

_Análise bioquímica do líquido cefalorraquidiano para o diagnóstico de doenças hereditárias dos neurotransmissores: casuística e experiência laboratorial

Biochemical analysis of cerebrospinal fluid for the diagnosis of hereditary neurotransmitter diseases: case series and laboratory experience

M. Rosário Rodrigues

m.rosario.rodrigues@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Patologia Clínica. Laboratório de Bioquímica Genética/Endocrinologia Especial, Hospital Dona Estefânia, CHLC, Lisboa, Portugal

(3) Biosystems & Integrative Sciences Institute. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

_Resumo

As doenças genéticas relacionadas com o metabolismo dos neurotransmissores são um grupo de doenças neurometabólicas em expansão. Este artigo apresenta a revisão da análise de biomarcadores no líquido cefalorraquidiano (LCR) para o diagnóstico de doenças hereditárias dos neurotransmissores (DHN). Fez-se um levantamento retrospectivo dos doentes submetidos a análise bioquímica dos neurotransmissores (NT), por apresentarem suspeita de DHN, com uma variabilidade de apresentações neurológicas e com idades que variavam entre a idade neonatal, pediátrica e adulta. O estudo foi efetuado no Laboratório de Bioquímica Genética/Endocrinologia Especial do Hospital Dona Estefânia (HDE), CHULC, Lisboa, num período compreendido entre 2015-2021. Dos 277 casos levantados 107 (38,6%) apresentavam concentração de metabolitos dentro dos valores de referência. Dos restantes 170 pacientes que apresentavam alterações, três (1,08%) apresentaram um perfil bioquímico compatível com défice primário dos NT, confirmado por diagnóstico molecular; em 165 dos casos (59,6%) concluiu-se que as alterações dos metabolitos estavam relacionadas com alterações secundárias. Os restantes dois casos (0,72%) correspondiam a distonias sensíveis à dopa, e permaneceram sem confirmação molecular. Tentamos explorar a correlação de alterações secundárias dos neurotransmissores major com as manifestações clínicas. Com este trabalho preliminar pretendemos divulgar e evidenciar a importância destes diagnósticos, que permitem excluir alterações primárias de secundárias e, ainda, partilhar a experiência e a casuística que servirá de base a um futuro artigo de investigação mais completo.

_Abstract

Genetic alterations related to neurotransmitter metabolism are an expanding group of neurometabolic diseases. In this article, we review the analysis of biomarkers in cerebrospinal fluids (CSF) for the diagnosis of Hereditary Neurotransmitter Disorders (HND). A retrospective survey was carried out on patients submitted to biochemical analysis of neurotransmitters, due to suspicion of HDN, with variable neurological presentations, and ages ranging from neonatal, to pediatric and adult. The study was carried out at the Laboratory of Biochemical Genetics/Special Endocrinology at the Hospital

Dona Estefania (HDE), Lisbon, between 2015-2021. Of the 277 cases surveyed, 107 (38.6%) had concentrations of metabolites within the reference values. Of the remaining 170 patients with alterations, 3 cases (1.08%) had a biochemical profile compatible with a primary deficit with confirmed molecular diagnosis, 165 cases (59.6%) were considered related to secondary alterations, and the remaining 2 cases (0.72%) corresponding to dopa-reponsive dystonias, remained without molecular confirmation. We attempted to explore the correlation of minor changes in major neurotransmitters with clinical manifestations. With this preliminary article, we intend to disseminate and highlight the importance of these diagnoses, which allow excluding primary and secondary alterations, as well as to share the experience and reasoning, serving as a basis for ongoing research.

