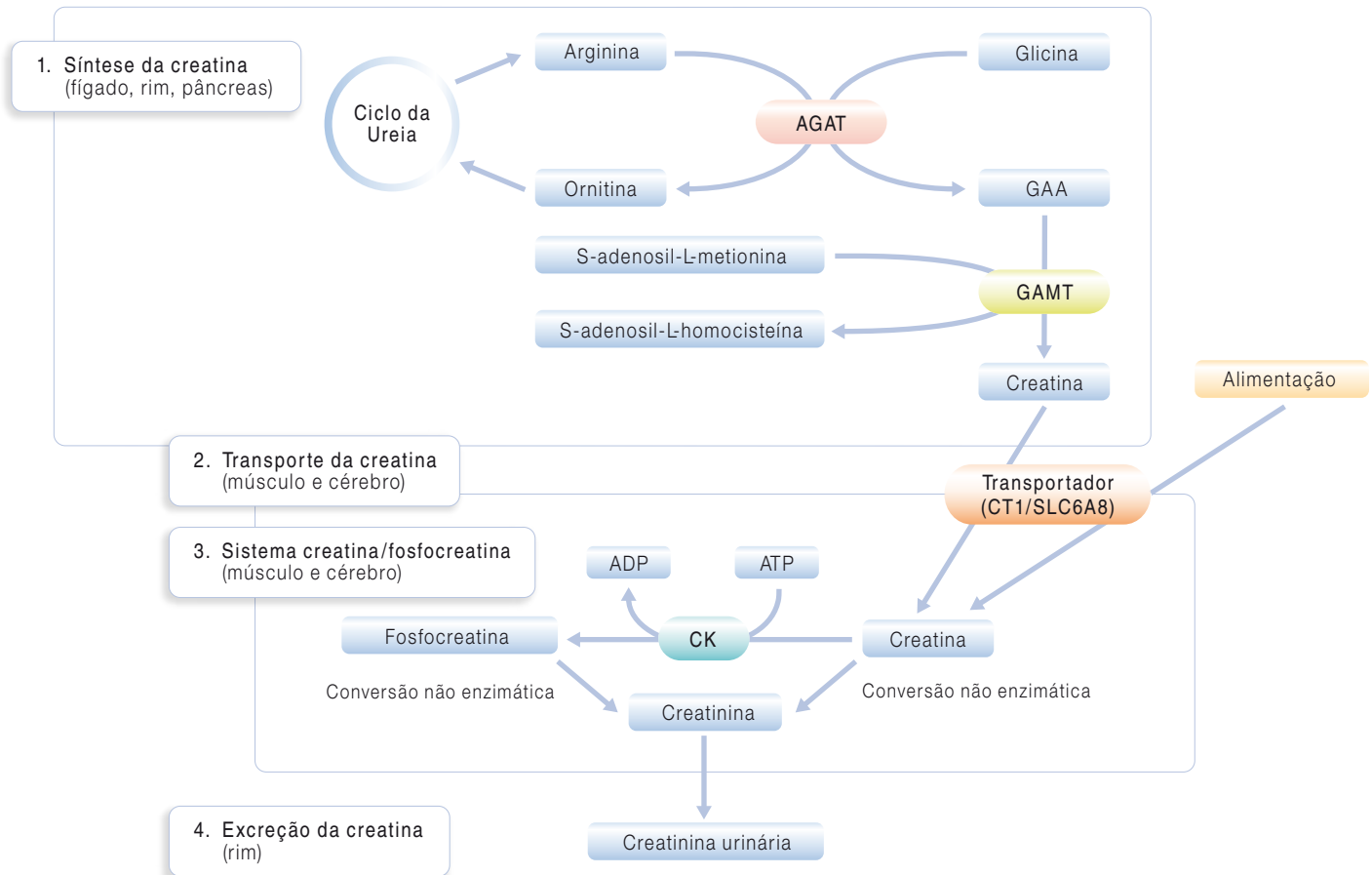
A creatina (cr) pode ser adquirida por via alimentar ou sintetizada através de duas reações enzimáticas (figura 1): a arginina:glicina amidinotransferase (AGAT), responsável pela formação do ácido guanidinoacético (GAA) a partir de arginina e glicina e a S-adenosil-L-metionina:guanidinoacetato metiltransferase (GAMT), responsável pela metilação do GAA em cr. Os principais órgãos onde se realiza a síntese de creatina são o fígado, o pâncreas e os rins. Apesar do cérebro poder sintetizar este composto, a grande maioria é fornecida pelo sangue através de um transportador transmembranar  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  dependente (CT1, SLC6A8) (1,2).

