



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudios de biomarcadores y de posibles terapias en la deficiencia del transportador de creatina y en la enfermedad de Niemann-Pick tipo C

Sonia Pajares García

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**ESTUDIOS DE BIOMARCADORES Y DE POSIBLES
TERAPIAS EN LA DEFICIENCIA DEL TRANSPORTADOR
DE CREATINA Y EN LA ENFERMEDAD DE NIEMANN-PICK
TIPO C.**

Sonia Pajares García

Tesis Doctoral

Barcelona, 2016



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**ESTUDIOS DE BIOMARCADORES Y DE POSIBLES TERAPIAS EN LA
DEFICIENCIA DEL TRANSPORTADOR DE CREATINA Y EN LA
ENFERMEDAD DE NIEMANN-PICK TIPO C.**

Memoria presentada por

Sonia Pajares García

Para optar al grado de

Doctor por la Universidad de Barcelona

Programa de Medicina

Tesis realizada bajo la dirección de la Dra. Antònia Ribes Rubió y la Dra. Maria Josep Coll Rosell en la Sección de Errores Congénitos del Metabolismo del Servicio de Bioquímica y Genética Molecular del Hospital Clínic de Barcelona

Los directores,

El tutor,

Dra. Antònia
Ribes Rubió

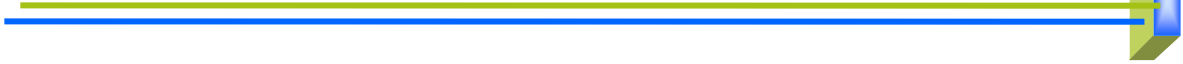
Dra. Maria Josep
Coll Rosell

Dr. Wladimiro
Jiménez Povedano

Sonia Pajares García

Barcelona, 2016

ÍNDICE





1. DEFICIENCIA DEL TRANSPORTADOR DE CREATINA

1.1 Biosíntesis de creatina	25
1.2 Transportador de creatina	26
1.2.1 Gen del transportador de creatina	26
1.2.2 Proteína transportadora de Cr.....	26
1.2.3 Transportador de creatina en cerebro	27
1.3 Creatina y creatina quinasa.....	30
1.4 Funciones de la creatina	32
1.5 Enfermedades metabólicas hereditarias en el metabolismo de la creatina.....	33
1.5.1 Deficiencia de guanidinoacetato metiltransferasa (GAMT).....	33
1.5.2 Deficiencia de L-arginina:glicina amidinotransferasa (AGAT).....	34
1.5.3 Deficiencia del transportador de creatina (CRTR)	34
1.5.4 Defecto del transportador de creatina (MCT12).....	36
1.5.5 Diagnóstico de las deficiencias cerebrales de creatina.....	37
1.5.6 Tratamiento de las deficiencias cerebrales de creatina	39
1.6 Papel del sistema CK/ATP como biomarcador en las deficiencias cerebrales de Cr	40
1.7 Papel de la Cr como biomarcador de las enfermedades mitocondriales	41

2. ENFERMEDAD DE NIEMANN-PICK TIPO C

2.1 Antecedentes históricos	43
2.2 Características clínicas	44
2.3 Bases fisiopatológicas.....	45
2.3.1. Proteína NPC1	45
2.3.2 Proteína NPC2	46
2.3.3 Relación entre las proteínas NPC1 y NPC2 y el metabolismo intracelular del colesterol	47
2.3.4 Lípidos de membrana y esfingomielina	50
2.3.5 Glicoesfingolípidos.....	51
2.3.6 Bases esfingoides.....	52
2.3.7 Autofagia	53

2.4 Diagnóstico clínico	53
2.5 Diagnóstico bioquímico.....	54
<i>Análisis de laboratorio no específicos</i>	54
<i>Tinción de filipina en fibroblastos</i>	54
<i>Nuevos biomarcadores</i>	55
<i>Oxisteroles</i>	55
<i>Otros biomarcadores</i>	57
2.6 Diagnóstico genético	59
2.7 Correlación genotipo-fenotipo.....	61
2.8 Tratamiento.....	62
2.8.1 <i>Terapia paliativa de los síntomas clínicos</i>	62
2.8.2 <i>Terapia basada en el metabolismo lipídico, antioxidantes, terapia epigenética y trasplante</i>	62
2.8.3 <i>Terapia de reducción de sustrato</i>	63
2.8.4 <i>Terapia basada en el metabolismo de esteroides</i>	65

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS **67**

MÉTODOS **71**

RESULTADOS **75**

Informe sobre la contribución de la doctoranda a las publicaciones de esta tesis doctoral.....	77
Presentación de los resultados.....	80

1. Deficiencia del transportador de creatina

Artículo 1: Creatine derivatives in the treatment of creatine transporter deficiency.....	81
Artículo 2: Analysis of the Cr/CK/PCr/ATP system in cerebral creatine deficiency syndromes.....	111
Artículo 3: Role of creatine as biomarker of mitochondrial diseases.	129

2. Enfermedad de Niemann-Pick tipo C

Artículo 4: Cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol in lipidosis: High levels in Niemann Pick type C, Cerebrotendinous Xanthomatosis and Lysosomal Acid Lipase deficiency	137
---	-----

RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN GENERAL 157

1. DEFICIENCIA DEL TRANSPORTADOR DE CREATINA (CRTR).....159

1.1 Estudio de posibles terapias para la deficiencia del transportador de creatina (CRTR)	162
<i>Eficacia de los derivados de Cr (PCr-Mg-CPLX, CrOBzl y Au-HC-NPs)</i>	162
<i>Eficacia de los precursores de Cr</i>	166
1.2. Estudio de biomarcadores.....	168
1.2.1 Sistema Cr/CK/CrP/ATP.....	169
1.2.2 Cr como biomarcador en las enfermedades mitocondriales.....	173

2. ENFERMEDAD DE NIEMANN-PICK TIPO C177

2.1. Colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol (CT) y 7-cetocolesterol (7-KC) como biomarcadores en el diagnóstico bioquímico de la enfermedad de Niemann-Pick tipo C.....	177
2.2. Colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol (CT) y 7-cetocolesterol (7-KC) como biomarcadores en la monitorización de tratamientos en la enfermedad de Niemann-Pick tipo C.....	184
2.3. Colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol (CT) y 7-cetocolesterol (7-KC) en otras enfermedades.....	186
<i>Enfermedades lisosomales</i>	186
<i>Enfermedades del metabolismo de esteroides</i>	187
<i>Enfermedades peroxisomales y otras enfermedades</i>	190
2.4. ¿Cómo se explicaría la salida de colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol (CT) y 7-cetocolesterol (7-KC) desde la célula a la circulación sanguínea?.....	191
2.5 Resumen del papel de colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol (CT) y 7-cetocolesterol (7-KC).....	191

CONCLUSIONES 193

BIBLIOGRAFÍA 197

Figura 1. Ruta metabólica de la Cr.

Figura 2. Modelo de transporte de Cr en la membrana basal y basolateral.

Figura 3. Modelo de disociación de AGAT, GAMT y CRTR en cerebro.

Figura 4. Transporte de creatina y guanidinoacetato en la barrera hematoencefálica y barrera sangre-líquido cefalorraquídeo.

Figura 5. CRTR en la sinapsis neuronal.

Figura 6. Sistema de transferencia de energía Cr/CK/CrP.

Figura 7. Algoritmo diagnóstico para las deficiencias cerebrales de Cr.

Figura 8. Moléculas derivadas de Cr como posibles candidatas para la terapia de la deficiencia del transportador de Cr.

Figura 9. Formas clínicas de presentación de la enfermedad de Niemann-Pick tipo C.

Figura 10. Proteínas NPC1 y NPC2.

Figura 11. Metabolismo intracelular del colesterol.

Figura 12. Tráfico del colesterol en el sistema nervioso central.

Figura 13. Proceso de autofagia defectuosa y los efectos de su estimulación en la enfermedad de Niemann-Pick tipo C.

Figura 14. Imágenes de microscopia de fluorescencia de los acúmulos de colesterol libre intracelular en fibroblastos mediante la técnica citoquímica con filipina.

Figura 15. Estructura del 7-cetocolesterol y colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol formados a partir del colesterol.

Figura 16. Algoritmo diagnóstico de la enfermedad de Niemann-Pick tipo C propuesto por “The NPC Guidelines Working Group”.

Figura 17. Principales terapias en la Enfermedad de Niemann-Pick tipo C.

Figura 18. Mecanismo de acción de miglustat (N-butil-deoxinojirimicina; Zavesca®).

Figura 19. Efecto de la ciclodextrina en los defectos funcionales celulares de la enfermedad de Niemann-Pick tipo C.

Figura 20. Silenciamiento de SLC6A8 mediante siRNA en células HUVEC y HBMEC.

Figura 21. Captación celular de PCr-Mg-CPLX, CrOBzl y Au-HC-NPs.

Figura 22. Composición de las soluciones acuosas de PCr-Mg-CPLX y CrOBzl.

Figura 23. Captación celular de arginina y glicina en fibroblastos, células HUVEC y HBMEC.

Figura 24. Niveles de ATP, ADP, AMP, CrP, Cr y CK en pacientes con deficiencia de CRTR y GAMT.

Figura 25. Concentración de Cr en controles y pacientes con enfermedades mitocondriales.

Figura 26. Curvas de regresión lineal entre: (a) Cr plasmática y lactato en sangre y (b) Cr plasmática y actividades de la cadena respiratoria.

Figura 27. Capacidad diagnóstica de la Cr plasmática en la detección de pacientes con enfermedades mitocondriales.

Figura 28. Espectro ESI-MS/MS de los iones de los productos de CT, CT-d₇, 7-KC Y 7-KC-d₇ a partir de los iones precursores correspondientes.

Figura 29. Derivados mono-dimetilglicina de CT y 7-KC a diferentes concentraciones y tiempos de incubación.

Figura 30. Concentración plasmática de CT y 7-KC en controles, pacientes NPC y otras enfermedades.

Figura 31. Niveles plasmáticos de CT y 7-KC en pacientes NPC en tratamiento con miglustat o ciclodextrina.

Figura 32. Cromatograma (MRM) de un plasma control, paciente NPC, XCT y deficiencia de LAL.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados de la validación del método para el análisis de ATP, ADP, AMP, CRP y Cr mediante HPLC-ESI-MS/MS.

Tabla 2. Resultados de la validación del método para el análisis de CT y 7-KC mediante HPLC-ESI-MS/MS.

Tabla 3. Fenotipo clínico, bioquímico y genotipo de nuevos pacientes NPC y NPB diagnosticados a través del análisis de oxiesteroles.

ABREVIATURAS

<i>ACAT</i>	<i>acil-CoA-colesterol-O-aciltransferasa</i>
<i>AGAT</i>	<i>L-arginina: glicina amidinotransferasa</i>
<i>ANT-1</i>	<i>translocador de nucleótidos de adenina</i>
<i>APCI</i>	<i>ionización química a presión atmosférica</i>
<i>Apo B</i>	<i>apolipoproteína B</i>
<i>Au-HC-NPs</i>	<i>nanopartículas de oro de Cr</i>
<i>BCSFB</i>	<i>barrera sangre-líquido cefalorraquídeo</i>
<i>B-1,4-GalNac transferasa</i>	<i>β-1,4-N-acetilgalactosaminiltransferasa</i>
<i>BHE</i>	<i>barrera hematoencefálica</i>
<i>BMP</i>	<i>bis(monoacilglicerol)fosfato</i>
<i>CCDS</i>	<i>síndromes de deficiencia de Cr cerebral</i>
<i>cCK</i>	<i>creatina quinasa citosólica</i>
<i>CDCA</i>	<i>ácido quenodeoxicólico</i>
<i>CEE</i>	<i>creatina etil éster</i>
<i>ChEH</i>	<i>colesterol epóxido hidrolasa</i>
<i>CJMG</i>	<i>catarata juvenil, microcornea y glucosuria</i>
<i>CK</i>	<i>creatina quinasa</i>
<i>CK-BB</i>	<i>creatina quinasa específica de cerebro</i>
<i>CK-MB</i>	<i>creatina quinasa específica de músculo cardíaco</i>
<i>CK-MM</i>	<i>creatina quinasa específica de músculo esquelético</i>
<i>Cr</i>	<i>creatina</i>
<i>Crn</i>	<i>creatinina</i>
<i>CrOBzl</i>	<i>creatina-benzil-éster</i>
<i>CrP</i>	<i>creatinafosfato</i>
<i>CRTR</i>	<i>transportador de Cr</i>
<i>CT</i>	<i>colestano-3β,5α,6β-triol</i>
<i>CTSD</i>	<i>catepsina D</i>
<i>CYP27A1</i>	<i>27-hidroxilasa</i>
<i>DHCR7</i>	<i>7-dehidrocolesterol reductasa</i>
<i>5,6-EC</i>	<i>epóxido-5,6-colesterol</i>
<i>ESI</i>	<i>ionización de electroespray</i>
<i>ET</i>	<i>endosoma tardío</i>

<i>GAA</i>	<i>guanidinoacetato</i>
<i>GAMT</i>	<i>s-adenosil-L-metionina:N-guanidinoacetato metiltransferasa</i>
<i>GlcSph</i>	<i>glucosilesfingosina</i>
<i>HBMEC</i>	<i>células endoteliales microvasculares cerebrales humanas</i>
<i>HDAC</i>	<i>histona deacetilasa</i>
<i>HMG-CoA reductasa</i>	<i>3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa</i>
<i>HPβCD</i>	<i>2-hidroxipropil-β-ciclodextrina</i>
<i>HPγCD</i>	<i>2-hidroxipropil-γ-ciclodextrina</i>
<i>HPLC-ESI-MS/MS</i>	<i>cromatografía líquida de alta resolución y ionización por electrospray-acoplada a espectrometría de masas en tándem</i>
<i>HUVEC</i>	<i>células endoteliales humanas de vena umbilical</i>
<i>iPS</i>	<i>células madre pluripotenciales inducidas</i>
<i>7-KC</i>	<i>7-cetocolesterol</i>
<i>KO</i>	<i>knock-out</i>
<i>L</i>	<i>lisosoma</i>
<i>LAL</i>	<i>lipasa ácida lisosomal</i>
<i>LCR</i>	<i>líquido cefalorraquídeo</i>
<i>LDL</i>	<i>lipoproteínas de baja densidad</i>
<i>LGALS3</i>	<i>galectina-3</i>
<i>LPMC</i>	<i>contactos de membrana lisosoma-peroxisoma</i>
<i>LXR</i>	<i>liver X receptor</i>
<i>Lyso-SM-509</i>	<i>liso-esfingomielina-509</i>
<i>MCT12</i>	<i>transportador monocarboxilato 12</i>
<i>MEFL</i>	<i>media equivalente de fluorescencia</i>
<i>MPT</i>	<i>poro de transición de la permeabilidad mitocondrial</i>
<i>mtCK</i>	<i>creatina quinasa mitocondrial</i>
<i>mtDNA</i>	<i>DNA mitocondrial</i>
<i>NPA</i>	<i>Niemann-Pick tipo A</i>
<i>NPB</i>	<i>Niemann-Pick tipo B</i>
<i>NPC</i>	<i>Niemann-Pick tipo C</i>
<i>NPD</i>	<i>Niemann-Pick tipo D</i>
<i>PCr-Mg-CPLX</i>	<i>complejo de creatinafosfato-magnesio</i>
<i>PDH</i>	<i>piruvato deshidrogenasa</i>
<i>PI(4,5)P2</i>	<i>fosfatidilinositol (4,5) bifosfato</i>
<i>RE</i>	<i>retículo endoplasmático</i>

<i>RMS</i>	<i>resonancia magnética con espectroscopía</i>
<i>SAH</i>	<i>s-adenosilhomocisteína</i>
<i>SAM</i>	<i>s-adenosilmetionina</i>
<i>SCAP</i>	<i>proteína reguladora de esteroides</i>
<i>siRNA</i>	<i>RNA pequeño de interferencia</i>
<i>SLC6A8</i>	<i>transportador de membrana 6</i>
<i>SLO</i>	<i>Smith-Lemli-Opitz</i>
<i>SNAG-Δ^5-CA</i>	<i>ácido 3-β-sulfoxi-7-β-N-acetilglucosaminil-5-colen-24-oico</i>
<i>SNAG-Δ^5-CG</i>	<i>conjugado de glicina de SNAG-Δ^5-CA</i>
<i>SNAG-Δ^5-CT</i>	<i>conjugado de taurina de SNAG-Δ^5-CA</i>
<i>SPC</i>	<i>lisoefingomielina</i>
<i>SREBP</i>	<i>proteína de unión al elemento regulador del esteroide</i>
<i>SSD</i>	<i>dominio sensible a esteroides</i>
<i>Syt7</i>	<i>sinaptotagmina7</i>
<i>TauT/SLC6A6</i>	<i>transportador de taurina</i>
<i>THC</i>	<i>3α,7α,12α-trihidroxiprostano</i>
<i>VDAC</i>	<i>canal aniónico voltaje-dependiente</i>
<i>VLDL</i>	<i>lipoproteínas de muy baja densidad</i>
<i>XCT</i>	<i>Xantomatosis cerebrotendinosa</i>

INTRODUCCIÓN



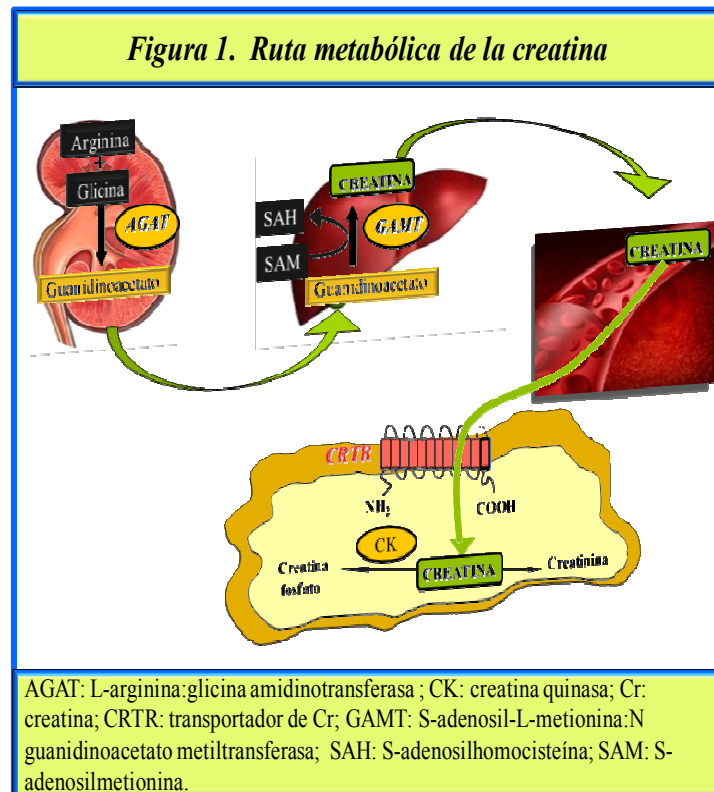
1. DEFICIENCIA DEL TRANSPORTADOR DE CREATINA

1.1 Biosíntesis de creatina

La creatina (Cr) es un compuesto guanidínico descrito en 1835 por Chevreul y col. [1] cuyo nombre proviene del nombre griego de carne “kreas”. En 1847, Liebig [2] confirmó que la Cr era un componente de la carne animal y alrededor del año 1930 se demostró que la suplementación de Cr incrementaba el contenido de Cr/creatinafosfato (Cr/CrP) muscular en animales y humanos demostrando su papel en el metabolismo del músculo esquelético [3].

Alrededor del 50% de los requerimientos celulares de Cr provienen de la dieta y el resto de la biosíntesis endógena [4]. La primera etapa de síntesis, catalizada por la enzima L-arginina:glicina amidinotransferasa (AGAT, EC 2.1.4.1), sintetiza guanidinoacetato (GAA) y ornitina a partir de L-arginina y glicina mayoritariamente en riñón. La segunda, catalizada por la enzima S-adenosil-L-metionina:N guanidinoacetato metiltransferasa (GAMT, EC 2.1.1.2), consiste en la metilación de GAA a partir de S-adenosilmetionina dando lugar a Cr y S-adenosilhomocisteína, que tiene lugar mayoritariamente en hígado [3] (Fig. 1).

La Cr se internaliza al interior de la célula mediante un transportador específico (CRTR) y una vez en su interior, ésta puede ser fosforilada a CrP mediante la acción de la enzima creatina quinasa (CK), almacenando la energía en forma de ATP. Finalmente, la Cr se transforma no enzimáticamente y a una velocidad constante en creatinina, que se excreta en orina (Fig.1).



1.2 Transportador de creatina

1.2.1 Gen del transportador de creatina

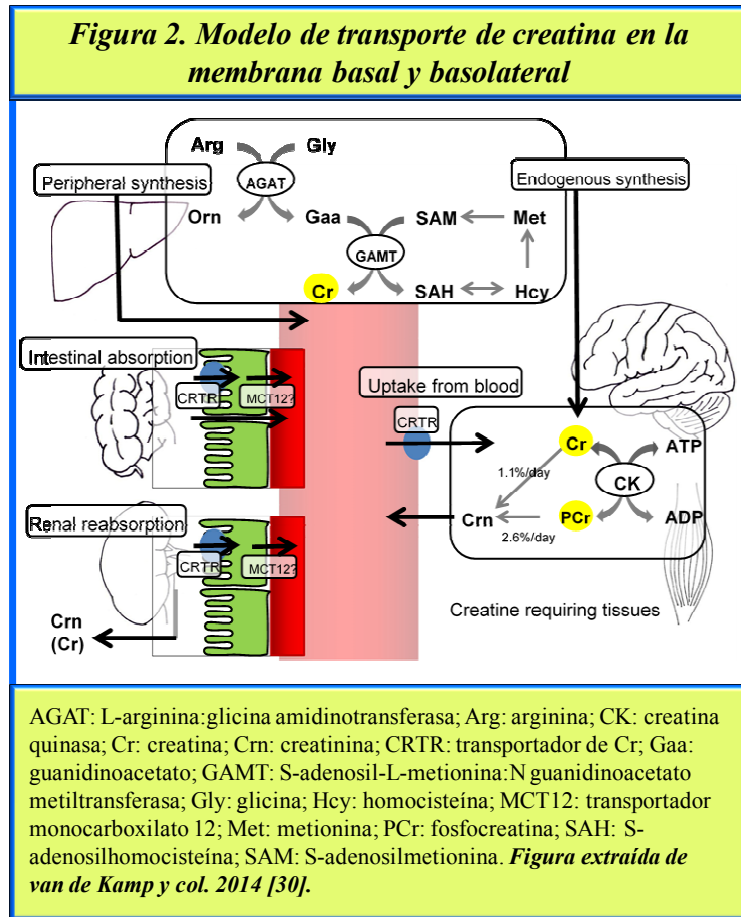
La captación celular de la Cr se lleva a cabo mediante un transportador denominado CRTR, CT1 o SLC6A8 (MIM#300036) que forma parte de la familia de transportadores de membrana 6 (SLC6) [5,6]. CRTR está codificado por el gen *SLC6A8* localizado en el cromosoma Xq28 y ocupa aproximadamente 8.5 kb conteniendo 13 exones [5,7-8].