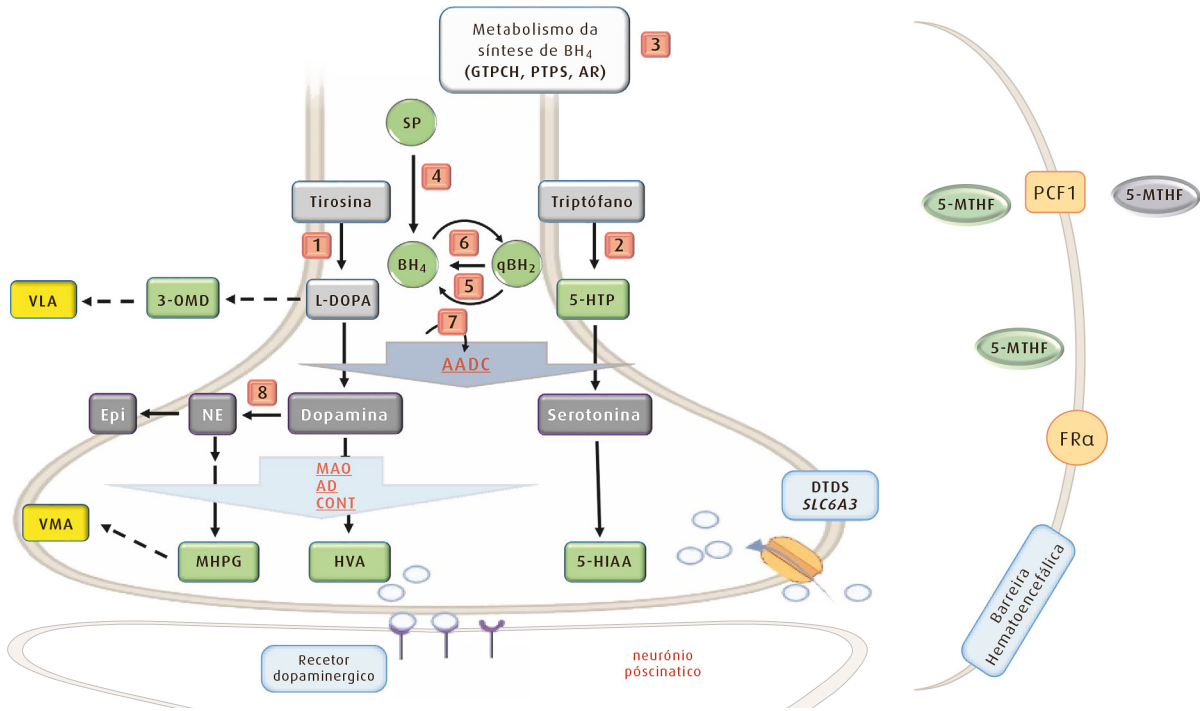
_Introdução

As doenças hereditárias dos neurotransmissores (DHN) são um grupo de doenças neurometabólicas que resultam de alterações nas enzimas envolvidas na síntese, degradação e transporte dos neurotransmissores (aminas biogénicas) bem como no metabolismo dos cofatores que ativam essas enzimas, como o fosfato piridoxal (PLP) e a tetrahydrobiopterina (BH₄) e ainda no défice em folato cerebral (5-metil-tetrahidriofolato; 5-MTHF) (1-3) (figura 1).

A maioria das DHN manifesta-se na idade neonatal e infância, embora algumas formas possam surgir na adolescência ou mesmo idade adulta e apresentam variados fenótipos clínicos. Os sintomas clínicos estão estritamente relacionados aos efeitos no défice de dopamina e serotonina, o que permite ajudar a carac-



Figura 1: Esquema das vias metabólicas de síntese, degradação e transporte dos neurotransmissores (NT) e regeneração/síntese dos compostos pterínicos.



Representação esquemática de todas as enzimas e metabolitos fundamentais para o diagnóstico das DHN (verde os metabolitos estudados no LCR, a amarelo na urina e a cor-de-tijolo a identificação do local enzimático ou de cofatores envolvidos).

BH₄ – Tetrahydrobiopterina; qBH₂ – di-hidropterina; 5-HTP – 5-hidroxitriptofano; 5-HIAA – Ácido hidroxiindolacético; HVA – Ácido homovanílico; MHPG – 3-metoxi-4-hidroxilfenilglicol; VMA – Ácido vanilmandélico; NE – Nor-epinefrina; EPI – Epinefrina; SP – Sepiapterina; 5-MTHF – 5-metil-tetrahydrofolato.