São doenças neurometabólicas raras e têm em comum a ausência ou diminuição de pico de cr detetado por ressonância magnética cerebral com espectroscopia de próton ( $^1\text{H}$ -RMN) (3) e um quadro clínico caracterizado por deficiência cognitiva, atraso de linguagem, comportamento autista e em alguns casos convulsões (2-3).

#### Deficiência em GAMT (MIM #601240)

É uma doença de transmissão autossómica recessiva, cujo gene GAMT se localiza no cromossoma 19p13.3 (3,4). Clinicamente caracteriza-se por um desenvolvimento normal nos primeiros meses de vida, os quais podem reverter abruptamente com paragem/regressão do desenvolvimento psicomotor e das aquisições com ou sem convulsões (4). Estão descritas duas formas de apresentação: uma moderada e outra grave (4,5).

Figura 1: ↓ Via metabólica da creatina.



A creatina (cr) é sintetizada principalmente no fígado, rins e pâncreas através de uma reação de duas etapas. A primeira etapa é catalisada pela arginina:glicina amidinotransferase (AGAT, EC 2.1.4.1), responsável pela transferência do grupo amidino da arginina para a glicina dando origem ao ácido guanidinoacético (GAA) e ornitina (passo limitante da síntese de cr). O segundo passo é regulado pela S-adenosil-L-metionina:guanidinoacetato metiltransferase (GAMT, EC 2.1.1.2) e há a transferência do grupo metilo da S-adenosil-L-metionina para o GAA dando origem a cr e S-adenosil-L-homocisteína. A cr entra na circulação sanguínea e é utilizada em tecidos de elevada atividade da creatina cinase (CK), tal como o músculo e cérebro. O transporte para o interior das células é efetuado por intermédio de um transportador (CT1/SLC6A8). Uma vez nas células a cr é convertida em fosfocreatina pela ação da CK através de uma reação reversível. A cr e a fosfocreatina intracelulares são transformadas em creatinina, que é excretada por via urinária.

O fenótipo moderado é caracterizado por défice cognitivo, atraso de linguagem, doença do movimento e perturbações do espectro autista, por sua vez o fenótipo grave apresenta precocemente um quadro epiléptico que não responde à terapêutica e um atraso de desenvolvimento marcado (4-6).

Bioquimicamente caracterizada por um aumento do GAA nos fluídos biológicos (marcador patognomónico) e concentrações baixas de cr no plasma, urina, líquido céfalo-raquidiano,

(quadro 1) (4-6). Os portadores de mutações no gene GAMT podem revelar ligeiros aumentos de GAA no plasma e/ou urina (7,8).

O tratamento tem como objetivo restabelecer os níveis de cr cerebral através da suplementação com cr monohidratada e diminuir a acumulação do GAA (composto neurotóxico) no sistema nervoso central. A dieta destes doentes consiste na suplementação com ornitina e restrição em arginina (4,6).

Quadro 1: ↓ Aspetos bioquímicos e moleculares dos doentes diagnosticados com deficiência em GAMT.

Doente	Idade ao diagnóstico (anos)	Género	GAA (urina) (μmol/mmol crn)	Creatina (urina) (μmol/L)	Análise genética
D-1	16	Masculino	827	456	c.59G>C/c.59G>C p.Trp20Ser/p.Trp20Ser
D-2	20	Masculino	406	366	c.59G>C/c.59G>C p.Trp20Ser/p.Trp20Ser
D-3	21	Masculino	423	337	c.59G>C/c.59G>C p.Trp20Ser/p.Trp20Ser
D-4	19	Masculino	546	462	c.59G>C/c.59G>C p.Trp20Ser/p.Trp20Ser
D-5	15	Masculino	1230	78	c.59G>C/c.59G>C p.Trp20Ser/p.Trp20Ser
D-6	9	Feminino	1064	110	c.59G>C/c.59G>C p.Trp20Ser/p.Trp20Ser
D-7	12	Feminino	911	129	c.59G>C/c.521G>A p.Trp20Ser/p.Trp174X
D-8	6	Masculino	1480	206	c.59G>C/c.59G>C p.Trp20Ser/p.Trp20Ser
D-9	9	Feminino	844	43	c.59G>C/c.59G>C p.Trp20Ser/p.Trp20Ser

Valores de referência (urina): 5-11 anos: GAA: 18-130 μmol/mmol crn; creatina: 146-8560 μmol/L;  
>12 anos: GAA: 18-130 μmol/mmol crn; creatina: 142-5952 μmol/L.