Además del gen *SLC6A8*, se han descrito dos pseudogenes para CRTR denominados *SLC6A10PA* y *SLC6A10PB* localizados en el cromosoma 16p11.2 y que presentan un elevado grado de similitud con la secuencia del gen *SLC6A8* [9-13]. Diversos trabajos han demostrado una expresión mayoritaria de *SLC6A10* en testículo [9-10] y cerebro [14] aunque también se ha observado en otros tejidos como riñón, músculo esquelético o médula espinal [15].

1.2.2 Proteína transportadora de Cr

CRTR es una proteína que contiene 12 dominios transmembrana con 635 aminoácidos y un peso molecular de 70.5 kDa [16]. El transporte de Cr es dependiente de Na⁺ y Cl⁻ (2:1) y trabaja contra gradiente de concentración [17-19]. La captación de Cr es de tipo saturable con una k_m alrededor de 15-110 μ M aunque también se ha descrito una cinética de no saturación con una $k_m \geq 1.3$ mM [20-22]. CRTR se encuentra en la mayoría de tejidos, predominantemente en músculo esquelético, riñón, corazón y cerebro [5, 7, 9, 23-24]. Algunos estudios en riñón de rata han demostrado la presencia de CRTR en la membrana apical de las células tubulares proximales mientras que se encuentra en muy poca cantidad en la membrana basolateral [25]. De un modo similar, este patrón también se ha descrito en los enterocitos siendo la expresión de CRTR exclusivamente a nivel de la membrana apical de las vellosidades de intestino [26]. Estos indicios sugieren que CRTR estaría implicado en la captación de Cr, tanto en las células epiteliales de riñón como a nivel intestinal, requiriéndose otro tipo de transportador de Cr en la membrana basolateral para proporcionar el paso de Cr desde las células a la sangre [25].

Recientemente, se ha descrito un segundo transportador de Cr, MCT12, un miembro de la familia de los transportadores monocarboxilato (MCT) que está codificado por el gen *SLC16A12* (MIM#611910) localizado en el cromosoma 10q23.13 [24, 27]. El transporte de Cr mediante MCT12, a diferencia de CRTR, se lleva a cabo de forma facilitada, bidireccional y con una K_m superior [24].



MCT12 se encuentra mayoritariamente en riñón, retina, pulmón y testículo; en menor proporción se halla en corazón, músculo y cristalino y muy poco en cerebro y hígado [24, 28].

Otro estudio llevado a cabo por Castorino y col. [29] demostró que MCT12 se localizaba predominantemente en la membrana basolateral del cristalino. Esta evidencia podría explicar los interrogantes que se planteaban sobre la distribución de CRTR en la célula y se sugiere un nuevo modelo de transporte de Cr en el que participaría CRTR y MCT12 en localizaciones opuestas en las células epiteliales. Por un lado, CRTR situado en la membrana apical estaría involucrado en la captación de Cr, mientras que MCT12 situado en la membrana basolateral, cooperaría en el transporte transepitelial de Cr [24, 30] (Fig. 2).

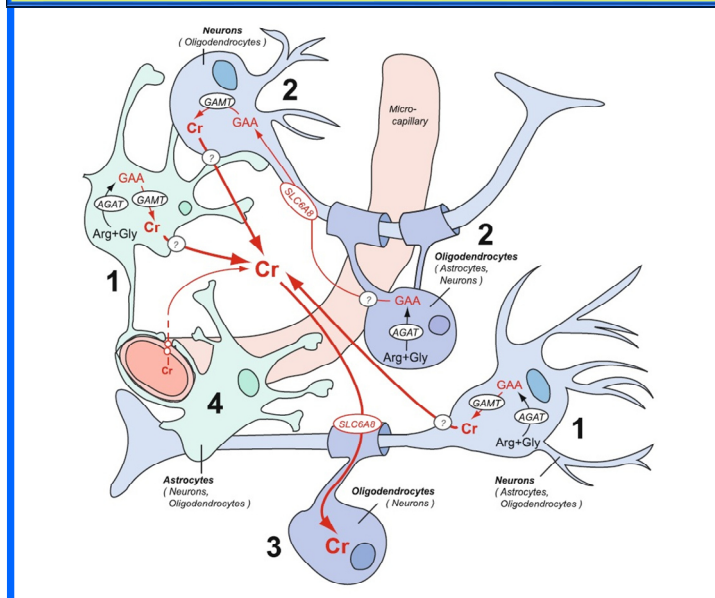
1.2.3 Transportador de creatina en cerebro

En cerebro también se han descrito diferencias en la expresión celular de CRTR. Algunos estudios iniciales en cerebro de ratón demostraron que CRTR se encontraba

localizado en neuronas y oligodendrocitos pero no en astrocitos [31-32]. Lowe y col. [33] describieron por primera vez la distribución de CRTR en cerebro humano y observaron que CRTR se expresaba mayoritariamente en las neuronas de proyección y la médula espinal incluyendo las neuronas piramidales en el córtex cerebral, células de Purkinje en el córtex cerebelar, neuronas de los núcleos somáticos motores y visceromotores y el cuerno ventral de la médula espinal. Por el contrario, las neuronas espinosas medias del cuerpo estriado y las neuronas catecolaminérgicas de la sustancia negra y el locus coeruleus, que están implicados en las enfermedades neurodegenerativas mostraban una muy baja expresión de CRTR.

En células endoteliales de la barrera hematoencefálica (BHE) también se describió la expresión de CRTR [34-37] demostrándose así que parte de la Cr cerebral provenía de la captación de Cr desde la sangre. Sin embargo, esta captación constituía un bajo porcentaje de todo el contenido de Cr cerebral [38] probablemente debido a la ausencia de CRTR en los astrocitos, los cuales constituyen más del 98% de las células endoteliales microcapilares de la BHE [37].

Figura 3. Modelo de disociación de AGAT, GAMT y CRTR en cerebro.



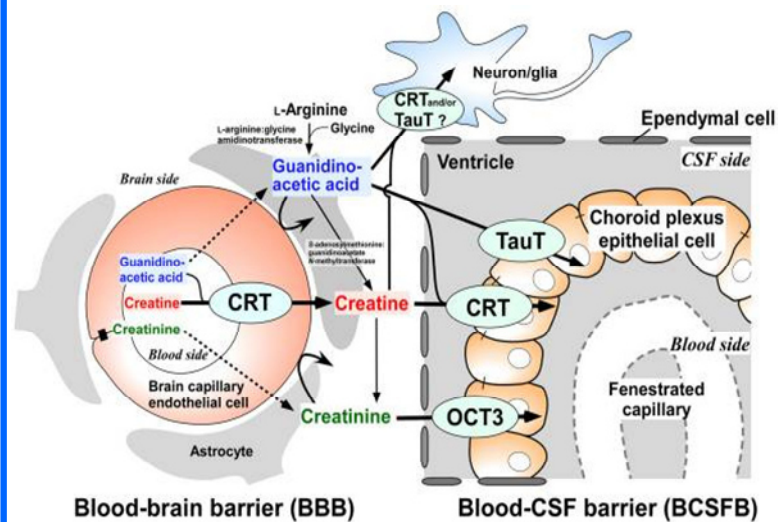
AGAT: L-arginina:glicina amidinotransferasa; Arg: arginina; Cr: creatina; GAA: guanidinoacetato; GAMT: S-adenosil-L-metionina: N guanidinoacetato metiltransferasa; Gly: glicina; SLC6A8: transportador de creatina. **Figura extraída de Braissant y col. 2010 [44].**

Estos hechos sugerían que el cerebro dependería principalmente de la síntesis endógena de Cr. Existen distintos estudios en los que se ha demostrado la síntesis de Cr en cerebro de rata, en células astrogliales y neuronas [35, 39-43]. También se ha descrito la existencia de las enzimas AGAT y GAMT en cerebro de rata [31, 42, 44] y dadas las diferencias encontradas en la expresión celular de ambas enzimas se propuso un modelo llamado “modelo de disociación” [42, 44] (Fig. 3). Se ha descrito que las enzimas AGAT y GAMT raramente co-existen en el mismo tipo celular de manera que el

producto intermediario en la síntesis de Cr, GAA, debería de transportarse desde las células que contienen la enzima AGAT a las células que contienen la enzima GAMT por mediación de CRTR para asegurar la síntesis final de Cr [42, 44] (Fig.3).

Por otro lado, se ha descrito que el transporte de GAA desde el líquido cefalorraquídeo (LCR) a la sangre a través de la barrera sangre-LCR no sólo se produciría por mediación de CRTR, sino también por el transportador de taurina (TauT/SLC6A6) [36, 45]. De este modo, la barrera sangre-LCR funcionaría como un sistema de drenaje de los compuestos

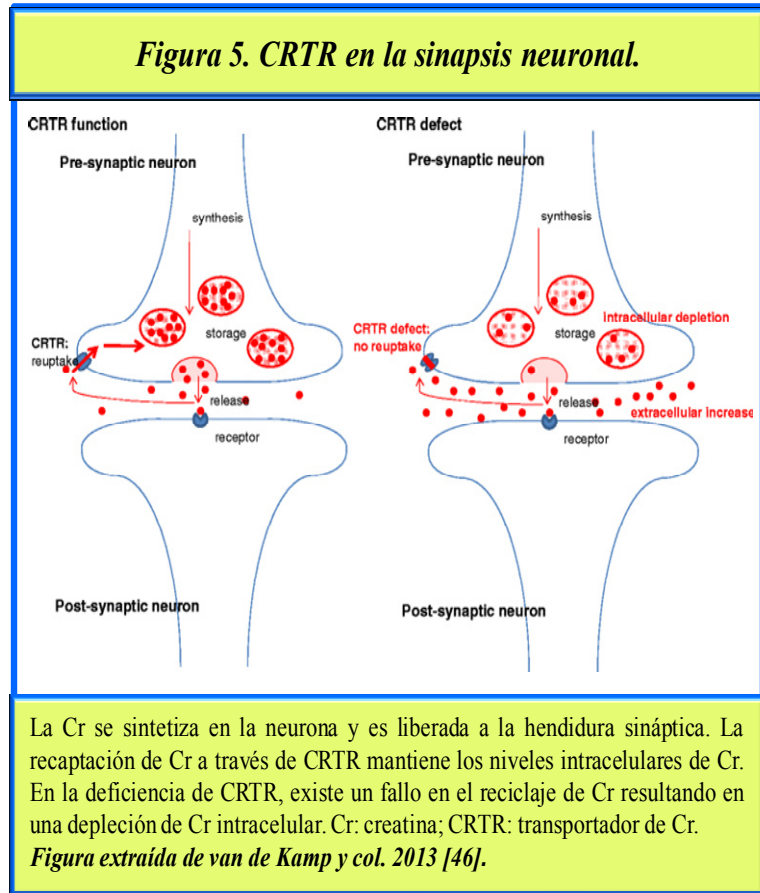
Figura 4. Transporte de creatina y guanidinoacetato en la barrera hematoencefálica y barrera sangre-líquido cefalorraquídeo.



BBB: barrera hematoencefálica; BCSFB: barrera sangre-líquido cefalorraquídeo; CRT: transportador de Cr; CSF: líquido cefalorraquídeo; OCT3: transportador catiónico orgánico (SLC22A3); TauT: transportador de taurina. *Figura extraída de Tachikawa y Hosoya 2011 [36].*

guanidínicos, que junto con los transportadores de la BHE, jugarían un papel determinante en los niveles cerebrales de estos compuestos [36, 45] (Fig. 4). Posteriormente Carducci y col. [43] confirmaron que las neuronas y astrocitos no sólo tenían capacidad para sintetizar Cr sino también para captar Cr, en contraposición a lo descrito en estudios previos [31-32]. Carducci y col. [43] observaron que la concentración intracelular de Cr era superior cuando ésta procedía de la captación, en comparación con la procedente de la síntesis *de novo*. Este trabajo sugiere que a pesar de que el cerebro tiene capacidad propia de síntesis de Cr, ésta es limitada. Estos hallazgos también estarían de acuerdo con la hipótesis de “fallo de recaptación” que van de Kamp y col. sugerían [46], donde el papel de la síntesis de Cr para mantener un nivel de reserva de Cr también es despreciable comparado con el de la recaptación (Fig. 5). El hecho de que pacientes con deficiencia de CRTR presenten niveles normales o ligeramente elevados en LCR, conduce a estos autores a pensar que la Cr se eliminaría a

través del LCR debido a un fallo en la recaptación sináptica como resultado de la deficiencia de CRTR [46]. Algunos autores [46-49] han considerado que la Cr tendría un papel como neurotransmisor. Esta idea surgió a partir de estudios previos en cortes de cerebro de rata en los que se corroboraba que la liberación de Cr dependía de una despolarización Ca^{2+} dependiente además de inducir una activación de los canales Na^+/K^+ .

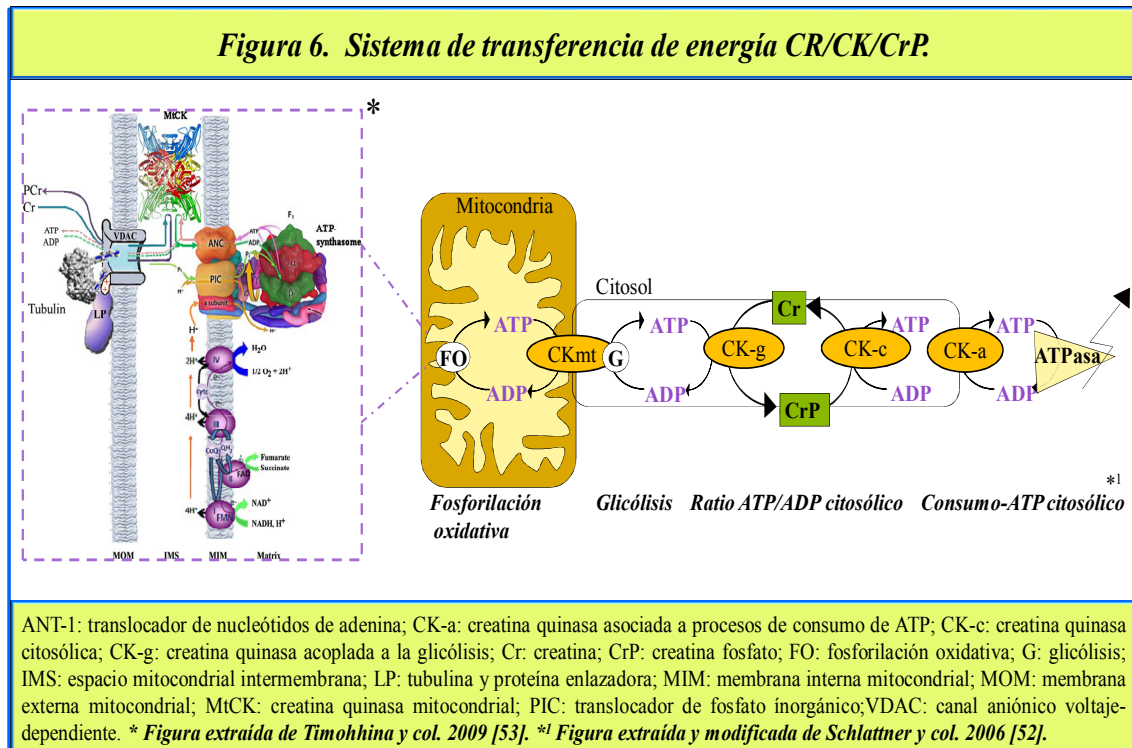


Como consecuencia, se dedujo que esta liberación implicaba un proceso secretorio excitotósico dependiente de potencial [47]. Estos resultados estaban de acuerdo con otro estudio de Peral y col. [49] en el que confirmaban la presencia de CRTR en la membrana sinaptosomal donde se facilitaría la recaptación de Cr.

1.3 Creatina y creatina quinasa

La Cr existe en la célula como Cr libre y en su forma fosforilada, CrP, la cual proviene de la conversión de Cr por mediación de la enzima CK. Diferentes isoformas han sido descritas de CK, cada una de ellas desarrollando una función específica. Las isoformas mitocondriales (MtCK) usan ATP para convertir Cr en CrP mientras que las isoformas citosólicas (cCK) usan CrP para convertir ADP en ATP en los lugares de mayor demanda energética, y para convertir el exceso de ATP en CrP para el almacenaje de energía [50-51]. Concretamente, las MtCK se ensamblan en dímeros y pueden asociarse reversiblemente a octámeros. La forma octamérica puede interactuar directamente tanto con la membrana interna mitocondrial, a través de la cardiolipina y el translocador de nucleótidos de adenina (ANT-1) que facilita el intercambio de ATP mitocondrial por el

ADP citosólico, como con la membrana exterior mitocondrial a través del canal aniónico voltaje-dependiente (VDAC). La mtCK cataliza la conversión de ATP en ADP transfiriendo un grupo fosfato a Cr y formando una molécula de CrP. La MtCK participa, junto con el ANT-1, VDAC, ciclofilina D y la proteína de la matriz mitocondrial, en el complejo de poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (MPT) [52-53] (Fig. 6).



MPT está implicado en el proceso preliminar del proceso de apoptosis celular, su formación y apertura implica la liberación de proteínas pro-apoptóticas al citosol iniciándose así el proceso de muerte celular. Existen diferentes factores que pueden contribuir a la inducción de la apertura de MPT: una acumulación de Ca^{2+} , una reducción del potencial de membrana ($\Delta\Psi$), un incremento de fosfato orgánico, una reducción de ATP y ADP y un incremento del estrés oxidativo. La mtCK es susceptible al estrés oxidativo, por lo que bajo una situación oxidativa, la forma octamérica de mtCK se convierte en la forma dimérica. Este proceso afecta negativamente a la homeostasis del calcio que estimula la apertura de MPT y produce una afectación de la respiración mitocondrial. Por ello, la activación de mtCK (forma octamérica) conduce a la inhibición del proceso implicado en la apoptosis. La Cr es un extraordinario estimulador de la mtCK que convierte Cr en CrP y ADP. El ADP puede cruzar a la

matriz mitocondrial a través de ANT, estimulando la fosforilación oxidativa, restaurando el potencial de membrana y reduciendo la cantidad de especies reactivas de oxígeno. Como consecuencia, la Cr tiene un efecto indirecto anti-oxidante y anti-apoptótico [54-55].

1.4 Funciones de la creatina

La Cr juega un papel importante en el metabolismo energético de la célula mediante el sistema Cr/CK/CrP [50-51]. En los últimos años numerosos estudios han demostrado la diversidad de funciones que posee la Cr. La suplementación con Cr en modelos animales y humanos induce la señalización celular, así como, la expresión de genes y de varios factores de transcripción biogénicos en músculo esquelético y reduce la aparición de marcadores de inflamación durante el ejercicio físico [55]. Estos hechos han promovido el desarrollo de ensayos clínicos en pacientes con enfermedades musculares habiéndose demostrado mejorías en la fuerza muscular en pacientes con distrofias musculares [56] y fibromialgia [57], y en el rendimiento funcional en la miopatía inflamatoria idiopática [56].

Como se ha mencionado en el apartado anterior, la Cr tiene también un efecto antioxidante y anti-apoptótico [54-55]. En base a esta evidencia, se han llevado a cabo varios estudios en modelos celulares y animales de enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y enfermedad de Huntington). La suplementación con Cr en estas enfermedades ha mostrado efectos beneficiosos como neuroprotector [54, 58]. Por otro lado, también se ha observado un efecto neuroprotector en condiciones de toxicidad amoniacal [54] y también se le atribuye un papel como neurotransmisor [46-47, 49, 54]. Otra función importante de la Cr es su papel preventivo o de retraso en la aparición de la diabetes tipo 2, obesidad, síndrome metabólico, osteopenia y/o osteoporosis en mujeres postmenopáusicas, y sus efectos positivos en la memoria, aprendizaje y rendimiento cognitivo y mental [55].

1.5 Enfermedades metabólicas hereditarias en el metabolismo de la creatina

Se han identificado tres enfermedades metabólicas hereditarias en el metabolismo de la Cr, todas ellas bajo el nombre común de síndromes de deficiencia de Cr cerebral (CCDS). Dos de estos defectos están relacionados con alteraciones en la biosíntesis de Cr (deficiencia de GAMT y AGAT) y la tercera con la deficiencia del transportador de Cr o CRTR.

1.5.1 Deficiencia de guanidinoacetato metiltransferasa (GAMT)

En 1994 se describió el primer defecto en la biosíntesis de Cr en un paciente que presentaba un retraso psicomotor y trastornos piramidales [59]. Posteriormente en 1996 se confirmó que el defecto era debido a una deficiencia de GAMT (MIM#612736) [60]. Hasta la fecha se han descrito alrededor de 110 pacientes [61, 62]. La deficiencia de GAMT es una enfermedad autosómica recesiva. El gen responsable (*GAMT*, MIM#601240) se localiza en el cromosoma 19p13.3 y ocupa 4.5kb [63-65]. Este gen contiene 6 exones y codifica para una proteína de 237 aminoácidos. GAMT se expresa mayoritariamente en músculo esquelético, hígado, corazón y riñón [3] y también se ha demostrado su expresión en varias regiones de cerebro, aunque en bajas cantidades [54]. Hasta el momento se han descrito más de 40 mutaciones responsables de la enfermedad, siendo las más frecuentes las mutaciones de cambio de sentido [62].

Los pacientes con deficiencia de GAMT presentan un desarrollo neurológico normal en los primeros meses de vida, posiblemente debido al aporte de Cr materna durante el embarazo. Sin embargo, al cabo de unas semanas del nacimiento la Cr disminuye debido a la baja capacidad de síntesis [59] dando lugar a las primeras manifestaciones clínicas entre los 6-12 meses de vida, las cuales se caracterizan por un retraso en el desarrollo psicomotor y convulsiones [66-67]. Independientemente de la edad y del grado de incapacidad intelectual, la mayoría de los pacientes presentan un retraso en el lenguaje [68-69]. El segundo síntoma más frecuente es la epilepsia que suele aparecer entre los 10 meses y los 3 años de edad [66-68]. En muchos casos, las convulsiones son refractarias al tratamiento con anticonvulsivantes, pero responden al tratamiento con Cr [68]. Por otro lado, algunos pacientes también presentan trastornos del movimiento incluyendo corea, atetosis y ataxia [68] los cuales suelen aparecer antes de los 12 años aunque se ha descrito algún caso en edades superiores [69-71]. También se han

observado trastornos en el comportamiento, como hiperactividad, comportamiento autista o conducta autoagresiva. Hipotonía y debilidad muscular son también síntomas frecuentes [59-60, 68].

La afectación neurológica presente en estos pacientes podría explicarse por la acumulación de GAA, ya que éste tiene un efecto neurotóxico [72] y epileptogénico [73-74]. Los mecanismos de acción propuestos responsables de dichos efectos serían: el efecto GABA-mimético [75-76] y antagonista de los receptores GABA [73] y la generación de especies reactivas de oxígeno [72].

Teniendo en cuenta el grado de incapacidad intelectual, las convulsiones epilépticas y los trastornos del movimiento, se desarrolló una puntuación para clasificar a los pacientes según el fenotipo clínico [68, 78], aunque no existe una correlación clara entre la severidad del fenotipo clínico, la acumulación de GAA en fluidos biológicos y las mutaciones en *GAMT* [68].