1.TH: Tirosina Hidroxilase; 2.TrpH: Triptofano Hidroxilase; 3.Síntese da Biopterina (GTPCH – GTP ciclohidrólase I; PTPS – 6-Piruvil-tetrahydropterina sintase; AR: Autossómica Recessiva; 4.SR: Sepiapterina Redutase; 5.DHPR: Dihidropteridina redutase (reciclagem da BH₄); 6.PCD – Pterina-4 α -carbinolamina desidratase (reciclagem da BH₄); 7.PLP: 5' – piridoxal-fosfato; 8.D β H – Dopa-beta hidróxilase; AADC – Descarboxilase dos aminoácidos aromáticos; MAO – Monoamina oxidase; CONT – Catecol-O-Metiltransferase; AD – Aldeído desidrogenase; DTDS – Transportador dopaminérgico; RCF1 – Proteína transportadora de folato; FR α – Recetor de folato alfa ou FOLR1.

terizar a doença. Os sinais de deficiência dopaminérgica incluem parkinsonismo, distonia, coreia, crise oculogírica, ptose, hipersalivação e epilepsia mioclónica. As manifestações de alteração na serotonina são menos bem definidas e incluem instabilidade térmica, sudorese, comportamento agressivo e alteração do sono. Globalmente envolvem várias combinações de manifestações neurológicas, podendo mesmo mimetizar paralisia cerebral (3,4).



O estudo bioquímico destas patologias assenta na quantificação dos biomarcadores (tabela 1) através da análise cromatográfica do um perfil metabólico no líquido cefalorraquidiano (LCR) característico, uma vez que marcadores periféricos no sangue ou na urina geralmente não são informativos. O diagnóstico compreende esta análise e a sua interligação com a clínica detalhada. A confirmação de diagnóstico é feita através de estudos genéticos moleculares.

A análise dos NT no LCR deve ser feita num laboratório especialista em DHN com experiência em análise e interpretação (3) de modo a identificar as alterações secundárias que podem estar muitas vezes associadas a outras doenças genéticas, associadas com epilepsia e encefalopatia, com medicação ou mesmo com alterações de padrão de neuro-imagem (5,7,8). A análise destes metabolitos deve ser criteriosa e detalhada de modo a acautelar erros de diagnóstico, permitindo distinguir alterações primárias de secundárias. No entanto, a dificuldade no diagnóstico das DHN pode, muitas vezes, estar relacionada logo à partida, com a punção e colheita do LCR (fase pré analítica), com as técnicas especializadas usadas na análise e quantificação dos metabolitos, bem como, com a experiência na integração e interpretação dos resultados (análise dos perfis

bioquímicos), uma vez que inúmeras outras patologias alteram a concentração destes metabolitos no LCR (1). Daí que a implementação de um protocolo de colheitas em Portugal, à semelhança de outros centros europeus tenha sido crucial, pois veio permitir uniformizar a colheita da amostra e o fluxo até ao laboratório, de modo a reduzir os erros inerentes à punção e acondicionamento das frações do LCR (6).

Desde 2016, está disponível um esquema de Controlo de Qualidade Externo (EQA) estabelecido pela ERN-DIM (*European Research Network for evaluation and improvement of screening, Diagnosis and treatment of Inherited disorders of Metabolism*). O esquema avalia o desempenho quantitativo e avalia a capacidade dos laboratórios em diagnosticar as DHN. O tratamento é geralmente baseado na administração terapêutica de fármacos, cujos mecanismos assentam em reverter as alterações da síntese e/ou degradação dos metabolitos *major* dos NT (5HIAA e HVA), e ainda restaurando os cofatores de ativação enzimática através de suplementação dos mesmos. Nos últimos anos, o conhecimento e descobertas sobre este conjunto de doenças raras aumentou. No entanto, a difícil tarefa de integrar sintomas clínicos e valores laboratoriais torna muitas vezes difícil um diagnóstico precoce e a consequente instituição de um tratamento adequado (9).

Tabela 1: ⚓ Doenças Hereditárias dos Neurotransmissores – Painel dos biomarcadores determinados no líquido cefalorraquidiano.

Metabolitos estudados	Abreviatura
Ácido 5-hidroxiindolacético	5-HIAA
Ácido homovanílico	HVA
3-metoxi-4-hidroxifenilglicol	MHPG
3-orto-metildopa	3-OMD
5-hidroxitriptofano	5-OHTrp
Neopterina	NEO
Biopterina	BIO
Sepiapterina	SP
5-metiltetrahidrofolato	5-MTHF

Material e métodos

A base de dados foi elaborada através do levantamento retrospectivo dos estudos de análises no LCR correspondentes a 277 doentes com alterações neurológicas de etiologia desconhecida, principalmente encefalopatias epiléticas graves e doenças do movimento, análises estas efetuadas no Laboratório de Bioquímica Genética/Endocrinologia Especial do Hospital Dona Estefânia em Lisboa, num período compreendido entre 2015-2021. Estes doentes eram provenientes de várias consultas e internamento em diferentes hospitais do Continente e Ilhas, e apresentavam outros estudos bioquímicos genéticos normais.