### Deficiência em AGAT (MIM #602360)

Tal como a deficiência em GAMT, a deficiência em AGAT tem uma transmissão autossómica recessiva e o gene *GATM* localiza-se no cromossoma 15q15.3. Os indivíduos afetados apresentam atraso de desenvolvimento psicomotor, défice na linguagem e em alguns casos pode-se igualmente observar ligeira patologia do movimento e epilepsia.

Os níveis de GAA e cr podem encontrar-se normais-baixos quer no plasma quer na urina, com exceção da cr plasmática que se encontra baixa (quadro 1).

O tratamento pretende repor os níveis de cr cerebral através da suplementação com cr monohidratada. O início precoce de uma terapêutica demonstrou uma normalização do desenvolvimento cognitivo, melhoria do relacionamento inter-pessoal e da fraqueza muscular (4, 6).

### Deficiência do transportador transmembranar da creatina (CT1/SLC6A8, MIM #300036)

Esta patologia tem uma hereditariedade ligada ao cromossoma X (Xq28). Os doentes do sexo masculino podem apresen-

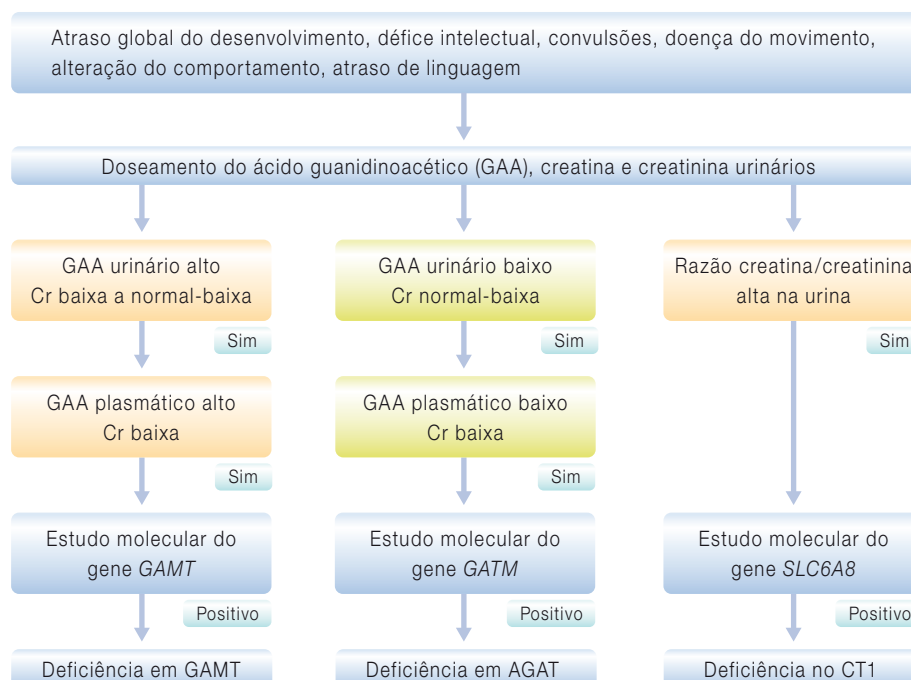
tar um fenótipo moderado a grave, dependendo do fenómeno da inativação aleatória do cromossoma X. As portadoras de mutações no gene *SLC6A8* podem manifestar sintomatologia neurológica, ainda que ligeira (5).

A apresentação clínica mais comum engloba o atraso de desenvolvimento, de linguagem e autismo. De referir que as convulsões respondem aos anti-epilépticos mais usados e os indivíduos afetados apresentam estatura inferior à normal para a idade (3,5).

A análise bioquímica dos doentes com deficiência no CT1 revela um aumento da razão cr/creatinina, podendo estar normal-alta no caso das portadoras (quadro 2).

O tratamento tem como objetivo normalizar os níveis de cr cerebral, no entanto a suplementação com cr monohidratada não é muito eficaz quer nos doentes, quer nas portadoras (4,6). Ainda assim, diversos autores recomendam iniciar um tratamento com cr monohidratada, arginina e glicina em crianças jovens para atrasar a progressão da doença (6).