1.5.2 Deficiencia de L-arginina: glicina amidinotransferasa (AGAT)

La segunda enfermedad involucrada en la biosíntesis de Cr es la deficiencia de AGAT (MIM#612718) descrita en el año 2000 [79-80] con 14 pacientes identificados hasta la actualidad [61]. La deficiencia de AGAT es una enfermedad autosómica recesiva cuyo gen responsable (*GATM*, MIM#602360) se encuentra en el cromosoma 15q15.3 ocupando 17kb y compuesto por 9 exones [80]. Los niveles más altos de expresión de AGAT se encuentran en hígado, riñón y páncreas [81] y en más bajas proporciones en cerebro [54]. La deficiencia de AGAT es la más leve de los tres defectos de Cr. Se caracteriza por debilidad muscular, hipotonía y trastornos de comportamiento. Otros síntomas tales como convulsiones, retraso del crecimiento o trastornos del movimiento son mucho menos frecuentes [61, 66].

1.5.3 Deficiencia del transportador de creatina (CRTR)

El tercer defecto es la deficiencia del transportador de Cr (CRTR, CT1, MIM#300352) que fue descrito por primera vez en el año 2001 [82]. Hasta la fecha han sido descritos alrededor de 160 pacientes [61, 83] con más de 110 mutaciones en el gen *SLC6A8*, siendo las mutaciones de cambio de sentido las más frecuentes [84]. Diversos estudios muestran que no existe una correlación clara entre el genotipo y fenotipo. Hay evidencia

de 4 mutaciones missense: c.1190C>T (p.Pro397Leu); c.1271G>A (p.Gly424Asp); c.1631C>T (p.Pro544Leu) y c.1699T>C (p.Ser567Pro) que están asociadas con un cierto transporte residual de CRTR y dan lugar a un fenotipo variable, desde discapacidad intelectual leve a epilepsia severa [83, 85-87]. Las deleciones de varios exones abarcando la zona 3' del gen *SLC6A8* están asociadas con un fenotipo más severo [83, 88-89]. Estudios recientes demuestran que estas deleciones también engloban un gen colindante al *SLC6A8*, *BCAP31*, cuyo defecto da lugar a un profundo retraso en el desarrollo con distonia y sordera [90]. Sin embargo, van de Kamp y col. [91] también describieron un fenotipo similar pero en este caso sólo estaba presente una deleción aislada de la zona 3' del gen *SLC6A8*, por lo que estos autores sugieren que habría un elemento regulatorio entre *SLC6A8* y *BCAP31*.

Las manifestaciones clínicas más comunes en la deficiencia de CRTR son el retraso en el lenguaje (100%), trastornos del comportamiento (85%) y convulsiones (59%). La discapacidad intelectual se accentúa con la edad siendo los pacientes en edad adulta los que presentan síntomas más severos [83]. Los trastornos del lenguaje se caracterizan por disartria, dispraxia oral, problemas en el lenguaje semántico-pragmático con repeticiones y ecolalia [92]. Los trastornos del comportamiento incluyen hiperactividad, déficit de atención y signos autistas. Las convulsiones son principalmente de tipo tónico-clónicas generalizadas, parciales simples o parciales complejas. Algunos pacientes tienen episodios de epilepsia siendo en algunos casos refractarios al tratamiento anticonvulsivante [61, 66]. En cuanto a los trastornos motores es frecuente encontrar una hipotonía central con reflejos tendinosos profundos o normales sobretodo en los primeros años de vida. En la edad juvenil los pacientes suelen presentar una marcha inestable de base ancha con los brazos elevados. También suele aparecer trastornos del movimiento extrapiramidal incluyendo movimientos anormales de manos, posturas distónicas intermitentes de manos y muñecas y movimientos coreatéticos [83]. Los problemas gastrointestinales son frecuentes en estos pacientes manifestando dificultad en la alimentación, vómitos y retraso en el desarrollo [83]. Otros síntomas menos frecuentes son los cardíacos. Sólo se han descrito 4 pacientes con manifestaciones tales como cardiomiopatía, contracciones ventriculares prematuras y QT largo [83, 86, 93]. El estrabismo también puede estar presente en algunos pacientes [83, 91].

Las mujeres heterocigotas pueden presentar leves problemas de aprendizaje, de comportamiento [94-96] o incluso moderada-severa discapacidad intelectual y convulsiones [97-99].

1.5.4 Defecto del transportador de creatina (MCT12)

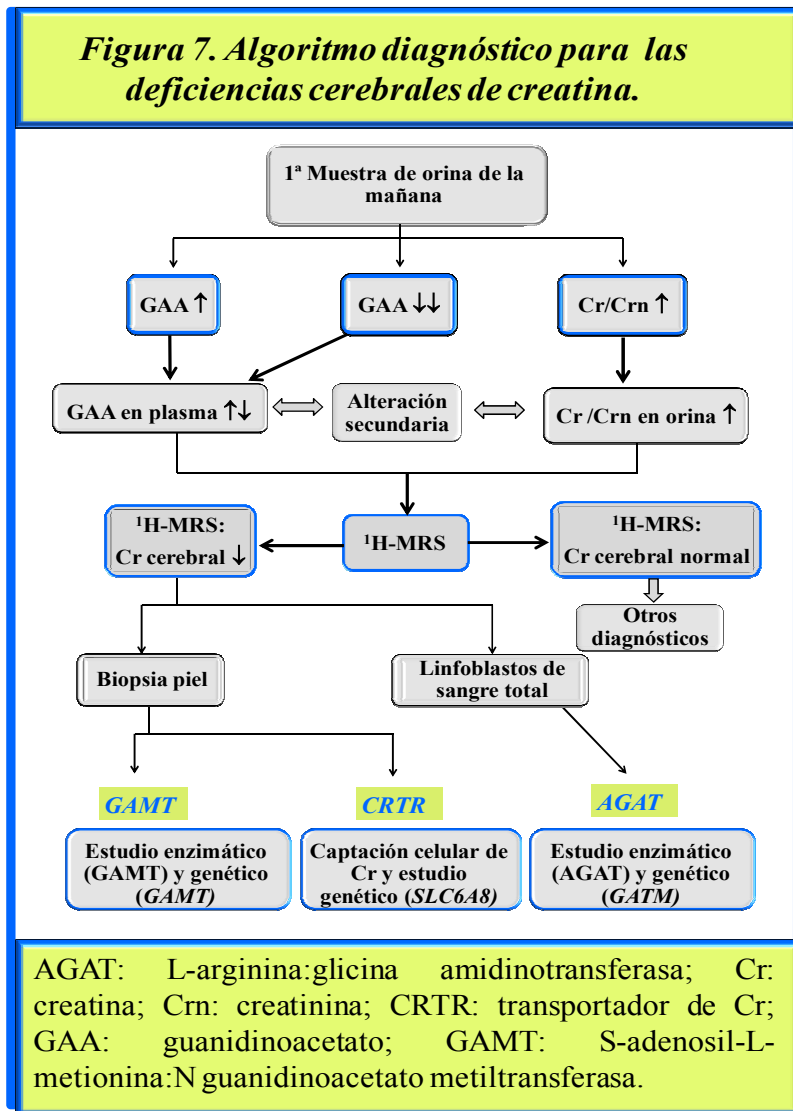
En el año 2007 Vandekerckhove y col. [100] describieron una familia de 17 miembros en la que 11 de ellos presentaban catarata juvenil progresiva. De estos 11 miembros, 8 tenían microcornea bilateral no asociada con microftalmos y en 6 de ellos estaba presente una glucosuria renal. Posteriormente, Kloeckener-Gruissem y col. [28] mostraron que en esta misma familia, 9 de 12 pacientes tenían un incremento de glucosa en orina en ausencia de anomalías renales o metabólicas y se demostró que todos ellos eran heterocigotos para una mutación que provocaba la aparición de un codón de terminación prematuro en el gen *SLC16A12*. Estos mismos autores describieron que la proteína implicada en este proceso contenía 536 aminoácidos y 12 dominios transmembrana, y demostraron que la expresión de *SLC16A12* tenía lugar mayoritariamente en ojo y riñón, sugiriendo su papel en la homeostasis del cristalino y del riñón dada la afectación de ambos órganos en estos pacientes. Como consecuencia, se describió un nuevo trastorno conocido como catarata juvenil, microcornea y glucosuria (CJMG, MIM#612018).

Previamente a estos hallazgos, ya en el año 2004 Halestrap y Meredith [27] describieron la existencia de la proteína MCT12 como un miembro de la familia de transportadores monocarboxilato, la cual estaba codificada por el gen *SLC16A12*. En un estudio reciente Abplanalp y col. [24] identificaron la Cr como el sustrato específico para MCT12 y se demostró que su transporte era de tipo bidireccional, facilitado y presentaba una K_m superior a la de CRTR. Además, estos autores identificaron una nueva mutación en heterocigosis en el gen *SLC16A12* que afectaba a una zona conservada de la proteína. Con el objetivo de conocer si esta mutación interfería en el transporte de Cr, generaron un constructo que contenía esta mutación y lo inyectaron en oocitos *Xenopus laevis*. Los resultados mostraron que estos oocitos tenían una captación notablemente disminuida de Cr. En este trabajo también se realizaron ensayos en ratas y se observó que en las ratas macho *knock-out* (KO) los niveles de Cr en orina eran significativamente más altos que en las ratas macho heterocigotas sugiriendo que una copia del gen ya era suficiente para el transporte de Cr. Sin embargo, las ratas KO *SLC16A12* no manifestaban el

fenotipo similar al de los pacientes con este defecto. Estos autores también realizaron estudios de expresión tisular del gen *SLC6A12* y *SLC6A8* en tejidos humanos y confirmaron que los niveles de mRNA del gen *SLC6A12* eran superiores en riñón, retina, pulmón y testículo humano, datos que ya fueron reportados previamente por Kloeckener-Gruissem y col. [28], mientras que el gen *SLC6A8* se expresaba de manera predominante en cerebro, corazón y tejido muscular, mostrando diferencias tejido-específicas en la expresión del gen. En base a estos hallazgos, Abplanalp y col. [24] identificaron la proteína MCT12 como un segundo transportador de Cr asociado al fenotipo de cataratas y glucosuria.

1.5.5 Diagnóstico de las deficiencias cerebrales de creatina

Los tres primeros defectos del metabolismo de Cr (AGAT, GAMT y CRTR) se caracterizan por un descenso o ausencia del pico de Cr cerebral en la resonancia magnética con espectroscopía (RMS), característica que puede ser utilizada como marcador para estas enfermedades. Tras la selección clínica de los pacientes, el siguiente paso en el proceso diagnóstico se basa en el análisis bioquímico de Cr y GAA en orina y plasma,



el cual es un método sencillo y ampliamente utilizado para el diagnóstico de estas enfermedades [101]. La deficiencia de GALT se caracteriza por una alta concentración de GAA y baja concentración de Cr en plasma y orina; la deficiencia de AGAT presenta una baja concentración de GAA y una concentración normal de Cr en plasma y orina; y la deficiencia de CRTR se caracteriza por una relación Cr/Crn alta en orina con valores normales de GAA en los líquidos biológicos [102].

Los resultados bioquímicos que se encuentren alterados serán confirmados por RMS y el diagnóstico definitivo se realizará mediante los estudios enzimáticos y/o moleculares [103-104]. Concretamente, en los defectos de síntesis de Cr (deficiencia de GALT y AGAT), el análisis enzimático se basa en la determinación por espectrometría de masas-masas de la actividad de dichas enzimas a través del marcaje de los sustratos con isótopos estables en fibroblastos o linfocitos. Con respecto a la deficiencia de CRTR, la confirmación del defecto se basa en la medida de la captación de Cr celular en fibroblastos por espectrometría de masas-masas (Fig. 7).

La orina es la primera muestra recomendada para iniciar el cribado de pacientes. Sin embargo, se ha de tener en cuenta que existen distintas fuentes alimentarias con alto contenido de Cr (especialmente pescado y carne) que podría influir en la relación Cr/Crn [105]. En un estudio previo llevado a cabo por nuestro grupo se estudiaron los niveles de Cr en voluntarios sanos tras la ingesta de diferentes alimentos [102]. Los resultados mostraron que después de una comida basada en ensalada, pasta o huevos la relación Cr/Crn era normal comparado con el rango de referencia de sujetos adultos sanos. Contrariamente, en algunos voluntarios la relación Cr/Crn estaba incrementada después de ingerir pescado graso o ternera. Dados estos resultados, es importante tener en cuenta las comidas ricas en Cr ya que podría resultar en un incremento significativo de la relación Cr/Crn y generar resultados falsos positivos. Por este motivo, en el caso de una relación Cr/Crn elevada, los resultados deberían ser confirmados con una segunda muestra de orina bajo una dieta controlada [102] (Fig. 7).

Respecto al defecto de la proteína MCT12 asociado a catarata y glucosuria, no hay evidencia de los niveles elevados de Cr en dichos pacientes [28, 100]. En el estudio llevado a cabo por Abplanalp y col. [24] se observó un incremento de la Cr en orina de ratas *SLC16A12 KO*. En base a estos hallazgos, sería necesario valorar los niveles de Cr en pacientes con CJMG para conocer si la Cr también pudiera considerarse como biomarcador de esta enfermedad.

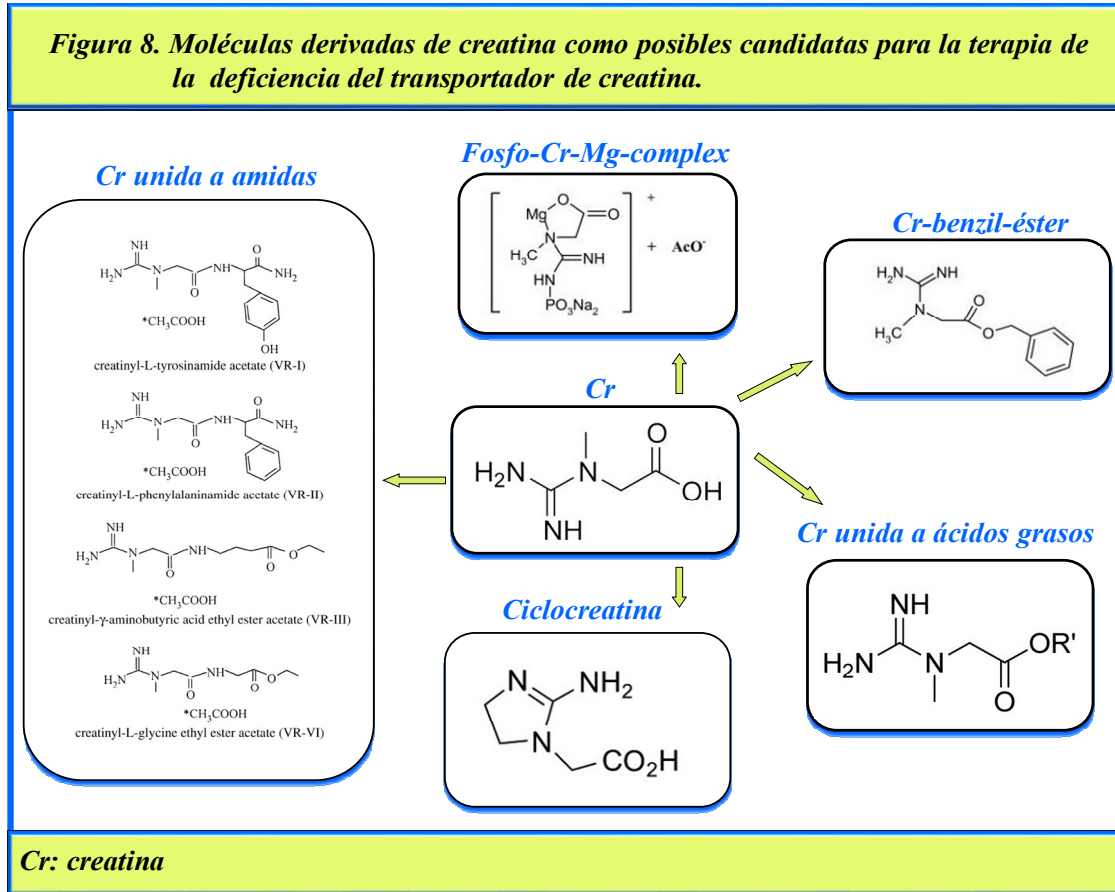
El estudio molecular se centra en el estudio del gen *GAMT* y *GATM* para la deficiencia de *GAMT* y *AGAT* respectivamente, y del gen *SLC6A8* para la deficiencia del transportador de CRTR (Fig.7).

1.5.6 Tratamiento de las deficiencias cerebrales de creatina

En las enfermedades de biosíntesis de Cr, deficiencia de *GAMT* y *AGAT*, la suplementación de Cr monohidrato en dosis orales de 350 mg/kg/día a 2 g/kg/día ha demostrado una normalización de los niveles cerebrales de Cr [65]. Sin embargo, en la deficiencia de *GAMT* la acumulación de GAA permanece, de manera que se le atribuye a este metabolito un papel decisivo en la afectación neurológica, por lo que todos los esfuerzos se dirigen hacia la disminución de GAA. Así, se ha propuesto la administración de una dieta baja en arginina (15 mg/kg/día) junto con la suplementación de ornitina (ornitina aspartato 350–800 mg/kg/día) reduciendo de esta manera los sustratos para la síntesis de GAA o bien inhibiendo competitivamente la actividad *AGAT* [69, 106-108]. Sin embargo, en algunos casos no se han demostrado claros efectos beneficiosos.

Respecto a la deficiencia de CRTR, el tratamiento con Cr monohidrato no muestra ninguna mejoría en la concentración de Cr cerebral, por ello, se pensó en administrar precursores de la biosíntesis de Cr que pudieran cruzar la BHE. En efecto, Leuzzi y col. [109] demostraron en ensayos *in vitro* que tras la suplementación de arginina y glicina se conseguía restablecer los niveles intracelulares de Cr en linfoblastos procedentes de pacientes con la deficiencia de CRTR. En base a estos resultados, algunos pacientes han sido tratados con esta terapia observando mejoría en los síntomas neurológicos y un incremento de Cr y CrP en algunos pacientes [110-111]. Además, el estudio de Mercimek Mahmutoglu y col. [97] también demostró una efectividad del tratamiento en una mujer con deficiencia de CRTR. Por el contrario, Fons y col. [112] y Valayannopoulos y col. [98] no observaron dichos beneficios. Por otro lado, previamente al comienzo de esta tesis se publicó un estudio con derivados de Cr: creatina-benzil-éster (CrOBzl) y complejo fosfocreatina-magnesio (PCr-Mg-CPLX) (Fig. 8) en el que se demostraba que tras su administración se incrementaba el contenido intracelular de Cr en zonas del cerebro de ratón penetrando en la célula por una vía independiente de CRTR [113].

Recientemente, otros derivados de Cr como su compuesto cíclico, la ciclocreatina [114], la Cr unida a ésteres de ácidos grasos [115] o a amidas [116] han demostrado tener una efectividad superior a la Cr monohidrato en cultivos celulares *in vitro* o modelos animales con defecto de CRTR (Fig. 8).



Por lo que respecta al defecto de MCT12, no existe información concerniente a terapias asociadas. En el estudio de Abplanalp y col. [24] se sugiere que la suplementación con Cr podría ser una herramienta preventiva para la mayoría de cataratas asociadas con la edad debido a las funciones beneficiosas de la Cr como antioxidante, anti-apoptótica y citoprotectora.

1.6 Papel del sistema CK/ATP como biomarcador en las deficiencias cerebrales de Cr

Como ya se ha comentado anteriormente, la Cr juega un papel importante en el sistema energético Cr/CK/CrP. Esta evidencia se puso de manifiesto en un trabajo llevado a cabo por Mercimek-Mahmutoglu y col. [117] en el que se observó una disminución de los niveles de la enzima CK en el plasma de un paciente con deficiencia de CRTR y de

un paciente con deficiencia de GAMT, ambos con alteraciones en los niveles de Cr. En base a estos hechos, estos autores sugerían que CK podría ser un marcador plasmático de las deficiencias cerebrales de Cr.

1.7 Papel de la Cr como biomarcador de las enfermedades mitocondriales

En los últimos años se han publicado algunos trabajos en los que se ha evaluado el papel de la Cr en las enfermedades mitocondriales. Shaham y col. [118] estudiaron el perfil metabolómico de cultivos de células musculares en las que habían inducido previamente una deficiencia de la cadena respiratoria mitocondrial e identificaron 32 metabolitos alterados entre los cuales se encontraba la Cr. Dados estos resultados, estos autores prosiguieron con un segundo análisis usando plasma de 16 pacientes con diferentes deficiencias de la cadena respiratoria mitocondrial incluyendo síndrome de MELAS (mt A3243G), MERFF (mt A8344G), deleciones del DNA mitocondrial (mtDNA) y depleciones de mtDNA. Los resultados mostraron 26 metabolitos alterados en plasma, que también fueron detectados en el primer ensayo *in vitro* pero sólo 3 de ellos se encontraban elevados de manera significativa: lactato, uridina y Cr. El incremento de Cr fue confirmado en una segunda cohorte de 14 pacientes en los que este incremento persistió. El análisis individual de cada uno de los pacientes mostró un incremento de Cr plasmática en el 50% de los casos [118]. Más tarde, Boenzi y col. [119] constataron esta evidencia en un estudio con 30 pacientes afectados con diferentes enfermedades mitocondriales, en los que la concentración de Cr estaba elevada.

Los datos obtenidos de estos estudios ponen de manifiesto la conexión que existe entre Cr y la mitocondria lo cual sugiere que la Cr podría ser un biomarcador en las enfermedades mitocondriales.

2. ENFERMEDAD DE NIEMANN-PICK TIPO C

2.1 Antecedentes históricos

La enfermedad de Niemann-Pick fue descrita en 1914 por Albert Niemann [120] en unos niños de origen judío, más tarde en 1933 Ludwig Pick [121] caracterizó su patología diferenciándola de otros trastornos de depósito lisosomal como la enfermedad de Gaucher. Los pacientes mostraban una acumulación celular de esfingomielina, organomegalia y una diversidad de síntomas neurológicos. Dada esta variabilidad, en 1961 Crocker [122] hizo una clasificación en cuatro subgrupos (tipos A, B, C, D). Posteriormente en 1966, Brady y col. [123] detectaron una actividad esfingomielinasa deficiente en los pacientes Niemann-Pick tipo A (NPA) y B (NPB) pero no en los de tipo C (NPC) y D (NPD). En 1982 se creó un consenso para separar las formas deficientes de esfingomielinasa (NPA y NPB) de las otras formas (NPC y NPD). Pentchev y col. en 1984 [124] observaron que en el tipo NPC existía un defecto en el tráfico intracelular de colesterol, lo que llevó a una reclasificación de la enfermedad. La enfermedad de NPD es una variante alélica de la enfermedad NPC hallada únicamente en los pacientes de Nueva Escocia.

En la enfermedad de NPC (MIM#257220), se produce una acumulación del colesterol no esterificado y de diversos glucoesfingolípidos (glucosilceramida, lactosilceramida, globotriasilceramida, globotetraasilceramida y gangliósido GM3) en el interior de los endosomas tardíos (ET) y lisosomas (Ls). Todo ello se debe al trastorno del tráfico lipídico intracelular. En hígado y bazo se acumula mayoritariamente glucosilceramida [125] pero niveles elevados de esfingosina y esfinganina sólo se encuentran en hígado [126]. Como resultado del acúmulo de estos lípidos se produce una serie de síntomas viscerales como organomegalia y disfunción hepática.