As amostras foram obtidas e estudadas com consentimento informado e seguindo as normas da Comissão de Ética do HDE.

A escolha da amostra teve por base como método inclusivo: alterações neurológicas sem componente infecciosa, colheita de acordo com o protocolo e informação clínica detalhada, bem como informação terapêutica ou suspensão da mesma com vista à punção lombar.

As amostras foram colhidas em estreita coadjuvação com o laboratório obedecendo a um protocolo de colheita standard elaborado de acordo com o descrito por Hyland (6) e disponibilizado pelos hospitais. As amostras permaneceram a -70° C até ao momento da análise. O painel completo do estudo dos NT compreendeu a determinação das aminas biogénicas, os compostos pterínicos e o 5-MTHF. De acordo com o padrão dos NT e da clínica, a análise da sepiapterina no LCR foi considerada, mesmo que o resultado de biopterina estivesse dentro dos valores de referência. (10,11).

Realizou-se a deteção e determinação quantitativa de marcadores bioquímicos de diagnóstico recorrendo a métodos cromatográficos de HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) acoplado a três diferentes detetores (eletroquímico, *diode array* e de fluorescência), previamente descrito (12).

A análise estatística incluiu análise de variância unidirecional e para o estudo da associação de variáveis o teste de qui-quadrado e uma tabela de contingência bidirecional.

_Resultados e discussão

Neste estudo fez-se um levantamento retrospectivo dos casos submetidos ao painel de estudos dos neurotransmissores (tabela 1), com um grupo de doentes em idade pediátrica e adulta (tabela 2) a quem foi pedido o estudo completo por apresentarem suspeita de DHN.

Considerou-se a existência de alterações nos valores dos neurotransmissores sempre que os níveis dos metabolitos estudados estavam acima ou abaixo do valor de referência. Dos 277 casos levantados, 107 (38,6%) apresentavam a concentração de metabolitos normal. Entre os restantes 170 casos com alteração no perfil bioquímico, 165 (59,6%) concluiu-se como causalidade uma alteração secundária, 3 (1,08%) apresentavam perfil bioquímico compatível com défice primário que foi confirmado através de diagnóstico molecular e, ainda, 2 casos (0,72%) bioquímica e clinicamente correspondentes a distonias sensíveis à dopa cujo diagnóstico molecular não confirmou, um deles por falecimento antes do diagnóstico final.

Tabela 2: Doenças Hereditárias dos Neurotransmissores - Total de casos estudados entre 2015-2021, por idade e sexo (n=277).

Idade/anos	N.º casos	Feminino	Feminino
RN	22	10	12
< 1	83	40	43
1 - 2	64	33	31
3 - 6	48	23	25
7 - 14	38	19	19
> 14	22	11	11
Total	277	136	141



Fez-se uma análise da distribuição dos diferentes fenótipos clínicos divididos por sete grupos (**tabela 3 e gráfico 1**), de acordo com as alterações clínicas apresentadas, independentemente do resultado analítico. Alguns casos sobrepõem-se por apresentarem clínica em mais do que um dos grupos.

Foi investigado, também, a correlação entre os perfis bioquímicos e os fenótipos clínicos, para o grupo de alterações secundárias nos diferentes parâmetros analíticos. Apurou-se ainda, a partir dos dados que este

estudo permitiu levantar e, considerando as alterações encontrada nos NT major (HVA e 5-HIAA) e a terapêutica administrada, uma associação entre as alterações dos NT e o tipo de medicamento anti convulsivante ministrado (dados não apresentados). Com o objetivo de uma futura compreensão da relação entre epilepsia e neurotransmissores e foco na melhoria dos tratamentos e efeitos nos pacientes, será importante explorar esta variável.