Figura 2: ▾ Aspectos bioquímicos e moleculares dos doentes diagnosticados com deficiência em GAMT.



AGAT - arginina:glicina amidinotransferase; Cr- creatina; CT1 - transportador da creatina; GAA – ácido guanidinoacético; GAMT - S-adenosil-L-metionina:guanidinoacetato metiltransferase.

Os síndromes da deficiência em creatina cerebral apresentam uma clínica semelhante (atraso cognitivo, da linguagem, comportamento tipo autista) e diferentes graus de severidade. A análise laboratorial é fundamental para a obtenção de um diagnóstico correto. Seguidamente apresentam-se os resultados bioquímicos e moleculares das deficiências do metabolismo da creatina em Portugal, diagnosticados na nossa Unidade.

### \_Material e métodos

O estudo bioquímico do metabolismo da creatina é efetuado sobre amostras de urina (ocasional ou 24 horas) e sangue (plasma colhido em EDTA/heparina de lítio) proveniente de diferentes hospitais distribuídos em Portugal. O método de extração e análise utilizado foi previamente descrito pelo nosso grupo (9). A análise simultânea do GAA e da cr é realizada num cromatógrafo gasoso com deteção por espectrometria de massa. A concentração da creatinina urinária é determinada através do método de Jaffé modificado.

Os estudos genéticos, para confirmação/exclusão dos casos suspeitos, foram efetuados por sequenciação direta de Sanger. Os fragmentos foram amplificados por PCR, a partir de ADN genómico extraído de sangue. Todos os exões dos genes *GATM*, *GAMT* e *SLC6A8*, e respetivas regiões intrónicas flangeadoras, foram sequenciados por procedimentos *standard*.

### \_Resultados e discussão

As deficiências em cr cerebral podem ser diagnosticados através do estudo do GAA e da cr urinários e/ou plasmáticos. Níveis sistematicamente baixos de GAA e cr plasmáticos são indicativos de possível deficiência em AGAT (figura 1). Até à data não foi diagnosticado nenhum doente em Portugal.

A deficiência em GAMT, mais frequente que a anterior, é caracterizada por um aumento de GAA na urina e plasma, com níveis de creatina normais-baixos (tabela 1). Foram identificados nove doentes bioquimicamente compatíveis com esta

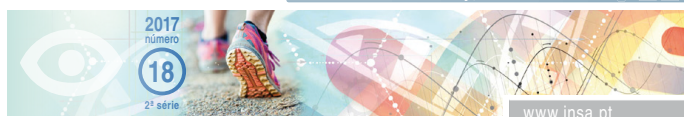
deficiência e cujo estudo genético revelou uma mutação prevalente no nosso país (c.59G>C). Este dado é indicativo da existência de um efeito fundador na nossa população (**quadro 1**). Os doentes que iniciaram terapia com restrição em arginina e suplementação com creatina e ornitina demonstraram melhoria em alguma sintomatologia e diminuição dos níveis de GAA urinários e plasmáticos (dados não publicados).

A deficiência do transportador transmembranar da creatina é a patologia mais comum deste grupo de doenças. A suspeita inicial estava relacionada com um aumento da razão creatina/creatinina urinária. Num total de 20 doentes o estudo genético em 17 revelou a mutação causal (**quadro 2**). O estudo molecular de dois doentes encontra-se em curso no entanto a ausência de pico de creatina cerebral é sugestivo deste diagnóstico bioquímico.