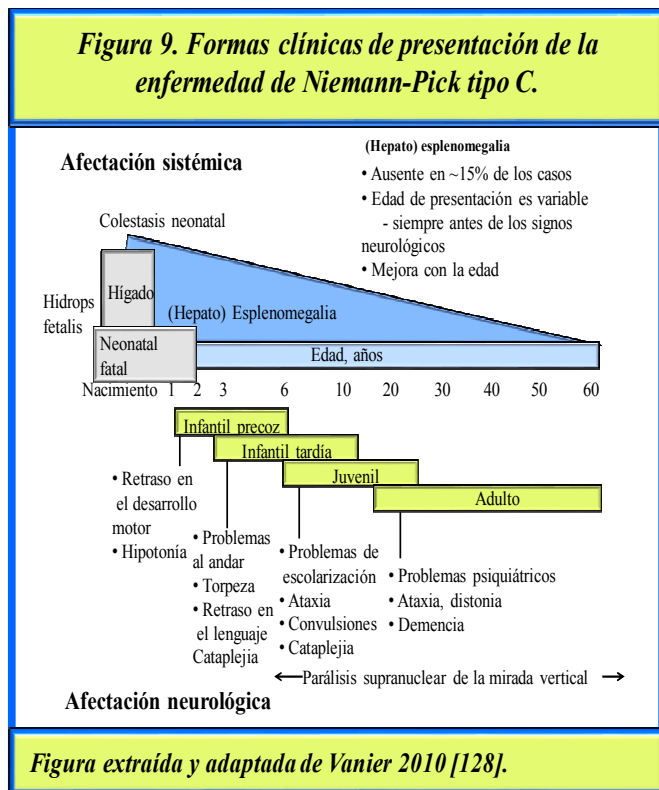
A nivel cerebral se ha observado una acumulación de colesterol libre, gangliósidos GM2 y GM3, glucosilceramida, lactosilceramida y gangliotriasilceramida en el interior de los ET/Ls. También se ha descrito que existe un leve incremento de globotriasil, globotetraasilceramida y de glicolípidos neutros más complejos. Las anomalías lipídicas se dan predominantemente en la sustancia gris [127], desencadenando en conjunto, una afectación neurológica característica en estos pacientes.

La enfermedad de NPC es una enfermedad autosómica recesiva que puede estar causada por mutaciones en dos genes distintos. El 95% de los pacientes presenta mutaciones en el gen *NPC1* y el 5% presenta mutaciones en el gen *NPC2* [128].

2.2. Características clínicas

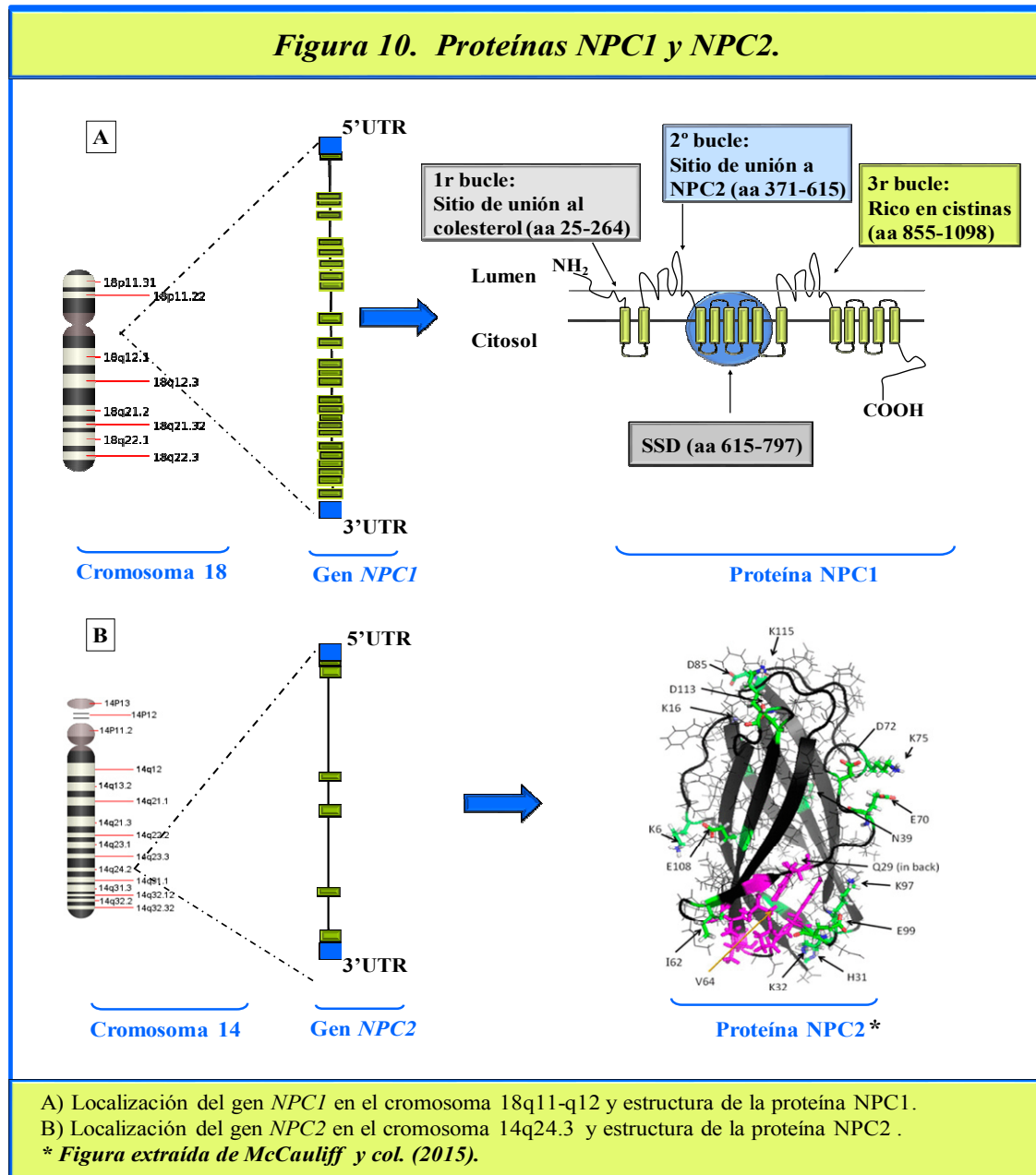
La presentación clínica de NPC es muy heterogénea y la aparición de síntomas puede surgir a distintas edades y tener distintas evoluciones [128-129]. La presentación más frecuente es la ictericia neonatal transitoria. Posteriormente aparece una hepatoesplenomegalia, presente en el 85% de los pacientes. Las anomalías oculares también son una de las primeras manifestaciones clínicas y están presentes en la mayoría de los pacientes. Las manifestaciones neurológicas incluyen una torpeza motora, temblor, mal rendimiento escolar con pérdida de las capacidades cognitivas y de concentración. Esta torpeza progresa lentamente hacia una ataxia cerebelar, oftalmoplejia, disartria, disfagia y una demencia progresiva. Otros síntomas frecuentes son la distonía, cataplejía y crisis epilépticas. En general, los pacientes manifiestan progresivamente trastornos de conducta, demencia, psicosis y de afectación motora. La edad de inicio de los síntomas sistémicos no está correlacionada con la edad de

aparición de las manifestaciones neurológicas, las cuales pueden aparecer años después. Teniendo en cuenta la edad de aparición de los síntomas, se distinguen distintas formas de presentación clínica: forma neonatal (<1mes), forma infantil precoz (2 meses-2 años), forma infantil tardía (2-6 años), forma juvenil (6-15 años) y forma adulta (>16 años) [128] (Fig. 9.)



2.3 Bases fisiopatológicas

2.3.1 Proteína NPC1



La proteína NPC1 está codificada por el gen *NPC1* (MIM#607623), localizado en el cromosoma 18q11-q12 y ocupa 56kb conteniendo 25 exones [130] (Fig. 10.A). NPC1 es una glicoproteína de gran tamaño, 1277 aminoácidos y 13 dominios transmembrana con localización en la membrana del ET [131]. NPC1 presenta una estructura compleja que incluye 3 grandes bucles proyectados hacia el lumen del ET/L, cuatro pequeños bucles luminales, seis bucles citoplasmáticos y una cola C-terminal citoplasmática (Fig. 10.A).

En el primer bucle (aminoácidos 25-264) se encuentra el extremo N-terminal, que posee un sitio de unión al colesterol [132]. Este dominio altamente conservado está compuesto por 18 residuos de cisteína (involucrados en los puentes disulfuro) y un motivo cremallera de leucina. El segundo bucle situado entre la segunda y tercera hélice parece que podría interactuar con la proteína NPC2 [133]. El tercer bucle (aminoácidos 855-1098) se localiza entre el dominio 8 y 9, está altamente conservado en residuos cisteína conteniendo un motivo de dedos de anillo, pero aún no se conoce el papel de este dominio (Fig. 10.A).

Se ha descrito que la cola C-terminal de la proteína NPC1 interactuaría con el adaptador de clatrina AP-1 a través de un motivo de dileucina y parece ser que esta interacción sería esencial para la focalización y función del ET/L [134].

En los 13 dominios transmembrana, entre el tercer y séptimo dominio, se encuentra el dominio sensible a esteroides (SSD) (Fig. 10.A), es decir, un dominio sensible a los cambios homeostáticos del colesterol, y comparte homología con otras proteínas relacionadas con el metabolismo del colesterol tales como la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa), la proteína reguladora de esteroides (SCAP) y la proteína responsable de la absorción del colesterol de la dieta y del colesterol biliar (*NPC1-like 1*).

2.3.2 Proteína NPC2

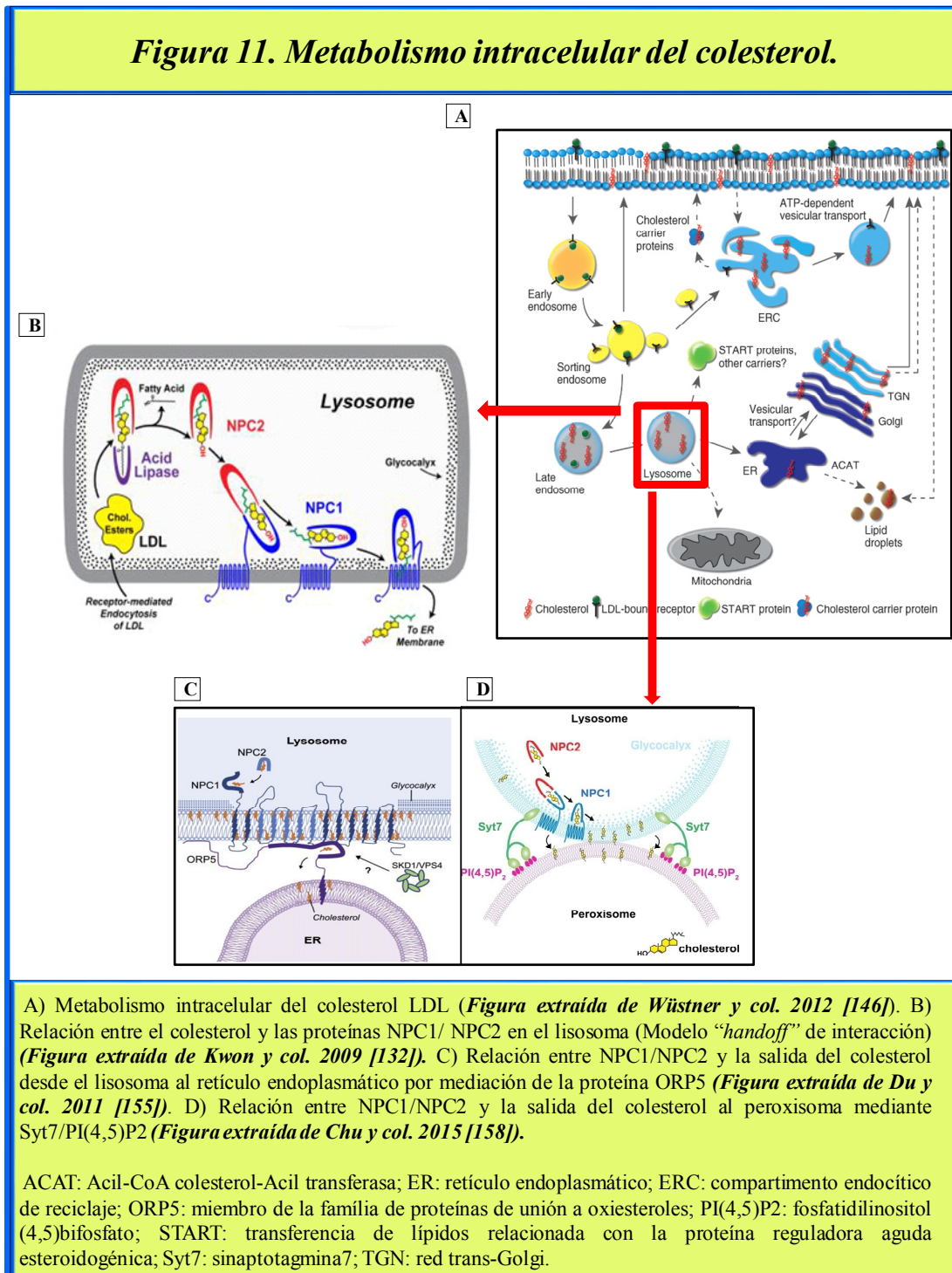
La proteína NPC2 es una glicoproteína de pequeño tamaño (151 aminoácidos), es soluble y se encuentra en el interior de los ET/Ls. La proteína NPC2 está codificada por el gen *NPC2* (MIM#601015) localizado en el cromosoma 14q24.3, contiene 5 exones y ocupa 13.5kb [135] (Fig. 10.B). En un estudio computacional y de mutagénesis dirigida llevado a cabo por Ko y col. [136] se demostró que 3 mutantes (F66A, V96F, Y100A) localizados en la superficie de la proteína NPC2 interferían con la unión al colesterol. El trazado de estos tres mutantes en la estructura cristalina de NPC2 mostró que estos aminoácidos se encontraban próximos entre sí en una zona hidrofóbica, de modo que se sugirió que NPC2 se uniría al colesterol en esta región [136-137]. Por otro lado, también se ha identificado un dominio de transferencia del colesterol de la proteína NPC2 a la proteína NPC1 [138]. El mecanismo por el cual se produce esta transferencia es poco conocido. Diversos estudios han demostrado que NPC2 cataliza la transferencia de colesterol entre membranas a través de interacciones

proteína-membrana [139-142]. Recientemente McCauliff y col. [143] han descrito una serie de mutaciones puntuales en NPC2 que también darían lugar a una transferencia deficiente del colesterol. La localización de estos aminoácidos sugiere que formarían dos dominios separados en la superficie de NPC2, de manera que NPC2 tendría capacidad de promover interacciones membrana-membrana. Como consecuencia, se establecería un contacto “puente” entre la membrana interna y la membrana limitante del ET/Ls que sería necesario para que NPC2 pudiera ejercer sus propiedades de transporte [143]. Además, también se ha observado que el grado de transporte de esteroides por parte de NPC2 mejora considerablemente en presencia de bis(monoacilglicerol)fosfato (BMP) [139-140], que se encuentra en un elevado porcentaje en la membrana interna del ET/Ls [144]. Estas observaciones apuntan a que existiría un mecanismo cooperativo entre NPC2 y BMP en el tráfico del colesterol dentro del compartimento del ET/Ls [139-140, 143].

2.3.3 Relación entre las proteínas NPC1 y NPC2 y el metabolismo intracelular del colesterol

El colesterol es una molécula de gran importancia para las células de los mamíferos ya que resulta necesario para multitud de procesos fisiológicos como la biosíntesis de hormonas esteroideas, sales biliares o vitamina D y para el mantenimiento de la estabilidad de las membranas biológicas. Los niveles más altos de colesterol en la célula se encuentran en la membrana plasmática constituyendo alrededor del 80-90% del colesterol celular total mientras que en el retículo endoplasmático (RE) los niveles son alrededor del 1% [145]. El colesterol exógeno que llega a la célula se encuentra mayoritariamente en forma de ésteres de colesterol y es transportado en sangre por mediación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). La célula reconoce el colesterol a través de los receptores LDL e incorpora las LDL en su interior por mediación de vesículas endocíticas. Estas vesículas se transforman en ET y posteriormente en Ls donde las LDL son degradadas por mediación de lipasas ácidas (LAL) dando lugar al colesterol libre y a los ácidos grasos [146] (Fig.11.A). En el interior de los ET/Ls se encuentran las proteínas NPC1 y NPC2 involucradas en el metabolismo del colesterol libre. Se ha descrito un modelo “*handoff*” que explicaría el mecanismo de interacción entre el colesterol y las proteínas NPC1 y NPC2. Según este modelo, el colesterol se uniría a través de su cadena isoocil al centro hidrofóbico de la proteína NPC2 dejando

libre el extremo 3 β -hidroxil. Este grupo 3 β -hidroxil quedaría orientado hacia el extremo N-terminal de la proteína NPC1 favoreciendo su unión. De esta manera, la parte hidrofóbica del colesterol quedaría orientada hacia la membrana plasmática permitiendo su salida del Ls al citosol [132-133] (Fig. 11.B). Una vez liberado el colesterol del Ls, éste puede seguir diferentes rutas: puede dirigirse hacia el RE junto con el colesterol sintetizado *de novo* a través de la HMG-CoA reductasa; puede dirigirse hacia el aparato de Golgi, hacia las mitocondrias, el peroxisoma a través de los receptores extracelulares



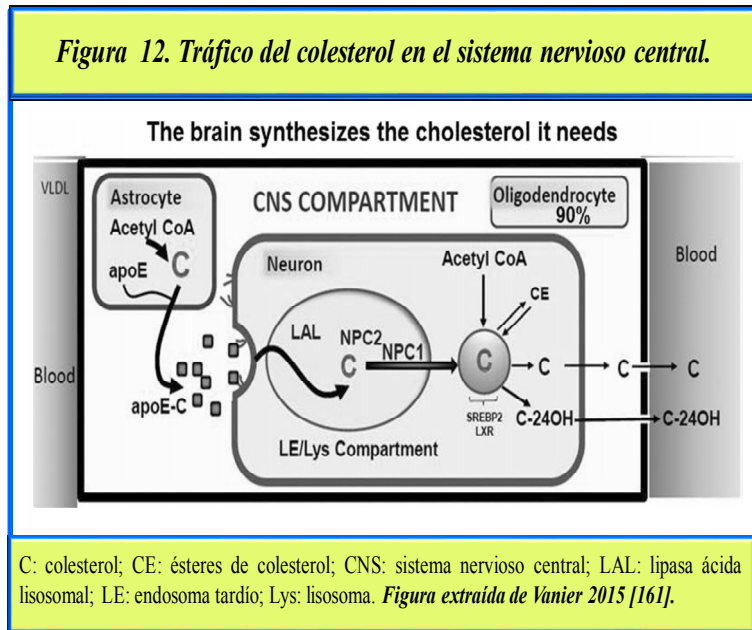
ABC-ATP binding cassette o bien almacenarse en el interior de la célula en forma de gotas lipídicas o en la propia membrana plasmática [147-148] (Fig. 11.A).

En los últimos años han surgido nuevos hallazgos referentes al mecanismo de transporte del colesterol desde el Ls a otros orgánulos. Distintos estudios han descrito un transporte por mediación del complejo SNARE desde el Ls al complejo trans-Golgi como mecanismo vesicular de transporte del colesterol [149-151]. Las proteínas Rab8 y Rab9 (miembros de la familia de la superfamilia Ras de proteínas G) también juegan un papel importante en el tráfico vesicular. La sobreexpresión de estas proteínas en fibroblastos deficientes NPC1 producen una reducción significativa de los niveles de colesterol libre [152-153]. Por otro lado, en un ratón *KO* de NPC cruzado con un ratón transgénico Rab9 se observó una reducción del acúmulo de lípidos y un aumento de la supervivencia [154].

Se ha descrito también un mecanismo no-vesicular, en el que la proteína ORP5 (miembro de la familia de las proteínas relacionadas con la unión a oxisteroles- OSBP) ubicada en el RE, en respuesta a un incremento de colesterol en la membrana limitante del Ls, formaría un complejo transitorio con la proteína NPC1 en los sitios de contacto entre membranas conectando el ET/Ls y RE. De este modo, cooperaría con la proteína NPC1 para mediar la salida de colesterol desde el ET/Ls al RE [155] (Fig. 11.C).

Otro estudio reciente también describe la conexión existente entre el Ls y peroxisoma en el transporte del colesterol. Como se ha dicho previamente, en el interior del Ls el colesterol quedaría unido a la proteína NPC1 en su dominio N-terminal, de manera que penetraría en el glicocáliz facilitando así su inserción en la membrana lisosomal. El Ls y peroxisoma formarían contactos de membrana próximos (LPMC, contactos de membrana del lisosoma-peroxisoma) a través de la interacción de la proteína lisosomal sinaptotagmina 7 (Syt7) (proteína implicada en la exocitosis lisosomal, reparación de lesiones y resellado de membranas) [156] y el fosfolípido peroxisomal, fosfatidilinositol (4,5)bifosfato [PI(4,5)P2] [157]. Como consecuencia se formaría un contacto transitorio que permitiría mover el colesterol desde el Ls hacia el peroxisoma [158] (Fig. 11.D).

En cerebro, el colesterol es sintetizado endógenamente, principalmente en los oligodendrocitos, y en menor proporción, en los astrocitos y neuronas. Por ello, las neuronas captan parcialmente el colesterol de las células gliales por endocitosis de la lipoproteína apo-E [159]. El tráfico intracelular de este



colesterol parece que no necesitaría la enzima LAL pero sí requiere el funcionamiento de las proteínas NPC1 y NPC2 [160-161] (Fig. 12).

2.3.4 Lípidos de membrana y esfingomielina

Como ya se ha descrito anteriormente, BMP y también la esfingomielina jugarían un papel importante en la transferencia de colesterol mediada por NPC2. En experimentos *in vitro* se ha observado un incremento de la transferencia del colesterol mediada por la proteína NPC2 en presencia de BMP y una reducción tras añadir anticuerpos anti-BMP dando lugar a un fenotipo *NPC1-like* [140, 162-163]. Un hallazgo interesante encontrado en modelos celulares de la enfermedad de NPC es la elevación de la concentración de BMP, lo que sugiere que podría ser un efecto compensatorio para incrementar la eliminación del colesterol acumulado [164].

En fibroblastos de pacientes NPC se ha demostrado que existe una disminución parcial de la actividad esfingomielinasa y parece ser que habría una correlación con la severidad del acúmulo del colesterol. Las formas “clásicas” de la enfermedad presentan actividades deficientes de esfingomielinasa mientras que las formas “variantes” tienen actividades normales o levemente disminuidas [165]. Estudios en células con deficiencia de la proteína NPC1, en las que se transfectaba el gen de la esfingomielinasa, demostraron que se producía una reducción de los niveles celulares de colesterol libre y se corregía el exceso de BMP [166]. Estos hechos se deberían a que, por un lado, la esfingomielinasa degrada la esfingomielina, que es un inhibidor de la

transferencia de colesterol mediada por NPC2, y por otro lado, la esfingomielinasa produce ceramida, que acelera este proceso. Por ello, se sugiere que la esfingomielinasa estimularía la salida de colesterol mediada por NPC2 [167-168].