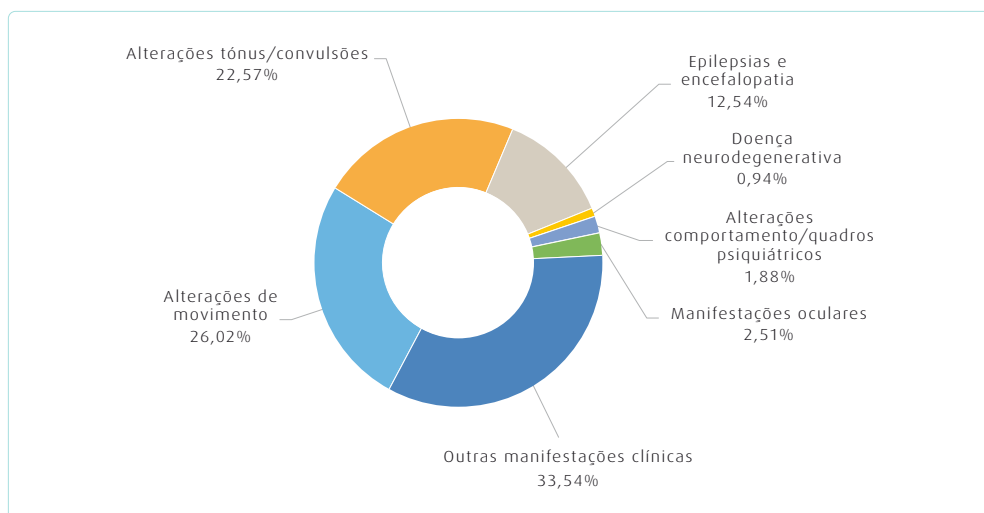
Encontrou-se uma associação significativa entre a concentração baixa de HVA e do 5HIAA e os doentes pertencentes ao grupo 3 (com manifestações clínicas de epilepsias e encefalopatia). Relativamente à correlação existente entre este grupo (epilepsia e encefalopatia) e a diminuição da concentração dos NT *major*, esta está de acordo com o descrito na literatura e pode estar relacionada com a manifestação própria da epilepsia ou, mesmo, dever-se ao tratamento instituído (13).

Neste estudo preliminar e em termos de alterações primárias com confirmação genética, foi diagnosticado uma percentagem de 1,08, que é superior aos achados em algumas publicações com uma amostra semelhante à deste estudo (15), mas é inferior em percentagem em artigo com uma coorte mais representativa (14).

Tabela 3: ⚡ Doenças Hereditárias dos Neurotransmissores – Distribuição dos fenótipos clínicos por grupos de acordo com as manifestações clínicas.

Grupo	Manifestações clínicas
Grupo 1	Alterações de movimento
Grupo 2	Alterações tónus/convulsões
Grupo 3	Epilepsias e encefalopatia
Grupo 4	Doença neurodegenerativa
Grupo 5	Alterações comportamento/quadros psiquiátricos
Grupo 6	Manifestações oculares
Grupo 7	Outras manifestações clínicas

Gráfico 1: ⚡ Distribuição da frequência dos fenótipos clínicos dos doentes submetidos ao estudo bioquímico dos neurotransmissores.





Conclusões

A análise de amostras do líquido cefalorraquidiano (LCR) continua a ser a análise *"golden standard"* para o diagnóstico bioquímico das Doenças Hereditárias dos Neurotransmissores (DHN). É também de salientar a importância do estudo de um painel completo dos metabolitos no LCR, num mesmo laboratório, facilitando a análise e integração dos resultados. A análise e interpretação desta investigação bioquímica no LCR é extremamente exigente e apenas está disponível em centros de referência.

No caso de DHN como em outras alterações metabólicas, o diagnóstico precoce e atempado destas doenças hereditárias reveste-se de uma grande importância, uma vez que após a sua identificação e caracterização, pode recorrer-se a uma rápida aplicação de medidas terapêuticas e dietas, que evitam sequelas maiores e promovem uma boa qualidade de vida.

Futuramente, pretende-se completar o presente trabalho fazendo a correlação das alterações secundárias *versus* medicação (15) e outras abordagens estatísticas mais aprofundadas.

Em conclusão, uma estreita colaboração entre especialistas de laboratório e médicos é fundamental para a interpretação e compreensão dos níveis de neurotransmissores no LCR, o que impulsiona no sentido de uma contínua procura do conhecimento e formação específica na área assistencial e de investigação.

Agradecimentos:

A todos os neuropediatras das unidades de neurologia dos Hospitais (H): H. de Dona Estefânia, CHULC Lisboa; CMIM do CHU Porto; H. de Santa Maria, CHLN, Lisboa; H. Amadora-Sintra; H. do Barreiro; H. Divino Espírito Santo, Ponta Delgada e Terceira; CH Algarve; H. Fernando da Fonseca, Lisboa; Ao Dr. Carlos Flores, Diretor do Serviço de Patologia Clínica do CHULC, Lisboa.