**Quadro 2:** ↓ Aspectos bioquímicos e moleculares dos doentes com deficiência em CT1.

Doente	Idade ao diagnóstico (anos)	Creatina (µmol/L)	Creatina/creatinina	Análise genética (ligada ao X)	Creatina (urina) (µmol/L)
CT-1	4	12 337	5,87	c.1597G>A p.Met532Ile	ND
CT-2	8	19 684	3,45	c.1261G>C p.Gly421Arg	ND
CT-3	3	4 680	4,25	c.1A>G p.Met1Val	ND
CT-4	12	11 889	2,90	c.1169C>T p.Pro390Leu	ND
CT-5	4	5 922	4,93	c.1222_1224delTTC p.Phe408del	ND
CT-6	2	5 371	3,58	c.1432dupG p.Ala478GlyfsX24	ND
CT-7	2	10 092	2,80	c.884_885delCT p.Pro295ArgfsX169	ND
CT-8	15	4 932	2,24	c.1456C>T p.Gln476X	Ausente
CT-9	15	5 891	1,84	c.1456C>T p.Gln476X	ND
CT-10	6	6 098	2,26	c.1661C>T p.Pro554Leu	Ausente
CT-11	2	20 475	9,31	c.986G>T p.Ser329Ile	Diminuição
CT-12	5	27 807	7,72	c.321_323delCCT p.Phe107del	Ausente
CT-13	4	30 996	6,20	c.1299_1309del p.Pro434LeufsX27	ND
CT-14	6	4 009	2,00	c.355G>T p.Gly119Cys	ND
CT-15	4	10 590	2,71	ND	Ausente
CT-16	4	20 608	4,91	c.983G>A p.Gly328Asp	ND
CT-17	16	7 421	1,69	c.304G>A p.Gly102Arg	ND
CT-18	12	25 944	1,92	ND	Ausente
CT-19	2	3 901	5,57	c.1519_1543del Ile507Lfs*5	Diminuição
CT-20*	28	ND	ND	c.304G>A p.Gly102Arg	ND

Valores de referência (urina): <4 anos: creatina: 140-7910 µmol/L; razão creatina/creatinina: 0,04-1,51;  
5-11 anos: creatina: 146-8560 µmol/L; razão creatina/creatinina: 0,04-1,07;  
>12 anos: creatina: 142-5952 µmol/L; razão creatina/creatinina: 0,04-0,56.  
ND – não disponível; \* – irmão de CT-17



## \_Conclusões

O estudo do metabolismo da creatina deve ser considerado em todos os doentes que apresentem deficiência cognitiva, atraso global do desenvolvimento psicomotor ou da linguagem, comportamento tipo autista com ou sem epilepsia e doença do movimento. As deficiências de síntese são tratadas através da suplementação com cr monohidratada de modo a tentar restabelecer os níveis de cr cerebrais. O início precoce do tratamento numa fase assintomática da doença previne o aparecimento de sintomatologia (6). É importante igualmente realizar avaliações de rotina da função renal de modo a detetar nefropatias associadas ao tratamento com cr.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a colaboração dos clínicos que fazem o *follow-up* dos doentes identificados.

## Referências bibliográficas:

- (1) Braissant O. Creatine and guanidinoacetate transport at blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *J Inher Metab Dis.* 2012;35(4):655-64.
- (2) Stöckler S, Braissant O, Schulze A. Creatine Disorders. In: Thöny B, Duran M, Gibson KM, et al. (eds). *Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Inherited Metabolic Diseases.* New York: Springer, 2014, pp. 529-40.
- (3) Stockler S, Schutz PW, Salomons GS. Cerebral creatine deficiency syndromes: clinical aspects, treatment and pathophysiology. *Subcell Biochem.* 2007;46:149-66. Review.
- (4) Leuzzi V, Mastrangelo M, Battini R, et al. Inborn errors of creatine metabolism and epilepsy. *Epilepsia.* 2013;54(2):217-27. Epub 2012 Nov 13. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/epi.12020/epdf>
- (5) Valongo C, Almeida L, Cardoso ML, et al. Défices do metabolismo da creatina - o emergir de um novo grupo de doenças neurometabólicas. *Nascer e Crescer.* 2003;12(2):66-73.
- (6) Mercimek-Mahmutoglu S, Salomons GS. Creatine Deficiency Syndromes. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al. (eds). *GeneReviews® [Em linha].* Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 1993-2017. [consult.28/3/2017]. [www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3794/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3794/)
- (7) Caldeira Araújo H, Smit W, Verhoeven NM, et al. Guanidinoacetate methyltransferase deficiency identified in adults and a child with mental retardation. *Am J Med Genet A.* 2005;133A(2):122-7.
- (8) Carducci C, Birarelli M, Leuzzi V, et al. Guanidinoacetate and creatine plus creatinine assessment in physiologic fluids: an effective diagnostic tool for the biochemical diagnosis of arginine:glycine amidinotransferase and guanidinoacetate methyltransferase deficiencies. *Clin Chem.* 2002;48(10):1772-8. <http://clinchem.aaccjnl.org/content/48/10/1772.long>
- (9) Valongo C, Cardoso ML, Domingues P, et al. Age related reference values for urine creatine and guanidinoacetic acid concentration in children and adolescents by gas chromatography-mass spectrometry. *Clin Chim Acta.* 2004;348(1-2):155-61.