2.3.5 Glicosfingolípidos

En la enfermedad de NPC se ha descrito una acumulación importante de glicosfingolípidos, como ocurre en otras enfermedades lisosomales. Se han sugerido distintos mecanismos que podrían explicar la causa de este proceso: una degradación reducida de glicosfingolípidos, una salida comprometida desde el ET/L, o anomalías en el tráfico/fusión de vesículas y autofagia [169]. Estudios previos en fibroblastos de pacientes NPC demostraban que los altos niveles de colesterol en el ET/L podrían afectar a la ruta normal endocítica de los glicosfingolípidos [170]. También se ha demostrado que el colesterol modula la interacción de la glucosilceramidasa con sus proteínas y activadores lipídicos, como SapC y BMP, regulando la actividad y estabilidad de la glucosilceramida [171]. Existen diversos trabajos en modelos mutantes murinos de la enfermedad de NPC en los que se ha estudiado la relación entre el metabolismo del colesterol y de los glicosfingolípidos. En ratones doble mutantes para NPC1 y β -1,4-N-acetilgalactosaminiltransferasa (β -1,4-GalNAc transferasa, enzima necesaria para la síntesis de gangliósidos complejos) se observó que, a diferencia del mutante simple NPC1, no se producía acúmulo de los gangliósidos GM2 o de glicolípidos GA1 y GA2 en el sistema nervioso central, a la vez que disminuía la acumulación de colesterol en neuronas [172-173] y se reducían los niveles de lípidos en diferentes tejidos. Sin embargo, la afectación visceral era similar a la del mutante simple NPC1 y la severidad del fenotipo clínico no mejoraba a pesar de la ausencia de gangliósidos a nivel del sistema nervioso central. Estos hallazgos indicarían que el acúmulo de gangliósidos, aunque es en gran parte responsable de la patología neuronal, no influye significativamente en el fenotipo clínico del modelo NPC [172]. Otro estudio de doble mutantes para NPC1 y β -1,4-GalNAc transferasa también demostró que en las neuronas en las que se acumulaba colesterol existía un acúmulo de GM3 pero no a la inversa, sugiriendo que el secuestro del colesterol en neuronas deficientes de NPC1 es dependiente de gangliósido y que la función de NPC1 estaría relacionada con el control homeostático de los gangliósidos, más que del colesterol [174]. De modo similar, en un estudio posterior llevado a cabo por Zhou y col. [175] se

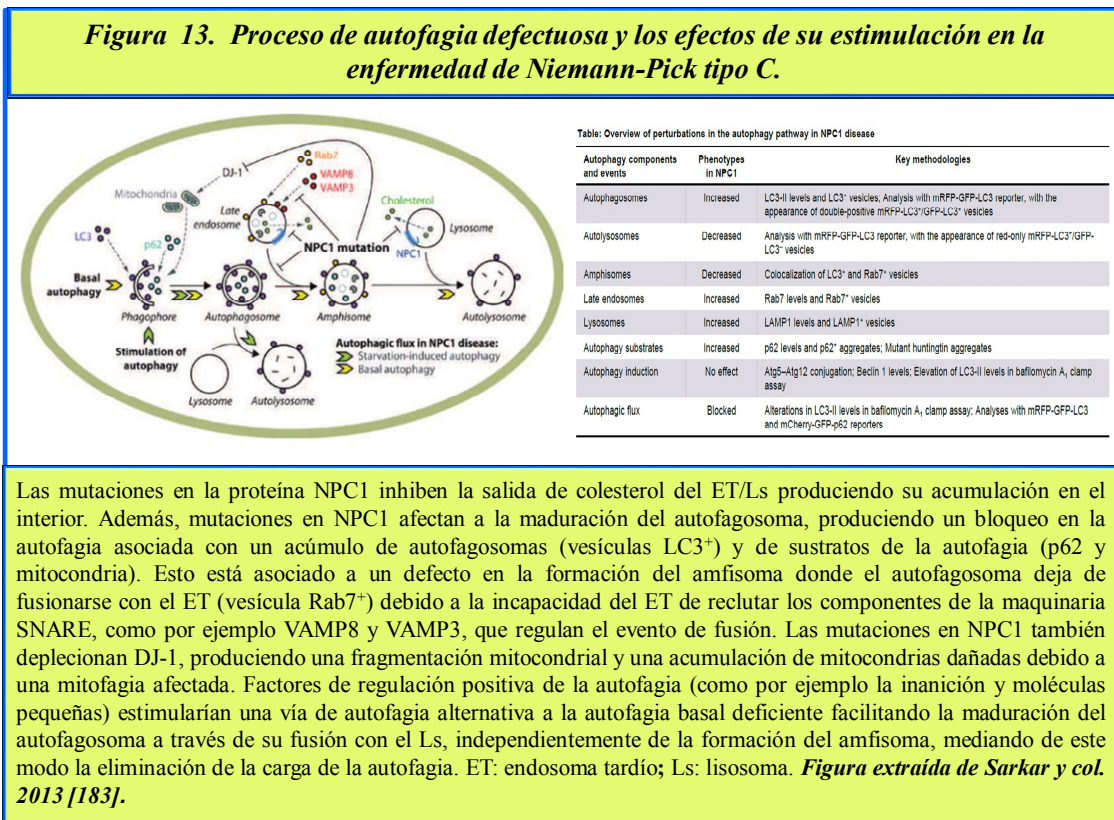
observó una disminución de colesterol acumulado en neuronas de ratones doble mutantes para NPC2/ β -1,4-GalNAc transferasa, lo que sugiere que existiría un mecanismo entre el almacenaje de colesterol y la síntesis de gangliósidos complejos en neuronas. Además, en este estudio se analizaron diferentes modelos doble mutantes, generados a partir de ratones *KO* para NPC1 y NPC2 cruzados con ratones *KO* para enzimas específicos de la síntesis de gangliósidos, y encontraron que el secuestro de colesterol era dependiente de la serie α -gangliósido en la mayoría de neuronas del sistema nervioso central. Además, estos autores también observaron que los gangliósidos GM2 y GM3 y el colesterol no eran secuestrados en el mismo tipo de vesícula de almacenamiento, lo que indica que existiría una heterogeneidad en el proceso endosómico, tal y como se había sugerido previamente [176]. Para conocer si estas diferencias de co-localización eran debidas a diferencias en el proceso sintético o degradativo, estos autores estudiaron un ratón doble mutante para NPC1 y β -galactosidasa (enzima responsable de hidrolizar los beta-galactósidos de los gangliósidos, y por lo tanto de degradar el gangliósido GM1). En este modelo no se observó acúmulo de GM2, GM3 ni lactosilceramida en neuronas, lo que indicaría que en cerebro de la enfermedad de NPC el almacenaje de GM2, GM3 y glicoesfingolípidos menores neutros procederían exclusivamente del proceso de degradación de gangliósidos complejos en el ET/L. Otro hallazgo interesante fueron los niveles acumulados de GM1, que eran superiores en el doble mutante NPC1/ β -galactosidasa comparado con el mutante simple β -galactosidasa, lo que sugiere que la proteína NPC1 jugaría un papel en el rescate de los gangliósidos [175].

2.3.6 Bases esfingoides

En tejidos de pacientes NPC se han descrito niveles incrementados de esfinganina y esfingosina [177-178]. Diversos estudios en modelos celulares de la enfermedad sugieren que los niveles endógenos de esfinganina y esfingosina podrían participar en el secuestro lipídico en los ET/Ls [126, 179]. El almacenamiento de esfingosina en los compartimentos ácidos, como los Ls, produce una depleción de Ca^{2+} en estos organelos, resultando en un almacenamiento secundario de colesterol, esfingomielina y glicoesfingomielina. Por lo tanto, se deduce que el acúmulo de la esfingosina es un factor desencadenante de la patogénesis de la enfermedad de NPC [180].

2.3.7 Autofagia

Otro de los aspectos que parecería estar involucrado en la enfermedad de NPC, sería la alteración de la autofagia, tal y como ocurre en otras enfermedades lisosomales [181]. Elrick y Lieberman [182] describieron distintos defectos de la autofagia que contribuirían a la patogénesis de la enfermedad de NPC. Posteriormente, otros autores [183-184] describieron con más detalle este proceso y demostraron que la proteína NPC1 jugaría un papel entre la fusión del autofagosoma con el ET para formar el amfísoma. Los ETs deficientes de la proteína NPC1 pierden la capacidad de reclutar los componentes de la maquinaria SNARE que regula el evento de fusión, produciendo un defecto en la formación del amfísoma (Fig. 13).



2.4 Diagnóstico clínico

La valoración clínica es primordial. Por este motivo, el grupo de trabajo ‘NP-C Guidelines Working Group’ estableció en el año 2012 un índice de sospecha, basado en una escala de discapacidad, que valoraba signos y síntomas viscerales, neurológicos y psiquiátricos teniendo en cuenta la historia familiar [185]. Este índice genera una

puntuación de predicción de NPC y presenta una buena sensibilidad y especificidad siendo un método con buen poder discriminatorio de la enfermedad para aquellos casos con edades superiores a 4 años [186].

2.5 Diagnóstico bioquímico

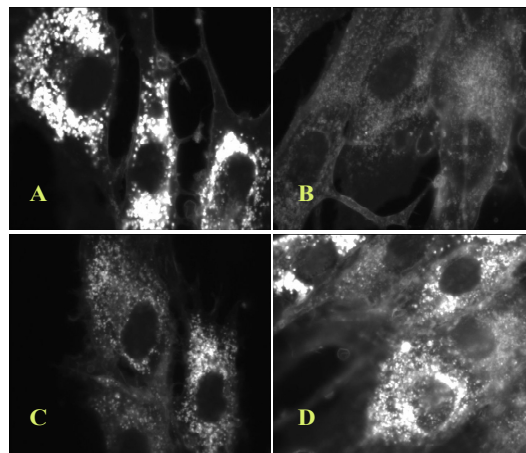
Análisis de laboratorio no específicos

Existen distintas determinaciones analíticas que pueden orientar el diagnóstico, aunque no son específicas de la enfermedad. Una de estas pruebas es la actividad quitotriosidasa que puede estar ligeramente elevada [187]. La actividad esfingomielinasa puede ser parcialmente deficiente en fibroblastos [188]. También se han observado niveles bajos de LDL y HDL y un incremento de triglicéridos en plasma [189]. Se ha sugerido que los niveles de HDL estarían inversamente correlacionados con la severidad del fenotipo. Otra prueba de interés es el diagnóstico histopatológico en médula ósea, en la cual se evidencia la presencia de células espumosas y histiocitos azul mar [190].

Tinción de filipina en fibroblastos

Esta es la metodología por excelencia para el diagnóstico bioquímico, que consiste en una tinción citoquímica del colesterol libre con filipina en fibroblastos. La filipina es un antibiótico sintético que forma complejos con el colesterol libre de forma específica, de modo que en el 80-85% de los casos se puede observar un incremento de vesículas perinucleares fluorescentes mediante microscopia de fluorescencia, patrón conocido como ‘fenotipo bioquímico clásico’ [165] (Fig. 14). Esta técnica presenta una sensibilidad y especificidad buena en la mayoría de los casos. Sin embargo, en algunos pacientes de presentación adulta o con una acumulación de colesterol

Figura 14. Imágenes de microscopia de fluorescencia de los acúmulos de colesterol libre intracelular en fibroblastos mediante la técnica citoquímica con filipina.



A: fenotipo clásico; B: control; C y D: fenotipo variante

más reducida (pacientes que responden a la clasificación de ‘fenotipo bioquímico variante’) pueden existir dificultades interpretativas [165]. Además, esta técnica es invasiva ya que implica la obtención de una biopsia de piel, además de ser un proceso largo que requiere del cultivo de fibroblastos.

Nuevos biomarcadores

Debido a las limitaciones que tiene la técnica de la filipina, es deseable disponer de biomarcadores fiables y rápidos que ayuden al diagnóstico bioquímico de la enfermedad. Por ello, en los últimos años han surgido distintos estudios en los que se han identificado posibles biomarcadores potenciales.

Oxiesteroles

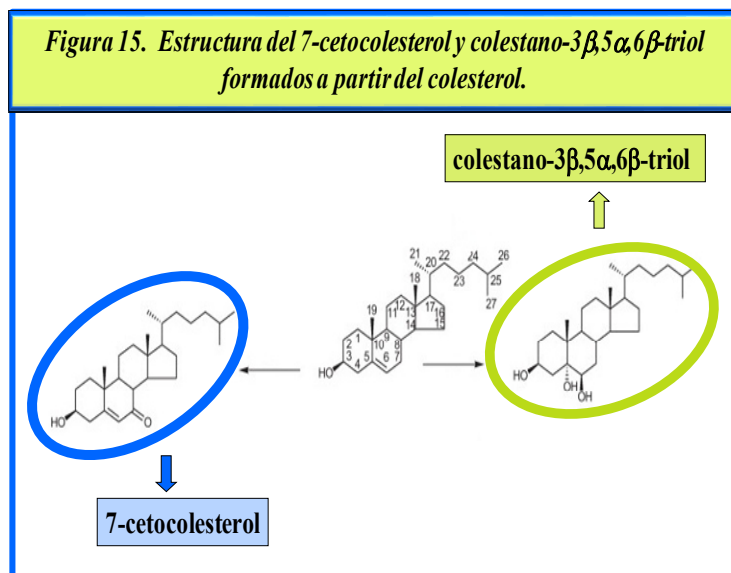
En el inicio de esta tesis, uno de los primeros biomarcadores que se describieron en los pacientes NPC fueron los oxiesteroles, productos que provienen de la oxidación del colesterol y que desempeñan un papel fisiológico importante en la regulación de procesos celulares. Los oxiesteroles son sintetizados en pequeñas concentraciones fisiológicas, sin embargo, bajo ciertas condiciones patológicas sus niveles pueden incrementarse considerablemente [191-192].

Estudios previos en modelos animales de la enfermedad de NPC mostraron la presencia de concentraciones elevadas de oxiesteroles en plasma y tejidos. Particularmente, los niveles más altos correspondían al epóxido-5,6-colesterol (5,6-EC), colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol (CT), 7 β -hidroxicolesterol y 7-cetocolesterol (7-KC), y en menor medida el 4 β -hidroxicolesterol y 25-hidroxicolesterol (25-HC). Por el contrario, se observaron niveles disminuidos de 24-hidroxicolesterol (24-HC) y 27-hidroxicolesterol (27-HC) [193-195]. A posteriori, el grupo del Dr. Ory [195] estudió estos oxiesteroles en una cohorte de pacientes NPC y observaron que los mayoritarios en plasma eran el CT y 7-KC, mientras que el 24-HC se encontraba disminuido.

Estas diferencias en la composición de oxiesteroles podrían explicarse por el acúmulo lisosomal de colesterol libre que está presente en esta enfermedad. Los oxiesteroles de cadena lateral como el 24-HC, 25-HC y 27-HC son sintetizados a partir del colesterol, predominantemente por la enzima P450 del RE (CYP46A1) y por la enzima CYP27A1 localizada en la membrana interna de la mitocondria, y actúan como ligandos

endógenos del receptor “*Liver X Receptor*” (LXR) (involucrado en la regulación de la homeostasis del colesterol celular) [191]. Los LXR actúan en respuesta a niveles elevados de colesterol intracelular, a través de la transactivación de genes implicados en el transporte de esteroides, en el eflujo de colesterol, en el metabolismo de HDL o en el catabolismo de esteroides, de modo que actúan como un mecanismo de detoxificación celular para proteger a la célula del exceso de producción de colesterol [191]. En la enfermedad de NPC, el secuestro lisosomal del colesterol libre impide la salida del mismo hacia el citoplasma, limitando el sustrato (colesterol) para los transportadores ABCA1 [196] e impidiendo la formación de oxisteroles de cadena lateral, lo que explicaría los niveles reducidos de 24-HC y 27-HC observado por algunos autores [194-195]. Esta producción disminuida de oxisteroles es responsable de una activación reducida de LXR, resultando en una disminución de la expresión de ABCA1 y como consecuencia, en un eflujo celular del colesterol más reducido todavía [196-197].

Por el contrario, los oxisteroles que presentan modificaciones en el núcleo esteroidal, como un epóxido (Ej: 5,6-EC) o un doble enlace en la posición C7 (Ej: 7-KC), son productos principalmente generados de manera no-enzimática debido a la susceptibilidad de estos grupos a la oxidación por radicales libres [191, 198] (Fig. 15). En el caso del 5,6-EC, éste puede convertirse después en CT por mediación de la epóxido hidrolasa [199-200]. Esta evidencia explicaría los niveles elevados de CT y 7-KC en la enfermedad de NPC en la cual, como en otras enfermedades neurodegenerativas, existe un estrés celular oxidativo [201-202], lo que favorece la producción de especies reactivas de oxígeno.



oxidación por radicales libres [191, 198] (Fig. 15). En el caso del 5,6-EC, éste puede convertirse después en CT por mediación de la epóxido hidrolasa [199-200]. Esta evidencia explicaría los niveles elevados de CT y 7-KC en la enfermedad de NPC en la cual, como en otras enfermedades neurodegenerativas, existe un estrés celular oxidativo [201-202], lo que favorece la producción de especies reactivas de oxígeno.

Porter y col. [195] observaron que no sólo la concentración de CT y 7-KC se encontraba más elevada en los pacientes NPC comparado con los sujetos sanos, sino que también era más alta que los niveles hallados en pacientes con otras enfermedades lisosomales (lipofuscinosis neuronal ceroides infantil, gangliosidosis GM-1, gangliosidosis GM-2 y

enfermedad de Gaucher). También se demostró que existía una correlación entre los niveles de CT y 7-KC y la edad de inicio de presentación de los síntomas y severidad de la enfermedad [195]. Este estudio, junto con otros trabajos descritos en los últimos años [195, 203-213] han reforzado la idea del papel de CT y 7-KC como biomarcadores sensibles y específicos de la enfermedad de NPC sugiriendo su utilidad para el diagnóstico bioquímico de la enfermedad de NPC.

Por otro lado, también se estudiaron los niveles de CT y 7-KC en un modelo felino NPC tras el tratamiento con ciclodextrina. Los resultados mostraron una disminución de la concentración de ambos oxisteroles y una mejora de las manifestaciones clínicas neurológicas [195]. Estos hechos demostraban que los oxisteroles también podrían ser buenos biomarcadores para la monitorización de tratamientos.

Existen diferentes métodos descritos (cromatografía en capa fina, cromatografía líquida y cromatografía de gases) para la determinación de diversos oxisteroles [214-222]. Al comienzo de esta tesis, Jiang y col. [203] describieron un método sensible y específico mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), aunque con ionización a presión atmosférica (APCI), hecho que dificulta su aplicación en los laboratorios de enfermedades metabólicas hereditarias.

Otros biomarcadores

Es los últimos años también se han descrito otros biomarcadores candidatos para esta enfermedad, aunque en algunos casos los resultados son controvertidos. Éste es el caso de la galectina-3 (LGALS3, molécula pro-inflamatoria) y la catepsina D (CTSD, proteasa lisosomal), dos proteínas que se encuentran incrementadas en plasma de pacientes NPC [223]. Sin embargo, estas proteínas también se hallaron elevadas en otras enfermedades lisosomales por lo que no son específicos de la enfermedad de NPC. También se describió que los niveles de ambas proteínas no se correlacionaban con los niveles de 7-KC y CT. Aunque existe controversia, algunos autores [223] también apoyan la utilidad de CTSD y LGALS3 como biomarcadores para la monitorización del tratamiento.

En orina de pacientes NPC también se han descrito concentraciones elevadas del ácido biliar 3β -sulfooxi- 7β -*N*-acetilglucosaminil-5-colen-24-oico (SNAG- Δ^5 -CA) junto con sus conjugados de glicina y taurina (SNAG- Δ^5 -CG, SNAG- Δ^5 -CT) [224-225]. Sin embargo, estos metabolitos no serían específicos de NPC, ya que también se encuentran elevados en otras enfermedades en las que existe un defecto del metabolismo de los ácidos biliares, como el síndrome de Smith-Lemli-Opitz (SLO) y la deficiencia de 3β -Hidroxi-D5-C27-esteroide deshidrogenasa [225]. Recientemente, se ha identificado la presencia de niveles elevados de los ácidos 3β -hidroxi, 7β -*N*-acetilglucosaminil-5-colenoico y $3\beta,5\alpha,6\beta$ -trihidroxicolánico (junto con sus conjugados de glicina), en plasma y sangre seca de pacientes NPC [226-228]. Por lo tanto, el análisis de ácidos biliares sería otra metodología potencial para el diagnóstico de esta enfermedad.

Tal y como se ha descrito anteriormente, en la enfermedad de NPC existe un acúmulo de esfingolípidos, por lo que también se ha sugerido su papel como biomarcador. Fan y col. [229] observaron que los niveles de lactosilceramida y gangliósidos GM1 y GM3 disminuían en plasma y LCR en pacientes NPC tras el tratamiento con miglustat. Sin embargo, los niveles de monohexosilceramida aumentaban tras el tratamiento. Diversos estudios han descrito incrementos de glucosilceramida en cerebro en respuesta al tratamiento con inhibidores basados en iminoazúcares como miglustat debido a su acción inhibitoria de la glucosilceramidasa, enzima responsable del mantenimiento de la homeostasis de glicoesfingolípidos [230-232]. Se han descrito también elevaciones de los niveles de lactosilceramida y monohexosilceramida en LCR después del tratamiento con ciclodextrina en modelos felinos NPC [229], probablemente debido al efecto exocitótico de las ciclodextrinas [233]. En base a estos hallazgos, se sugiere que este perfil lipídico podría ser útil para valorar la eficacia del tratamiento [229].

Otros biomarcadores propuestos son algunas formas lisosomales de esfingolípidos como la lisoesfingomielina (SPC) y glucosilesfingosina (GlcSph) [205, 234]. Los niveles de SPC no correlacionan con los niveles de CT, por lo que se sugiere que la combinación de los dos sería la mejor opción para el diagnóstico de NPC [234]. En pacientes en tratamiento con miglustat tampoco se observaron cambios en la concentración de SPC, por lo que no sería útil como biomarcador para la monitorización de dicho tratamiento [234].