Referências bibliográficas:

- (1) Pearl PL, Capp PK, Novotny EJ, et al. Inherited disorders of neurotransmitters in children and adults. *Clin Biochem*. 2005 Dec;38(12):1051-8. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.09.012>
- (2) Ng J, Papandreou A, Heales SJ, Kurian MA. Monoamine neurotransmitter disorder - clinical advances and future perspectives. *Nat Rev Neurol*. 2015 Oct;11(10):567-84. Epub 2015 Sep 22. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2015.172>
- (3) Kurian MA, Gissen P, Smith M, et al. The monoamine neurotransmitter disorders: an expanding range of neurological syndromes. *Lancet Neurol*. 2011 Aug;10(8):721-33. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70141-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70141-7)
- (4) García-Cazorla A, Ormazábal A, Artuch R, et al. Errores congénitos de los neurotransmissores en Neuropediatría. *Rev Neurol*. 2005 Jul 16-31;41(2):99-108. <https://neurologia.com/articulo/2004377>
- (5) chenne B, Roubertie A, Leydet J, et al. Monoamine metabolism study in severe, early-onset epilepsy in childhood. *Epileptic Disord*. 2008 Jun;10(2):130-5. <https://doi.org/10.1684/epd.2008.0181>
- (6) Hyland, K. The lumbar puncture for diagnosis of pediatric neurotransmitter diseases. *Ann Neurol* 2003;54(suppl 6):S13-S17. <https://doi.org/10.1002/ana.10627>
- (7) Molero-Luis M, Serrano M, Ormazábal A, et al.; Neurotransmitter Working Group. Homovanillic acid in cerebrospinal fluid of 1388 children with neurological disorders. *Dev Med Child Neurol*. 2013 Jun;55(6):559-66. Epub 2013 Mar 11. <https://doi.org/10.1111/dmcn.12116>
- (8) Burlina AB, Celato A, Polo G, et al. The Utility of CSF for the Diagnosis of Primary and Secondary Monoamine Neurotransmitter Deficiencies. *EJIFCC*. 2017 Mar 8;28(1):64-76. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5387700/>
- (9) Brennenstuhl H, Jung-Klawitter S, Assmann B, et al. Inherited Disorders of Neurotransmitters: Classification and Practical Approaches for Diagnosis and Treatment. *Neuropediatrics*. 2019 Feb;50(1):2-14. Epub 2018 Oct 29. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1673630>
- (10) Malek N, Fletcher N, Newman E. Diagnosing dopamine-responsive dystonias. *Pract Neurol*. 2015 Oct;15(5):340-5. E pub 2015 Jun 4. <https://doi.org/10.1136/practneurol-2015-001101>
- (11) Hoffmann FG, Blau N (eds). Congenital neurotransmitter disorders: a clinical approach. Huppauge, NY: Nova Publishers. Inc, 2014.
- (12) Ormazabal A, García-Cazorla A, Fernández Y, et al. HPLC with electrochemical and fluorescence detection procedures for the diagnosis of inborn errors of biogenic amines and pterins. *J Neurosci Methods*. 2005 Mar 15;142(1):153-8. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2004.08.007>
- (13) García-Cazorla A, Serrano M, Pérez-Dueñas B, et al. Secondary abnormalities of neurotransmitters in infants with neurological disorders. *Dev Med Child Neurol*. 2007 Oct;49(10):740-4. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.2007.00740.x>
- (14) Kuster A, Arnoux JB, Barth M, et al.; Individual contributors who contributed to this work. Diagnostic approach to neurotransmitter monoamine disorders: experience from clinical, biochemical, and genetic profiles. *J Inherit Metab Dis*. 2018 Jan;41(1):129-39. Epub 2017 Sep 18. <https://doi.org/10.1007/s10545-017-0079-6>
- (15) van Karnebeek CDM, Dunbar M, Egri C, et al. Secondary Abnormal CSF Neurotransmitter Metabolite Profiles in a Pediatric Tertiary Care Centre. *Can J Neurol Sci*. 2018 Mar;45(2):206-13. <https://doi.org/10.1017/cjn.2017.271>