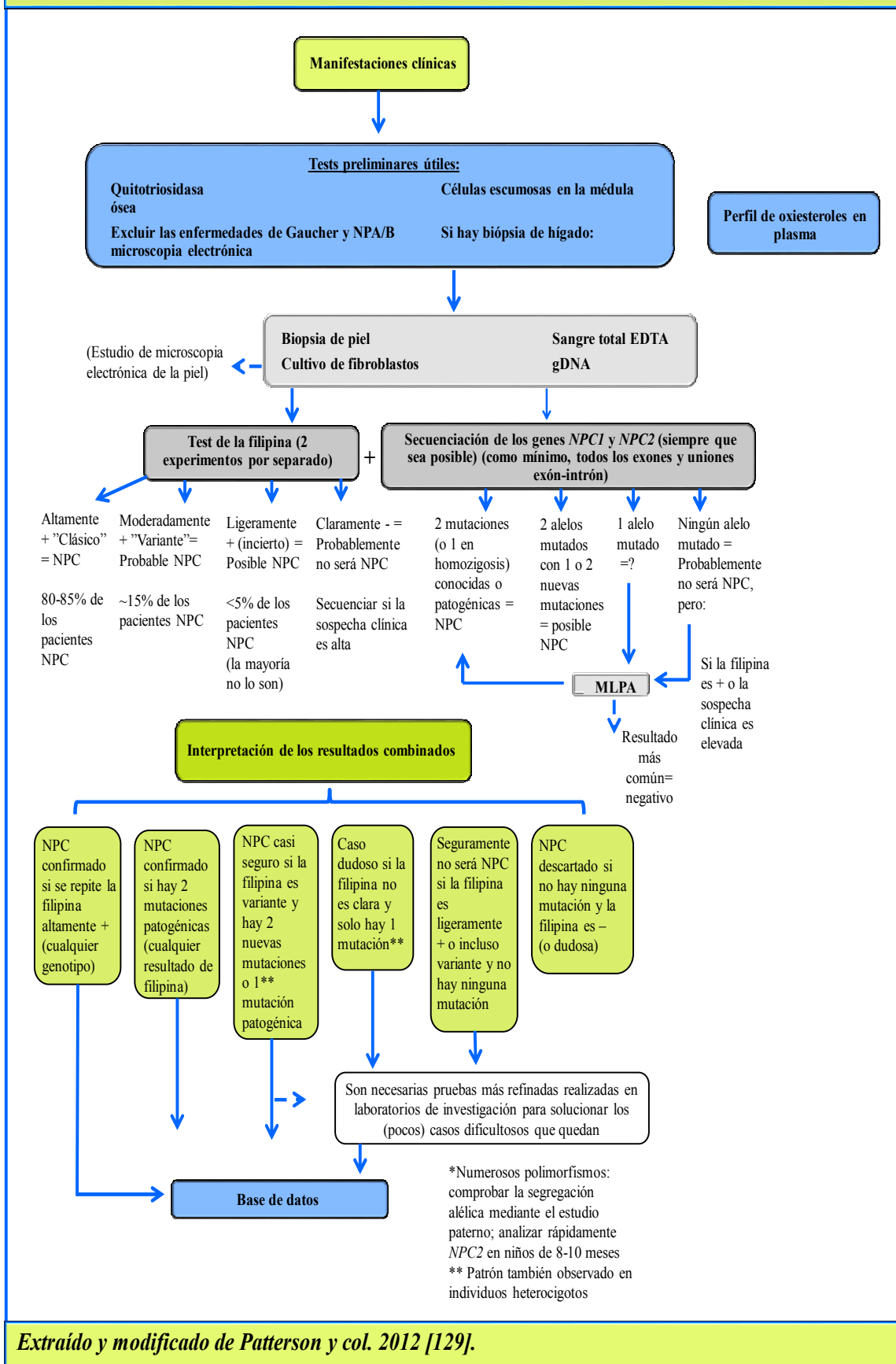
Recientemente se ha descrito la liso-esfingomielina-509 (Lyso-SM-509) como un nuevo biomarcador potencial. Lyso-SM-509 correlaciona con la severidad de la enfermedad y también con los niveles de CT. Lyso-SM-509 se encuentra elevado en pacientes NPC y de manera más evidente en NPA y NPB, por lo que la valoración de este metabolito sería útil para el diagnóstico de estas tres entidades [235].

La medición del volumen del compartimento ácido relativo expresado como media equivalente de fluorescencia (MEFL) también ha sido descrito como posible biomarcador, hallándose elevado en células B circulantes de pacientes NPC [236]. MEFL correlaciona con la severidad de la enfermedad y también con los niveles plasmáticos de Lyso-SM-509 [235].

2.6 Diagnóstico genético

Finalmente, en caso de positividad de las pruebas bioquímicas, se debería proceder al estudio genético de los pacientes. El método habitual consiste en la secuenciación de los genes *NPC1* y/o *NPC2*. El test genético de nuevos pacientes tiene gran importancia para realizar un diagnóstico prenatal y para la detección de portadores (Fig. 16).

Figura 16. Algoritmo diagnóstico de la enfermedad Niemann-Pick tipo C propuesto por "The NPC Guidelines Working Group"



2.7 Correlación genotipo-fenotipo

La enfermedad de NPC es una enfermedad autosómica recesiva que puede estar causada por mutaciones en dos genes distintos. El 95% de los pacientes presenta mutaciones en el gen *NPC1*. Hasta la fecha se han descrito cerca de 350 mutaciones en este gen. Existen 3 dominios que son funcionalmente críticos: el SSD, el bucle luminal rico en cisteínas y el dominio luminal NPC1. Las mutaciones de cambio de sentido en el SSD que se presentan en homocigosis son muy deletéreas produciendo una falta de la proteína madura NPC1 y un fenotipo bioquímico y clínico severo. El bucle luminal rico en cisteínas contiene aproximadamente el 50% de las mutaciones de cambio de sentido asociadas a un fenotipo variable clínico y bioquímico. En este dominio se encuentran las 3 mutaciones más frecuentes en los pacientes NPC. La mutación c.3182T>C (p.Ile1061Thr) es la más prevalente (20-25% de los alelos) en determinados países como Francia y Reino Unido [237] pero menos frecuente en Portugal, España e Italia [238-241]. Esta mutación en estado de homocigosis está asociada a un fenotipo bioquímico clásico y a la forma clínica juvenil [237], aunque se ha descrito un paciente homocigoto con presentación clínica infantil severa [241]. La mutación c.3019C>G (p.Pro1007Ala) es la segunda más frecuente en Europa [242-243], corresponde a un fenotipo bioquímico variante y en homocigosis está asociada a la forma adulta de la enfermedad. La mutación c.2974G>T (p.Gly992Trp), típica de los pacientes de Nueva Escocia (tipo D de la enfermedad), está asociada con una forma de presentación juvenil y una lenta progresión neurológica de la enfermedad [244].

Un 5% de mutaciones se encuentra en el gen *NPC2*, han sido descritas alrededor de 20 mutaciones en este gen y se han identificado unas 30 familias afectadas. Las mutaciones que fragmentan la proteína están asociadas con los fenotipos neurológicos más severos. Las mutaciones de cambio de sentido corresponden a formas clínicas más diversas que incluyen la juvenil y adulta, siendo la mutación c.58G>T (p.Glu20*) relativamente frecuente [245-247].

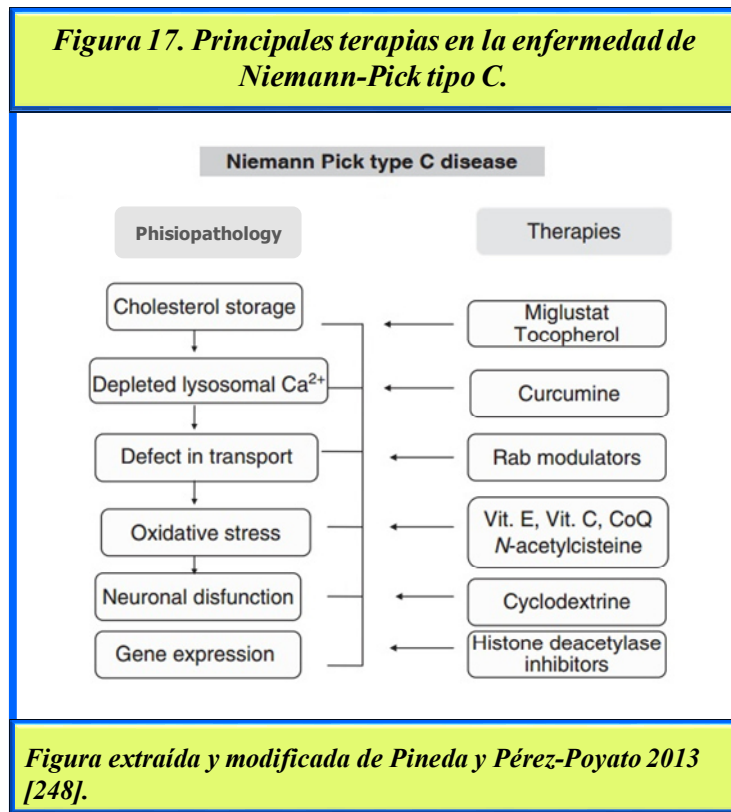
2.8 Tratamiento

2.8.1 Terapia paliativa de los síntomas clínicos

No existe ningún tratamiento curativo de la enfermedad, por lo que el tratamiento sintomático en estos pacientes es primordial para lograr una mejora de la calidad de vida. El manejo de los síntomas neurológicos (epilepsia, cataplejía, distonía), desórdenes psiquiátricos y otras manifestaciones sistémicas como problemas gastrointestinales o pulmonares representa la primera línea de actuación en los pacientes NPC con el objetivo de estabilizar o ralentizar la progresión de la enfermedad [129].

2.8.2 Terapia basada en el metabolismo lipídico, antioxidantes, terapia epigenética y trasplante

Se han estudiado diversas terapias específicas basadas en la fisiopatología de la enfermedad [248] (Fig. 17). La curcumina parecería tener efectos beneficiosos en la homeostasis intracelular del calcio, el metabolismo lipídico y la supervivencia en ratones NPC [180], no obstante, estudios recientes han demostrado su poca efectividad [249]. El uso de antioxidantes (vitamina E,



N-acetilcisteína, CoQ) como agentes para reducir el estrés oxidativo celular en los pacientes NPC han demostrado, sin embargo, beneficios terapéuticos aunque limitados [250-252].

Los inhibidores de histona deacetilasa (HDAC, enzima involucrada en la modificación de las histonas) han demostrado efectos prometedores en la enfermedad de NPC. En

modelos celulares se ha demostrado una mejoría en la expresión proteica de NPC1, disminuye la acumulación lisosomal de colesterol y esfingolípidos y mejora la esterificación defectuosa del colesterol [253-254]. Por otro lado, se ha descrito que la triple terapia con vorinostat (un HDAC), 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (HP β CD) y polietilenglicol, reduce los síntomas neurodegenerativos y sistémicos en el ratón NPC [255]. Esta triple terapia reforzaría la capacidad de vorinostat de atravesar la BHE y preservaría las neuritas y células de Purkinje, retrasando los síntomas de neurodegeneración y prolongando la vida del ratón.

El trasplante de células hematopoyéticas y el trasplante de hígado no han demostrado ser efectivos en pacientes con mutaciones *NPC1* pero sí que tendría algún beneficio clínico en pacientes con mutaciones *NPC2* debido a que la proteína NPC2 es una proteína soluble que se secreta y se recapta por la vía de manosa-6-fosfato [256].

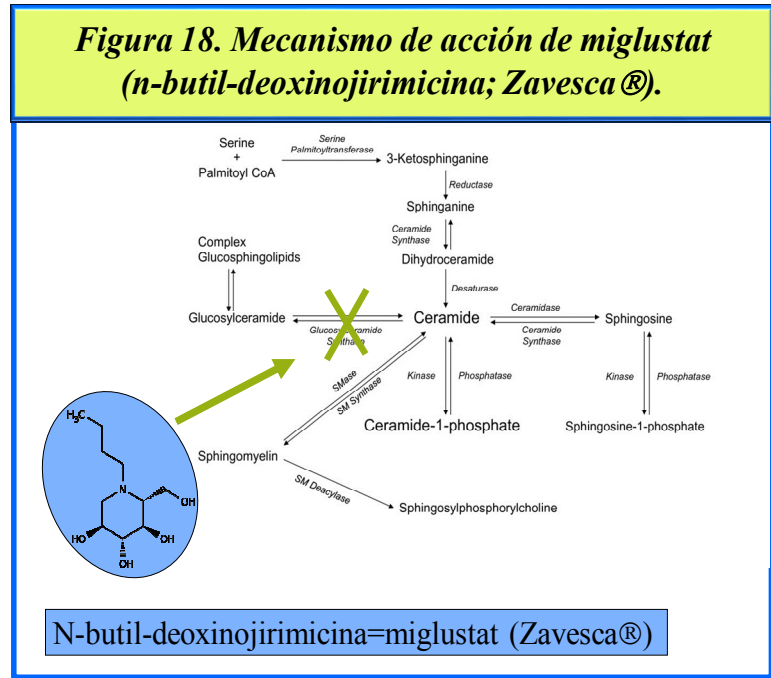
Actualmente, la terapia con miglustat y/o ciclodextrinas es el tratamiento de elección en la enfermedad de NPC, tal y como se detalla en los siguientes apartados.

2.8.3 Terapia de reducción de sustrato

La estrategia de reducción de colesterol como las estatinas, ezetimibe o dieta baja en colesterol sólo sería útil para reducir los niveles plasmáticos y hepáticos de colesterol [257-258]. Una estrategia alternativa de reducción de sustrato sería la inhibición de LAL que produciría una inhibición de la hidrólisis de ésteres de colesterol. Este mecanismo ha demostrado disminuir significativamente la acumulación de colesterol en las células NPC [259], sin embargo, no afectaría a la liberación de colesterol libre mediada por ApoE en el sistema nervioso central ni corregiría la esteroidogénesis deficiente que está presente en esta enfermedad [260].

Miglustat (N-butil-deoxinojirimicina; Zavesca[®]) es el único tratamiento aprobado para el tratamiento de las manifestaciones neurológicas de los pacientes NPC desde el año 2009 en diferentes países. Este fármaco fue inicialmente aprobado como terapia para la enfermedad de Gaucher, que es una enfermedad lisosomal en la que existe un acúmulo de glucosilceramida debido a una deficiencia de la β -glucocerebrosidasa, enzima que cataliza la conversión de glucosilceramida a ceramida y glucosa.

Miglustat es un iminoazúcar que inhibe reversiblemente la glucosilceramida sintasa, enzima que cataliza el primer paso de la síntesis de glicosfingolípidos (Fig. 18). Esta inhibición produce una reducción de los esfingolípidos y un incremento de los niveles de ceramida en los Ls [261]. La



ceramida comparte similitud estructural con el colesterol y se ha descrito que puede desplazar el colesterol en los dominios lipídicos en modelos de membrana, facilitando el eflujo de esteroides desde los Ls [262]. Diversos estudios han mostrado que miglustat reduce la acumulación de glicosfingolípidos, mejora la captación endosomal y normaliza el tráfico lipídico en linfocitos B en sangre periférica de pacientes NPC [261]. Además, miglustat actuaría como protector contra el estrés oxidativo en estos pacientes [263] y conferiría efectos beneficiosos en la degeneración axonal disminuyendo los niveles de la proteína T-tau en LCR y de la proteína amiloide β que se encuentran aumentadas en la enfermedad de NPC y que estarían relacionadas con la neurodegeneración presente en estos pacientes [264-265]. No obstante, los resultados obtenidos en los distintos ensayos clínicos han demostrado una eficacia moderada en el retraso de la progresión de la enfermedad. Los efectos beneficiosos se observan principalmente durante los 6 meses y 1 año de tratamiento o en tiempos superiores en aquellos casos con formas de progresión lentas (pacientes adultos). La respuesta al tratamiento es superior en pacientes con formas juveniles y adultas que en pacientes con formas perinatales e infantiles, debido probablemente a la mayor severidad de los síntomas y a la rápida progresión de la enfermedad [266]. Sin embargo, miglustat no moviliza la acumulación de colesterol intracelular presente en la enfermedad de NPC, lo que explicaría la respuesta moderada en la mejora de los síntomas clínicos de estos pacientes tras la administración de este fármaco [267]. Debido a estas limitaciones, surge la necesidad de encontrar nuevos tratamientos que sean más eficaces.

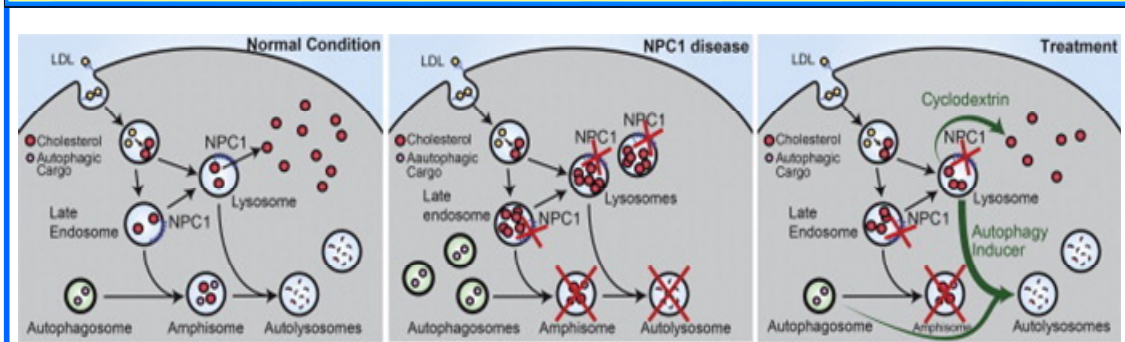
2.8.4 Terapia basada en el metabolismo de esteroides

Las ciclodextrinas, oligosacáridos cíclicos caracterizados por un núcleo interior hidrofóbico y una superficie externa hidrofílica, tienen especial interés en la enfermedad de NPC, ya que son capaces de formar complejos con el colesterol [268]. Diversos estudios en líneas celulares y modelos animales con ciclodextrinas, concretamente la 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (HP β CD) y 2-hidroxiopropil- γ -ciclodextrina (HP γ CD), han demostrado su capacidad para movilizar el colesterol intracelular, disminuir la acumulación de los gangliósidos GM2 y GM3, aumentar la supervivencia de las células de Purkinje, disminuir los síntomas clínicos de la enfermedad y prolongar la supervivencia del ratón NPC [160, 269-277]. No se conoce muy bien su mecanismo de acción. Parece ser que el primer mecanismo para que la ciclodextrina movilice los depósitos de colesterol desde el ET/L sería una fase de endocitosis o endocitosis mediada por clatrina. En varios estudios se ha observado que el colesterol liberado de los ETs/Ls por acción de la ciclodextrina alcanza el compartimento citosólico y es accesible al RE. Una muestra de ello es la producción de ésteres de colesterol en el RE por mediación de la enzima acil-CoA-colesterol-O-aciltransferasa (ACAT) que se encuentra estimulada en varios tejidos y células de ratón NPC tras la administración de ciclodextrina. En neuronas cerebelosas, astrocitos y microglia de ratón NPC también se ha observado movilización del colesterol hacia el RE a bajas concentraciones de ciclodextrina. Otro indicador de que el colesterol está disponible en el RE es la expresión disminuida de SREBP2, un factor de transcripción que regula la síntesis de colesterol y su captación. Además, también se ha observado disminución de la expresión del mRNA codificante del receptor LDL y de la HMG-CoA reductasa, por lo que se reduce la síntesis de colesterol en cerebro y tejidos periféricos [278]. Un aspecto destacable en el mecanismo de acción de la ciclodextrina es la salida del colesterol, desde el interior de los ETs/Ls a la membrana exterior, de manera independiente de las proteínas NPC1/NPC2. Además, también se ha observado que la ciclodextrina disminuye el exceso de los otros lípidos incluyendo glicoesfingolípidos y bases esfingoides libres en los ETs/Ls [161, 271, 279] y modelaría la alteración de la autofagia presente en la enfermedad [184] (Fig. 19).

En el año 2013 se ensayó la administración de HP β CD en 2 pacientes NPC y se observó una mejora de la hepatoesplenomegalia y de la disfunción del sistema nervioso aunque la mejoría de los síntomas neurológicos era parcial ya que sólo se manifestó durante los

6 primeros meses de tratamiento [280]. Esta evidencia hizo que se desarrollara el primer ensayo clínico con HP β CD en pacientes NPC [267, 281].

Figura 19. Efecto de la ciclodextrina en los defectos funcionales celulares de la enfermedad de Niemann-Pick tipo C.



El panel izquierdo muestra la distribución de colesterol y el flujo autofágico en condiciones normales. El panel central muestra los efectos debidos a la pérdida de la función de las proteínas NPC1 en el metabolismo del colesterol y el flujo de autofagia. Las mutaciones en el gen *NPC1* en ambos alelos lleva a la acumulación de colesterol en los ET/Ls mediante la inhibición de su salida, y a un bloqueo en el flujo autofágico causando la acumulación de autofagosomas y un aumento del sustrato de autofagia debido a la alteración de la formación de amfiosomas. La corrección de los fenotipos relacionados con la enfermedad se puede conseguir mediante ciclodextrina que promueve la salida del colesterol (panel derecho). *Figura extraída de Maetzel y col. 2014 [184].*

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS



HIPÓTESIS DE TRABAJO

En el marco de un proyecto, coordinado con otros grupos, identificamos los 13 primeros pacientes españoles con deficiencia cerebral de creatina. Sin embargo, las opciones terapéuticas eran todavía muy limitadas, en particular para las deficiencias del transportador de creatina, que es la más frecuente dentro de este grupo de enfermedades. Dado que el grupo del Dr. Balestrino de la Universidad de Génova había sintetizado unos productos hidrofílicos derivados de creatina (Cr), que parecían ser prometedores en ensayos en cerebro de ratón, establecimos una colaboración con su grupo, para el posterior estudio de dichos productos. Nuestra hipótesis fué que los ensayos farmacológicos en células iPS procedentes de pacientes, y en células endoteliales humanas (HUVEC) así como en células endoteliales microvasculares cerebrales humanas (HBMEC) nos proporcionaría una información útil para el desarrollo de opciones terapéuticas, antes de proceder a ensayos preclínicos y a su utilización como compuestos terapéuticos.

Paralelamente, nos planteamos el desarrollo de biomarcadores tanto para la deficiencia cerebral de creatina como para la enfermedad de Niemann Pick tipo C. Ambas entidades presentaban ciertas dificultades diagnósticas o bien era necesario realizar pruebas invasivas.

Así pues, en esta tesis se va a estudiar el desarrollo de herramientas terapéuticas y diagnósticas aplicadas concretamente a las dos enfermedades metabólicas hereditarias arriba mencionadas.

OBJETIVOS:

1. Estudiar la efectividad de los derivados y precursores de Cr en la deficiencia cerebral de CRTR en cultivos de líneas celulares humanas:

- Fibroblastos de pacientes con deficiencia de CRTR.
- Células iPS generadas a partir de fibroblastos de pacientes con deficiencia de CRTR.
- Células endoteliales HUVEC y HBMEC, silenciando previamente el gen *SLC6A8*, como modelos de endotelio vascular y de barrera hematoencefálica (BHE) respectivamente.

2. Estudiar el papel como biomarcador del sistema creatina quinasa (CK)/ATP en las deficiencias cerebrales de Cr, y el de la Cr en pacientes con enfermedades mitocondriales.

3. Desarrollar y validar nuevas técnicas bioquímicas rápidas, fiables y robustas para la detección de oxisteroles en la enfermedad de NPC.

MÉTODOS



MÉTODOS

A continuación se recogen todos los métodos utilizados y se mencionan los artículos de esta tesis en los cuales está descrita cada metodología.

- Cromatografía líquida de alta presión-ionización de electrospray- acoplada a espectrometría de masas (HPLC-ESI-MS/MS): Artículos 1- 4
- Cromatografía líquida de ultra-alta presión (UHPLC): Artículo 1
- Cultivo celular de fibroblastos, células HUVEC y HBMEC: Artículos 1, 2
- Ensayos de captación celular de tratamientos en cultivos celulares: Artículo 1
- Ensayos de viabilidad celular: Artículo 1
- Silenciamiento de genes con siRNA: Artículo 1
- Extracción de RNA: Artículo 1
- Síntesis de cDNA: Artículo 1
- PCR a tiempo real: Artículo 1
- ELISA: Artículo 1
- Microscopia de fluorescencia: Artículo 1

RESULTADOS



INFORME SOBRE LA CONTRIBUCIÓN DE LA DOCTORANDA A LAS PUBLICACIONES DE ESTA TESIS DOCTORAL

ARTÍCULO 1:

Título: Creatine derivatives in the treatment of creatine transporter deficiency.

Autores: Pajares S, Arias A, García-Villoria J, Ribes A.

Revista: Artículo en preparación.

Aportación de la doctoranda: En este artículo la doctoranda ha participado en el diseño del estudio y ha realizado el trabajo experimental en su totalidad, a excepción de las dos siguientes etapas del estudio: Obtención y suministro de los derivados de Cr, que fue realizada por el grupo del Dr. Balestrino, Universidad de Génova, Italia. Obtención de células iPS, llevada a cabo por el grupo de investigación del Dr. Izpizua, Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona. La doctoranda realizó todo el análisis estadístico de los datos y participó de manera directa en la elaboración del artículo.

ARTÍCULO 2:

Título: Analysis of the Cr/CK/PCr/ATP system in cerebral creatine deficiency syndromes.

Autores: Pajares S, Arias A, García-Villoria J, Ribes A.

Revista: Artículo en preparación.

Aportación de la doctoranda: En este artículo la doctoranda ha participado en el diseño del estudio y ha realizado el trabajo experimental en su totalidad, así como el análisis estadístico de los datos. También ha participado de manera directa en la elaboración del artículo.

ARTÍCULO 3:

Título: Role of creatine as biomarker of mitochondrial diseases.

Autores: Pajares S, Arias A, García-Villoria J, Briones P, Ribes A.

Revista: Mol Genet Metab. 2013; 108(2):119-24

Factor de impacto (JCR Science Edition): 2.827 (2º cuartil: Genetics and Heredity).

Aportación de la doctoranda: En este artículo la doctoranda ha participado en el diseño del estudio y ha realizado el trabajo experimental en su totalidad, así como el

análisis estadístico de los datos. También ha participado de manera directa en la elaboración del artículo.

ARTÍCULO 4:

Título: Cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol: high levels in Niemann-Pick type C, cerebrotendinous xanthomatosis, and lysosomal acid lipase deficiency.

Autores: Pajares S, Arias A, García-Villoria J, Macías-Vidal J, Ros E, de Las Heras J, Girós M, Coll MJ, Ribes A.

Revista: J Lipid Res. 2015;56(10):1926-35.

Factor de impacto (JCR Science Edition): 4.421 (1r cuartil: Biochemistry and Molecular Biology).

Aportación de la doctoranda: En este artículo la doctoranda ha participado en el diseño del estudio y ha realizado el trabajo experimental en su totalidad, así como, el análisis estadístico de los datos. También ha participado de manera directa en la elaboración del artículo.

ANEXO

Título: Creatine as biomarker

Autores: Antonia Ribes*, Sonia Pajares*, Ángela Arias, Judit García-Villoria.

* Equally work. **Publicación:** Preedy, Victor R, Patel, Vinood B. (Eds.). General Methods in Biomarker Research and their Applications. Biomarkers in Disease: Methods, Discoveries and Applications, Volume 1, pp 333-361. 2015. Springer Reference, London.

Aportación de la doctoranda: En este capítulo de libro la doctoranda ha participado de manera directa en su elaboración.

Barcelona, 2016

Conformidad de los directores y del tutor de tesis:

Dra. Antonia Ribes Rubió Dra. M^aJosé Coll Rosell Dr. Wladimiro Jiménez Povedano

PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS

En base a los objetivos planteados en esta tesis, este trabajo ha dado lugar a tres líneas de estudios con la generación final de 4 publicaciones:

- 1) Se ha estudiado la eficacia de compuestos derivados de creatina (Cr) y de precursores de la misma en modelos celulares humanos con deficiencia del transportador de Cr (CRTR). Estos compuestos habían sido probados previamente en modelos animales y parecía aumentar la concentración intracelular de Cr de forma independiente de transportador (Artículo 1).
- 2) Se ha evaluado por primera vez el sistema Cr/CrP/CK/ATP en su conjunto en las deficiencias cerebrales de Cr con el objetivo de conocer su posible utilidad como biomarcadores en estas enfermedades (Artículo 2).
- 3) Se ha analizado el papel de la Cr como biomarcador de enfermedades mitocondriales (Artículo 3).
- 4) Con respecto a la enfermedad de Niemann-Pick tipo C (NPC) se ha estudiado el papel de colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol (CT) y 7-cetocolesterol (7-KC) como herramienta para el diagnóstico bioquímico de esta enfermedad (Artículo 4).

1. DEFICIENCIA DEL TRANSPORTADOR DE CREATINA

Artículo 1. Creatine derivatives in the treatment of creatine transporter deficiency.

Pajares S, Arias A, García-Villoria J, Ribes A.

Artículo en preparación.

RESUMEN

En la deficiencia del transportador de creatina (CRTR) no existe ninguna terapia que corrija de manera eficaz la deficiencia cerebral de creatina (Cr) en los pacientes. Al inicio de esta tesis, un estudio previo reportó que el tratamiento con derivados de Cr (complejo de creatina fosfato-magnesio: PCr-Mg-CPLX y creatina-benzil-éster: CrOBzl) en cerebro de ratón incrementaba el contenido intracelular de Cr de una forma independiente del transportador (CRTR), sugiriendo que estos compuestos podrían ser candidatos para la terapia de la deficiencia de CRTR. En base a estos hallazgos, nos propusimos evaluar la eficacia de estos productos, así como de otro derivado de Cr formulado en base a nanopartículas de oro (Au-HC-NPs), en modelos de células humanas. Concretamente utilizamos fibroblastos y células iPS (derivadas de estos fibroblastos) procedentes de 3 pacientes con deficiencia de CRTR, y también células endoteliales humanas de vena umbilical (HUVEC) y células endoteliales microvasculares cerebrales humanas (HBMEC).

En el trabajo que se recoge en esta publicación se consiguió establecer previamente un modelo *in vitro* de endotelio vascular y de barrera hematoencefálica (BHE) en la deficiencia de CRTR silenciando el gen correspondiente, *SLC6A8*, con siRNA en las células HUVEC y HBMEC.

La sobrecarga de cada uno de los 3 tratamientos mostró un leve incremento en la concentración intracelular de Cr en todas las líneas celulares ensayadas. Sin embargo, este incremento no fue superior al observado tras la administración de Cr monohidrato. El análisis de los compuestos PCr-Mg-CPLX y CrOBzl mostró que en solución acuosa dichos compuestos se hidrolizan en gran porcentaje dando lugar a Cr y creatinina (Crm). Después de analizar varias posibilidades, creemos que ésta podría ser la causa de la negatividad de los resultados.

En cuanto a las nanopartículas de oro desconocemos si pudo haber un proceso de agregación influenciado por el pH o las sales del medio, o si la entrada a la célula fue

parcial. No hemos podido dar respuesta a estas cuestiones ya que no disponíamos de ningún sistema de marcaje de este compuesto ni de la técnica de microscopía electrónica de transmisión para comprobar su entrada al interior de la célula. Las nanopartículas fueron diseñadas y obtenidas por el grupo del Dr. Balestrino. Se siguieron estrictamente las recomendaciones para su disolución proporcionadas por dicho grupo.

También se realizaron ensayos con los precursores de Cr, arginina y glicina, en estos mismos modelos celulares con el fin de conocer si se conseguía estimular la síntesis de Cr endógena, ya que ambos precursores pueden atravesar la membrana plasmática. Una vez en el interior de la célula estos compuestos podrían ser capaces de sintetizar Cr. Sin embargo, no se observó elevación de Cr tras su administración.

Con este estudio hemos llegado a la conclusión de que el tratamiento con PCr-Mg-CPLX, CrOBzl y Au-HC-NPs, así como con los precursores de Cr, no son buenos candidatos para la terapia de la deficiencia de CRTR. Estos resultados han proporcionado conocimientos acerca de la estabilidad y permeabilidad de estos compuestos; de modo que se ha evidenciado que es necesario mejorar y modificar el diseño de los mismos con el fin de obtener compuestos más estables y lipófilos capaces de atravesar la BHE.

Una aportación interesante y novedosa en esta línea de estudio ha sido el desarrollo y obtención de modelos *in vitro* de endotelio vascular y BHE con células humanas, que podrían ser útiles para el estudio de permeabilidad de compuestos, principalmente en enfermedades neurológicas. La utilización y validación de células iPS también ha sido un aspecto relevante para nuestro grupo y un avance en el campo de la investigación. Las características de crecimiento y reprogramación celulares de las células iPS las han convertido en una herramienta muy útil tanto en el estudio de enfermedades como en el cribado de compuestos potencialmente terapéuticos.

Creatine derivatives in the treatment of creatine transporter deficiency

Pajares S, Arias A, García-Villoria J, Ribes A*.

Sección de Errores Congénitos del Metabolismo-IBC, Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clínic, CIBERER, IDIBAPS, Barcelona, Spain

* **Address correspondence to this author at:** Sección de Errores Congénitos del Metabolismo-IBC, Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clínic, c/ Mejía Lequerica s/n Helios III, 08028 Barcelona, Spain. Tel +0034 932279340; Fax +0034 932275668; e-mail aribes@clinic.ub.es

Keywords

Creatine; Creatine transporter deficiency; CRTR; *SLC6A8*; siRNA; PCr-Mg-CPLX; CrOBzl; Au-HC-NPs; L-arginine; Glycine; HUVEC; HBMEC; Fibroblasts; iPS; HPLC-ESI-MS/MS.

Abbreviations

AGAT: L-Arginine:glycine amidinotransferase; Au-HC-NPs: gold Cr nanoparticles; BBB: blood brain barrier; CCDS: cerebral creatine deficiency syndromes; Cr: creatine; CrOBzl: creatine benzyl ester; CRTR: creatine transporter; FBS: fetal bovine serum; GAMT: guanidinoacetate N-methyltransferase; HBMEC: human brain microvascular endothelial cells; HUVEC: human umbilical vein endothelial cells; iPS cells: induced pluripotent stem cells; MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PCr-Mg-CPLX: phosphocreatine-Mg-complex acetate; SIR: single ion recording.

Abstract

Some derivatives of creatine (Cr) have been developed in the last years: phosphocreatine-Mg-complex acetate (PCr-Mg-CPLX), Cr benzyl ester (CrOBzl) and gold Cr nanoparticles (Au-HC-NPs). PCr-Mg-CPLX and CrOBzl treatment have shown to improve intracellular Cr concentrations crossing cellular membranes in a Cr transporter (CRTR)-independent way in mouse brain slices. Therefore, it has been suggested that these compounds would be useful as treatment in the CRTR deficiency in

which no therapy is available. Based on these findings, we studied the cellular uptake of such derivatives in fibroblasts derived from patients with CRTR deficiency, induced pluripotent stem (iPS) cells generated from these fibroblasts, as well as, in HUVEC and HBMEC cell lines. Previously, we silenced the CRTR in HUVEC and HBMEC by siRNA in order to obtain a model of vascular endothelium and blood brain barrier with CRTR deficiency. Cellular uptake of PCr-Mg-CPLX, CrOBzl and Au-HC-NPs showed a mild increase of the intracellular Cr content in all cell lines, but they did not show differences with respect to Cr monohydrate treatment. Moreover, the treatment with precursors of Cr did not show changes in the intracellular Cr synthesis. Consequently, any of the derivatives and precursors of Cr tested would seem to be ineffective to treat CRTR deficiency.

Introduction

Creatine transporter (CRTR, MIM#300036) is a transmembrane protein encoded by *SLC6A8* that mediates the cellular uptake of creatine (Cr), a relevant molecule in the cellular energy homeostasis [1-3]. CRTR deficiency (MIM#300352) is an X-linked disease and belongs to the cerebral Cr deficiency syndromes (CCDS). These syndromes are characterized by severe brain malfunction [4-8], but contrary to the other CCDS, L-arginine:glycine amidinotransferase and guanidinoacetate N-methyltransferase deficiencies, Cr supplementation in patients with CRTR deficiency results ineffective [9-14]. This fact is, partly, due to the high polarity of Cr that difficult its crossing through the blood brain barrier (BBB). Consequently, a specific Cr transporter is required [15-16]. For that reason, investigations to find a therapy for CRTR deficiency are focused on the development of lipophilic molecules able to cross the BBB in a CRTR-independent way.

In the last years, some derivatives of Cr such as phosphocreatine-Mg-complex acetate (PCr-Mg-CPLX), Cr benzyl ester (CrOBzl) [17], and gold Cr nanoparticles [18] have been tested. Lunardi et al [17] reported an increase of intracellular Cr content in mouse brain slices after treatment with PCr-Mg-CPLX and CrOBzl.

Other authors demonstrated endogenous synthesis of Cr in lymphoblasts of patients with CRTR deficiency after treatment with its amino acid precursors, L-arginine and

glycine [19]. Based on these findings, we aimed to study the uptake of the above mentioned Cr derivatives, as well as, the amino acid precursors of Cr in human cell lines. We used fibroblasts from patients with CRTR deficiency and induced pluripotent stem (iPS) cells generated from these fibroblasts. Furthermore, HUVEC and HBMEC cell lines after silencing CRTR were used as a model of physiological barriers, since they are suitable for the study of the vascular endothelium and the BBB respectively [20-22].

Materials and Methods

Subjects

Fibroblasts were obtained from 3 patients with CRTR deficiency genetically confirmed [23-25]. Biochemical, molecular and clinical data are summarized in Table 1. Two fibroblast cell lines from our repository bank were used as control fibroblasts. Skin biopsies were obtained in accordance with the Helsinki Declaration of 1964, as revised in 2000. Informed consent was obtained from the patients' parents.

Cell culture

Fibroblasts were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS), 100 IU/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin at 37°C, 5% CO₂ and 95% humidity.

iPS cells were generated from control fibroblasts and from fibroblasts of patient 1 (P1) and patient 3 (P3) (Table 1) by Dr. Izpizua group (Barcelona, Spain) in the Center of Regenerative Medicine.

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC; Invitrogen Corp, Carlsbad, CA) and Human brain microvascular endothelial cells (HBMEC; Applied Cell Biology Research Institute, Kirkland, WA) were cultured on gelatine-coated flasks at 37°C, 5% CO₂ and 95% humidity in Medium 199 supplemented with 20% FBS, 50 µg/mL endothelial cell growth supplement, 100 µg/mL heparin, 100 UI/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin.

SLC6A8 siRNA transfection in HUVEC and HBMEC

Three different siRNAs were used based on the *SLC6A8* mRNA sequence (NM_005629.3). siRNA₁ 5'-GCCGAGAACGGCATCTATAGCGTGT-3' in exon 1; siRNA₂ 5'-GCCTCCTACTACTTCCGTTTCCAAA-3' in exon 9 and siRNA₃ 5'-CCGCTGGTCTGCATGGGCATCTTCA-3' in exon 11-12 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA). Stealth RNAi™ siRNA Duplex Oligoribonucleotide (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) was a scrambled siRNA sequence (scRNA) used as siRNA negative control.

Block-It™ Fluorescent Oligo (50 nmol/L) was used to assess the transfection efficiency, according to the manufacturer's instructions (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA). Visualization of the transfected HUVEC and HBMEC was performed by fluorescence microscopy.

A previous screening assay with the 3 siRNAs and their combinations was carried out in HUVEC, with the purpose of identifying the efficacy of each one. Cells were cultured on gelatine-coated 24-well plates to reach 90% confluence. siRNAs (1 nmol/L) were introduced using Lipofectamine RNAiMAX, according to the manufacturer's instructions (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA). After 6 h of transfection, free-serum culture medium was replaced by M-199/20% FBS. After 48h, cells were trypsinized and stored at -80°C until analysis. Cells treated only with Lipofectamine RNAiMAX were used as mock cells. Experiments were performed in triplicate.

The most effective siRNA combination was used in the subsequent experiments, in which we aimed to know the optimal timing of mRNA and protein inhibition. HUVEC and HBMEC were cultured on gelatine-coated 6-well plates, and were transfected every 3 days for a total of 12 days, as was described above. After 48h of each transfection, cells were trypsinized and stored at -80°C until their analysis by RT-PCR and ELISA. Experiments were performed in duplicate in two independent experiments.

mRNA isolation, cDNA synthesis and RT-PCR

Total RNA from HUVEC and HBMEC pellets were extracted using the QIAshredder Kit and RNeasy mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). cDNA was synthesized from total RNA with random primers using M-MLV reverse transcriptase RNAase H Minus (Promega, Madison, WI). 1 µL of cDNA (200ng/mL) was amplified by RT-PCR with

1X TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and 20X TaqMan® Gene Expression Assay Mix. The reaction was performed in the RT-PCR StepOnePlus™ Real Time PCR System (Applied Biosystems) with the following cycling conditions: 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s, and 60°C for 1 min. Quantification was performed in triplicate, and normalized with GAPDH as endogenous control (Human GAPD (GAPDH) Endogenous Control) (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Measurement of CRTR by ELISA

HUVEC and HBMEC pellets were resuspended in 80 µL of lysis buffer (1% Triton X-100, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8), 150 mmol/L NaCl, 0.1% sodium dodecyl sulphate (SDS), 1 mmol/L PMSF, 2 µg/mL aprotinin, 8 µg/mL leupeptin and 5 mmol/L EDTA). Then, cells were sonicated and centrifuged during 10 min at 14,000 g at 4°C. The supernatant was used to measure CRTR and total protein concentration. Measurement of protein concentration was based on Lowry method using Kit DC Protein Assay (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA), which was carried out per triplicate in 96-well plates and quantification was performed in the POLARstar Omega plate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). Total protein for each sample was adjusted to 0.15 µg/µL and CRTR concentration was determined using a specific ELISA kit, according to the manufacturer's instructions (USCN Life Sciences Inc., Wuhan, China).

Cr uptake assay

HUVEC and HBMEC were cultured on gelatin-coated 6-well plates and transfected as was previously described. After each time of siRNA transfection (every 3 days for a total of 12 days), cells were incubated with Cr monohydrate (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) at different concentrations (0, 25 and 500 µmol/L) [4] at 37°C under 5% CO₂. After 24 h, cells were trypsinized, washed with saline solution and pellets were stored at -80°C until analysis. The assay was performed in duplicate in two independent experiments.

Cr transport kinetics analysis

HUVEC and HBMEC were cultured on gelatin-coated dishes. Cells were incubated with Cr-d₃ monohydrate supplemented medium (CDN Isotopes, Quebec, Canada) at

different concentrations (15, 30 200, 500 and 1000 $\mu\text{mol/L}$ in HUVEC, and 5, 10, 15, 25, 50, 100, 250 and 500 $\mu\text{mol/L}$ in HBMEC) for 30 min. Then, dishes were washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) to stop the transport reaction, followed by trypsinization. Cells were washed twice with saline solution and pellets were stored at -80°C until analysis.

PCr-Mg-CPLX, CrOBzl, Au-HC-NPs and precursors of Cr

PCr-Mg-CPLX, CrOBzl and Au-HC-NPs were provided by Dr. M. Balestrino from Department of Neuroscience, Ophthalmology and Genetics, University of Genova, Italy. Each compound was dissolved in DMEM or M-199 at 25 and 500 $\mu\text{mol/L}$ concentration. Stable-isotope-labelled substrates (L-Arg:HCl (Guanido- $^{15}\text{N}_2$) and ($[\text{U}^{13}\text{-C}_2, ^{15}\text{N}]$ Glycine)) (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover, USA) were prepared together at 10 mmol/L in DMEM or M-199.

Cellular uptake studies of PCr-Mg-CPLX, CrOBzl, Au-HC-NPs and precursors of Cr

Uptake studies were performed in 6-well plates in CRTR deficient patients' and control fibroblasts; in iPS cells generated from patient 1 (P1) and patient 3 (P3) and control iPS cells; and in HUVEC and HBMEC (both previously transfected with siRNA and scRNA). Cells were incubated with PCr-Mg-CPLX, CrOBzl and Au-HC-NPs solutions (25 and 500 $\mu\text{mol/L}$), and the Cr amino acid precursors (10 mmol/L). Cr monohydrate (25 and 500 $\mu\text{mol/L}$) was used as control treatment uptake. After 24 h, cells were trypsinized, washed twice with saline solution and pellets were stored at -80°C until analysis. The assay was performed in duplicate in two independent experiments.

Quantitative measurement of the intracellular Cr content by HPLC-ESI-MS/MS

Fibroblasts, iPS cells, HUVEC and HBMEC pellets were resuspended in 80 μL of saline solution, sonicated and centrifuged at 8,800 g at 4°C for 5 min. 50 μL of the supernatant was used to measure the intracellular Cr content by HPLC-ESI-MS/MS (Waters-Micromass Manchester, UK, model Quatro microTM API) as was previously described [26]. An aliquot of the supernatant was taken for protein measurement. Results were expressed as pmol Cr/ μg protein.

Quantitative measurement of intracellular L-arginine and glycine content by UHPLC-UV

The measurement of intracellular L-arginine and glycine was performed using MassTrak AAA Derivatization Kit (Waters Corporation, USA) and analyzed by UHPLC system (Shymadzu, USA). Results were expressed as μmol arginine or glycine/g protein.

MTT Cell Viability Assay

Cell viability assay was performed after transfection experiments, and after each treatment in 96-well microplates. After incubation of each experiment, medium was removed and cells were washed with PBS. Then, cells were incubated with 100 μL of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) solution (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) in PBS (0.5 mg/mL) for 3 h. The MTT-purple formazan products were dissolved in dimethyl sulfoxide and optical densities of the solutions were measured by absorbance at 570 nm in the POLARstar Omega plate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). Cells treated with SDS 0.02% were considered as positive control. Cell viability was expressed as percentage of the treated cells respect to the untreated cells. Experiments were performed in triplicate.

Data analysis

Data analysis and graphs were generated using Microsoft Excel and Graphpad Prism 6.0.

Results and discussion

Cr plays an essential role in cellular energy homeostasis in most tissues particularly in brain. Cr is taken up by cells by means of a specific transporter, CRTR [1-3]. Therefore, patients with mutations in CRTR have low cellular Cr content due to the impairment of its transport [4-8]. Brain Cr deficiency results in a severe brain malfunction [4-8], and treatment with exogenous Cr results ineffective [9-14]. Cr is a highly polar molecule that is not able to cross the BBB [16] in the absence of the transporter [15]. Accordingly, the synthesis of more lipophilic compounds able to cross the BBB in a

transporter-independent way might be of help to treat this disease. In the last years, several Cr derivatives have been reported to be good candidates for this purpose [17]. Studies in mouse brain slices indicated that PCr-Mg-CPLX and CrOBzl might be incorporated into the cell in a CRTR independent way, as the intracellular Cr content increased after treatment with these compounds [17]. Based on these data, we aimed to assay the cellular uptake of these compounds in human cell lines. For this approach, we used fibroblasts from three patients with CRTR deficiency, and iPS cells generated from two of these patients' fibroblasts. Validation of both, fibroblasts and iPS cells were performed according to established methods of Cr uptake (Supplemental Fig. 1). We also used HUVEC and HBMEC (both with silenced SLC6A8) as *in vitro* models of vascular endothelium and BBB respectively [20-22].

SLC6A8 silencing in HUVEC and HBMEC

The preliminary siRNAs screening assay performed in HUVEC showed a reduction of the *SLC6A8* mRNA levels upper to 90% in all siRNAs' combinations, compared with mock cells. On the contrary, transfection with scRNA did not show any effect (Fig. 1A). Therefore, we used a pool of the three siRNAs for the subsequent transfection studies.

Transfection was successfully confirmed by fluorescent microscopy in HUVEC and HBMEC (Fig.1B). Cell viability was higher than 80% in all cases (Fig. 1C and 1D), compared with mock cells. The inhibition of the *SLC6A8* mRNA expression was more than 90 % at all transfection times (Fig. 1E and 1F) and the lowest levels of protein were observed at 9 days, after 3 transfections; HUVEC showed 20% reduction and HBMEC 40% (Fig. 1G and 1H).

The siRNA silencing efficacy was also confirmed by Cr uptake assay. Cellular uptake of Cr at 25 and 500 $\mu\text{mol/L}$ was reduced at all times of transfection studied (22-77% of reduction in HUVEC and 38-77% in HBMEC) (Fig. 1I and 1J).

Therefore, we achieved an *in vitro* model of human vascular endothelium and BBB for the CRTR deficiency.

Cellular uptake of PCr-Mg-CPLX, CrOBzl, Au-HC-NPs in different cell lines

Uptake experiments with different Cr derivatives (PCr-Mg-CPLX, CrOBzl and Au-HC-NPs) in CRTR deficient patients' fibroblasts showed a slight increase of intracellular Cr content with all treatments, compared with untreated cells (Fig. 2). These findings are very similar to those previously reported [17]. It is to note that after the addition of PCr-Mg-CPLX, the highest increase of Cr concentration was in patient 1 (P1) (4-fold and 13-fold after the addition of 25 and 500 $\mu\text{mol/L}$ respectively). On the contrary, patient 2 (P2) and patient 3 (P3) did not show any increase (Fig. 2B). Concerning CrOBzl, only P1 showed 4-fold increase of Cr content at 25 and 500 $\mu\text{mol/L}$ (Fig. 2C). Regarding Au-HC-NPs, a 2-fold increase was observed in all three patients after the addition of 500 $\mu\text{mol/L}$ (Fig. 2D). Nevertheless, all the increases observed after these treatments were lower than those observed with Cr monohydrate treatment (Fig. 2A).

Results in iPS cells were similar to those found in fibroblasts, showing the highest Cr content in iPS cells of P1 (a 13-fold increase after PCr-Mg-CPLX treatment, and a 3-fold increase after CrOBzl and Au-HC-NPs, at 500 $\mu\text{mol/L}$ concentration of each compound). In iPS cells of P3, the increase of Cr content was only of 6-fold with PCr-Mg-CPLX and 2-fold with Au-HC-NPs. However, similarly to fibroblasts, these increments were not higher than those observed after Cr monohydrate treatment (Fig. 2E-2H).

In silenced HUVEC (Fig. 2I-2L) and HBMEC (Fig. 2M-2P) cell lines, treatment with each of the three Cr derivatives resulted in a mild intracellular Cr increase, around 1-fold (at 500 $\mu\text{mol/L}$) respect to untreated cells, but a similar increase was observed under Cr monohydrate treatment.

Treatment with PCr-Mg-CPLX, CrOBzl and Au-HC-NPs did not alter the cellular viability neither in control fibroblasts (Supplemental Fig. 2A) nor in untransfected HBMEC (Supplemental Fig. 2B), being upper than 90% in all cases.

Given the previous discouraging uptake results, we analyzed the aqueous solutions of PCr-Mg-CPLX and CrOBzl by HPLC-ESI-MS/MS. The selective ion recording (SIR) chromatograms showed higher percentages of Cr and creatinine. Specifically, the composition of PCr-Mg-CPLX was of 81% of Cr, 17% of creatinine and 1.5% of intact

PCr-Mg-CPLX (Supplemental Fig. 3A), and that of CrOBzl was 76% of Cr, 24% of creatinine and 0.4% of intact CrOBzl (Supplemental Fig. 3B). Therefore, our results could be influenced by the quick hydrolysis of PCr-Mg-CPLX and CrOBzl to Cr and creatinine in aqueous solution. According to this, Lunardi et al [17] also demonstrated that CrOBzl was degraded to creatinine and benzyl alcohol.

Concerning Au-HC-NPs, it is unknown if aggregation in the medium occurred since transmission electron microscopy was not available in our laboratory to visualize this compound; neither we could observe its delivery, uptake and cellular trafficking as Au-HC-NPs has not any fluorescent tag. We followed the recommendations provided by Dr. Balestrinos' group.

It is worth to mention that treatment with low and high concentrations of Cr monohydrate in HUVEC and HBMEC did not correlate with a proportional increase of intracellular Cr and also showed variability in the different Cr uptake assays (Fig. 1I and 1J). Due to these results, we proposed to study the kinetics of the CRTR in these cell lines. The assay showed saturable kinetics, following the Michaelis-Menten equation (Supplemental Fig. 4). Using Lineweaver-Burk linearization, the estimated K_m and V_{max} were 44.74 $\mu\text{mol/L}$ and 0.025 pmol/ug protein/min respectively in HUVEC (Supplemental Fig. 4A); and 53.25 $\mu\text{mol/L}$ and 0.0024 pmol/ug protein/min respectively in HBMEC (Supplemental Fig. 4B). Therefore, CRTR in the vascular endothelium and BBB could have a controlled regulation and could explain the low uptake observed at high Cr concentrations (Fig. 1I and 1J; Fig. 2I and 2M). On the contrary, cultured fibroblasts showed a marked increase of the intracellular Cr after the addition of high Cr concentrations into the media (Fig. 2A), that might be due to the passive transport of Cr, as has been previously suggested [4], apart from the saturable transport of Cr by CRTR that has been also described in fibroblasts with a K_m around 35 $\mu\text{mol/L}$ [27].

Cellular uptake of L-arginine and glycine

Leuzzi et al., [19] described that Cr was synthesised in lymphoblasts from their precursors: arginine and glycine. Our aim was to corroborate this observation in controls and CRTR deficient patients' fibroblasts, iPS cells (generated from these patients' fibroblasts), and silenced HUVEC and HBMEC using labelled precursors of Cr (L-Arg:HCl (Guanido- $^{15}\text{N}_2$)) and ($^{13}\text{C}_2$, ^{15}N] Glycine). Results showed absence of

Cr synthesis in all type of cells. Based on these data, we wanted to confirm if the entrance of these substrates really took place. The uptake assay of Cr precursors in control fibroblasts showed an increase of the intracellular content of arginine (2-fold) (Fig. 3A) and glycine (3-fold) (Fig. 3B), compared with the untreated cells. In transfected HUVEC (Fig. 3C) and HBMEC (Fig. 3E) a slight or absent increase of the intracellular content of arginine was observed, while an increase around 1.5-fold was noticed in the intracellular glycine concentration (Fig. 3D and 3F). These results could be explained by the different kinetic characteristics of the tissue-depending amino acid transporters. L-arginine can be transported by systems y^+ , y^+L , b^{0+} and B^{0+} [28]. The systems y^+ and y^+L have been reported in human fibroblasts with a saturable component ($K_m=0.02-1$ mmol/L) and a non-saturable component (at concentrations >1 mmol/L) [29-31]; maybe the non-saturable would explain the higher entry of L-arginine in these cells. In endothelial cells the systems y^+ ($K_m=100-200$ $\mu\text{mol/L}$), y^+L ($K_m=1-40$ $\mu\text{mol/L}$) and b^{0+} ($K_m=3-4$ mmol/L) have been described [32-35], while in BBB, system y^+ has been found with a saturable component ($K_m=30-100$ $\mu\text{mol/L}$) [35-37]. These findings could explain the lower entry of arginine shown in HUVEC and HBMEC.

The glycine transport is different in human fibroblasts (by system A, $K_m= \sim 1\text{mmol/L}$) [38] than in BBB (by system ASC) [37], and glycine flux into the brain is highly regulated as it acts as neurotransmitter. System ASC is expressed in the abluminal membrane [36] of BBB but not in the luminal side, what allows an efflux of glycine from brain to the blood. The intake of glycine from blood to the brain would seem to be due to a passive diffusion [39-40] or could be synthesized from L-serine [41-42]. In addition, other transports in neurons have been described (GLYT1 and GLYT2) [43]. These features could explain the higher entry of glycine in fibroblasts compared to HUVEC and HBMEC cell lines.

Another aspect to take into account is the presence of the enzymes involved in the Cr synthesis (AGAT and GAMT). AGAT enzyme is predominantly expressed in liver, kidney and pancreas, while GAMT has been found in skeletal muscle, liver, heart and kidney [44]. Low amounts of both enzymes have been also described in brain [45], although they are rarely co-expressed within the same cell [46]. In fibroblasts, GAMT expression is low (Fons et al 2008), and maybe it is also low in endothelial cells, what would be in agreement with the absence of Cr synthesis found in our work. Such results would be in accordance with other reports in which no changes in cerebral Cr peak were

observed in patients with CRTR deficiency who received Cr precursors [24, 47-48]. Oppositely, other authors have reported an increase of brain Cr after their administration in some patients [49-52]. These contradictory data would question the effectiveness of this treatment and further studies would be necessary.

Conclusions

Treatment with PCr-Mg-CPLX, CrOBzl and Au-HC-NPs, or the precursors of Cr in fibroblasts and iPS cells of CRTR deficient patients, as well as, in silenced *SLC6A8* HUVEC and HBMEC cells did not show any improvement in the intracellular Cr content, compared with Cr monohydrate treatment. Therefore, these compounds seem to be ineffective to treat CRTR deficiency and further studies would be necessary to find more lipophilic and particularly stable molecules.

Acknowledgments

We thank Dr. Balestrino (Dpt.of Neuroscience, Ophthalmology and Genetics, Univ. Genova, Italy) who provided us the derivatives of Cr. This study was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS, grant number PS09/02128). Dr. Angela Arias was supported by the CIBER of Rare Diseases (CIBERER).

Table 1. Biochemical, molecular and clinical data of 3 patients with CRTR deficiency.
Cr: creatine; Crn: creatinine.

Patient	Age at diagnosis (years)	Cr / Crn	Cr uptake (pmol/μg prot)		Mutation		¹ H-MRS Cr peak	Clinical signs
			25 μmol/L	500 μmol/L	Nucleotide change	Effect on protein		
P1 ^[25]	8	2.4	0.14	2.3	c.1396G>A	p.Gly466Arg	Absent	Behavioral disorders, dystonia, language absence, epilepsy, mental delay.
P2 ^[25]	11	3.2	0.6	4.8	c.462G>A	p.Trp154X	Absent	Mental delay, autism, language delay, epilepsy.
P3 ^[23-24]	9	3.7	2.4	5	c.1631C>T	p.Pro544Leu	Low	Language disorder, hypotonia.
Control	7-12	0.12-1.4	15-50	20-61				

Fig. 1. *SLC6A8* silencing by siRNA in HUVEC and HBMEC cell lines.

(1A) Screening of siRNAs in HUVEC. **(1B)** Transfection efficiency measured by fluorescent microscopy using Block-It™ Fluorescent Oligo. **(1C and 1D)** Cell viability measured by MTT assay. **(1E and 1F)** *SLC6A8* mRNA levels measured by RT-PCR. **(1G and 1H)** CRTR protein measured by ELISA. **(1I and 1J)** Cellular Cr uptake measured by HPLC-ESI-MS/MS.

Cr: creatine; Mock: cells only transfected with the transfection agent (Lipofectamine RNAiMAX); scRNA: scrambled siRNA; SDS: sodium dodecyl sulphate; T: n transfections; UT: untreated. Experiments were performed in two independent experiments in duplicate. Data shown represent the mean \pm SD.

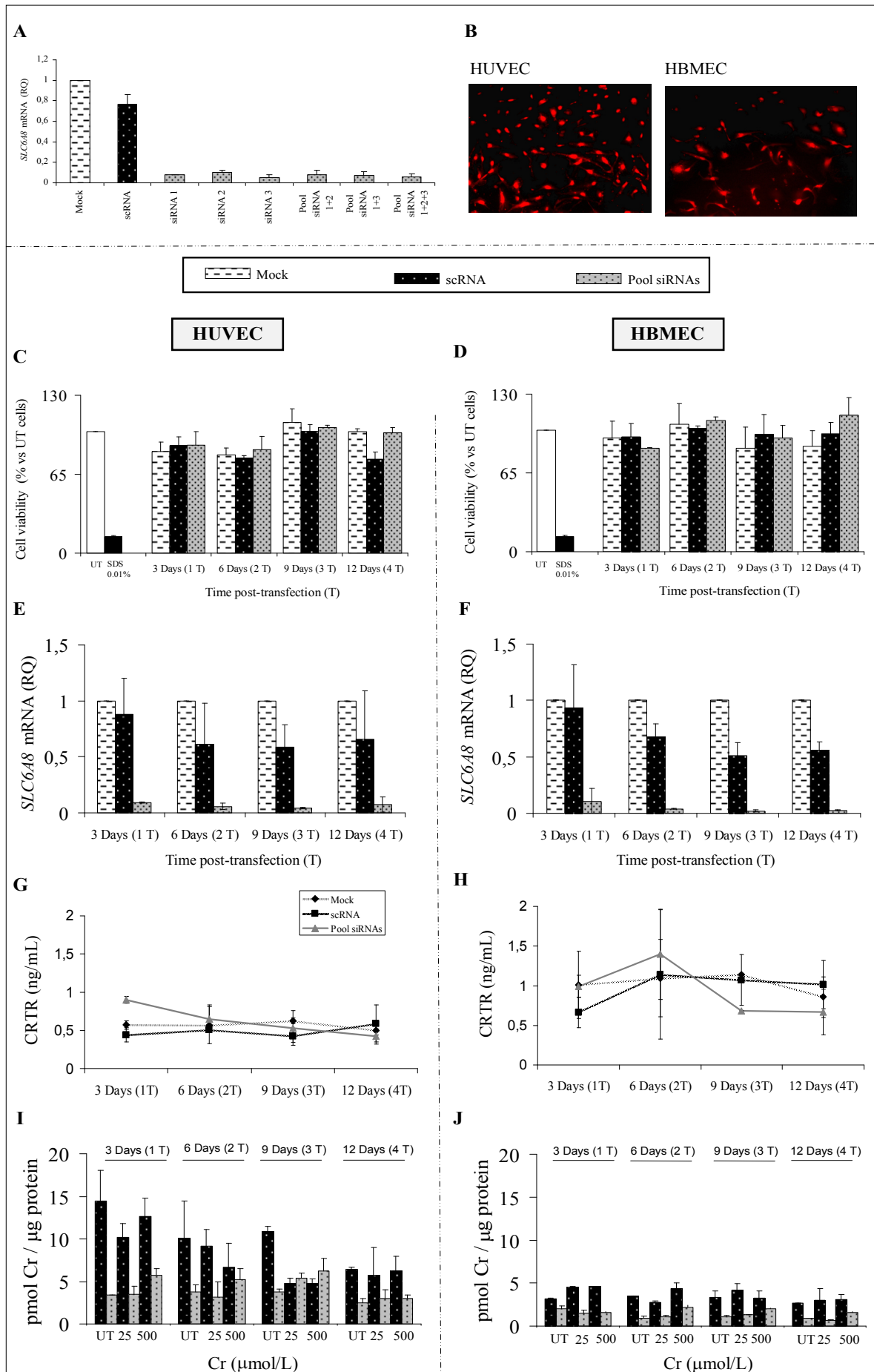


Fig. 2. Cellular uptake of PCr-Mg-CPLX, CrOBzl and Au-HC-NPs.

(2A-2D) Cellular uptake in fibroblasts derived from 3 CRTR deficient patients and control fibroblasts. **(2E-2H)** Cellular uptake in iPS cells obtained from CRTR deficient patients' fibroblasts and control iPS cells. **(2I-2L)** Cellular uptake in transfected HUVEC with siRNA and scRNA. **(2M-2P)** Cellular uptake in transfected HBMEC with siRNA and scRNA.

Cr monohydrate was used as control uptake. Cells were incubated with the corresponding treatments for 24 h at 37°C under 5% CO₂. Intracellular Cr levels were determined by HPLC-ESI-MS/MS. Au-HC-NPs: gold Cr nanoparticles; CF: control fibroblasts; c*iPS*: control iPS; Cr: creatine; Crn: creatinine; CrOBzl: Cr benzyl ester; P: patient; PCr-Mg-CPLX: phosphocreatine-Mg-complex acetate; scRNA: scrambled siRNA; UT: untreated. Experiments were performed in duplicate. Data shown represent the mean±SD.

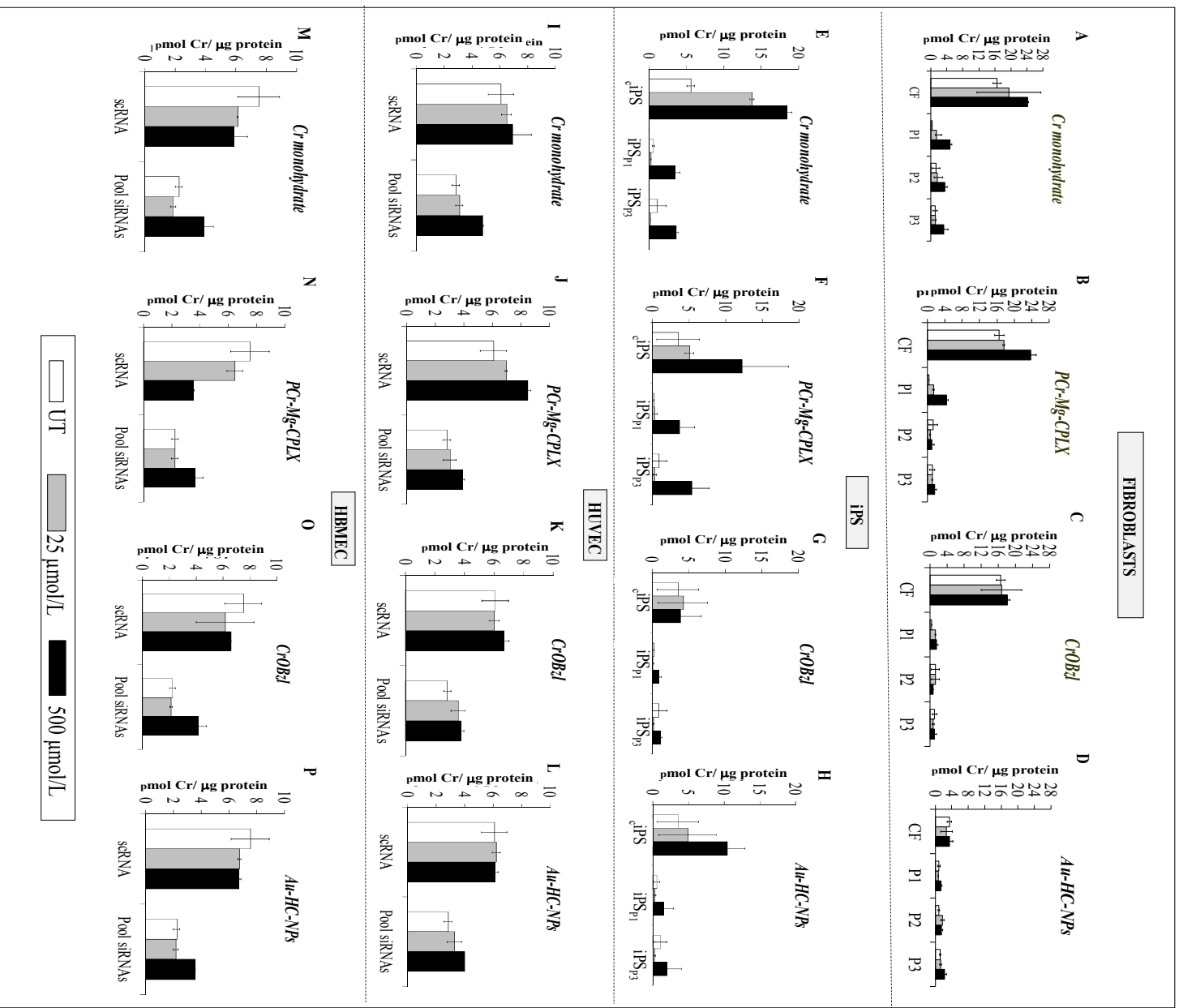
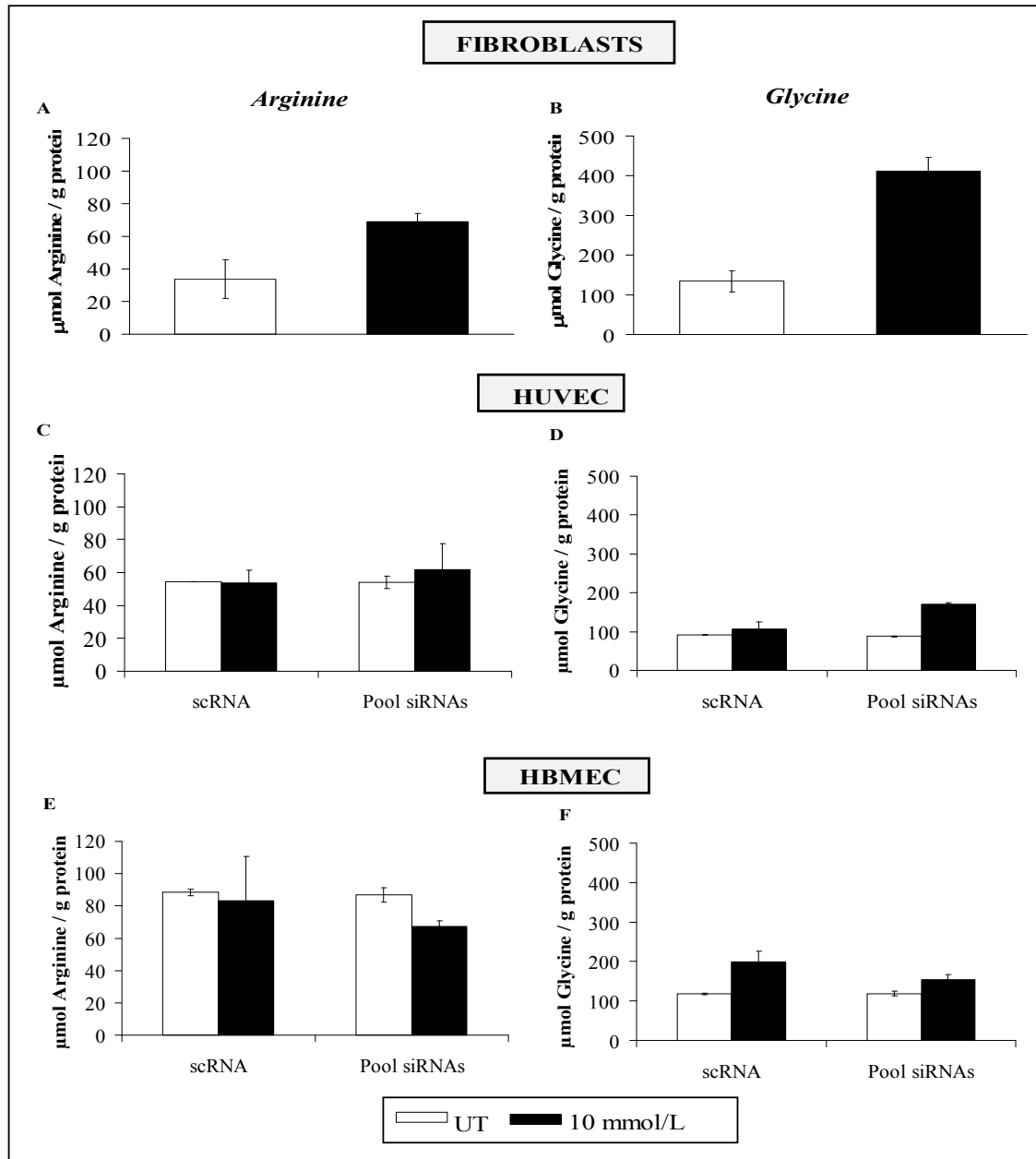


Fig. 3. Arginine and glycine uptake in fibroblasts, HUVEC and HBMEC cell lines.

(3A and 3B) Intracellular arginine and glycine content in control fibroblasts.

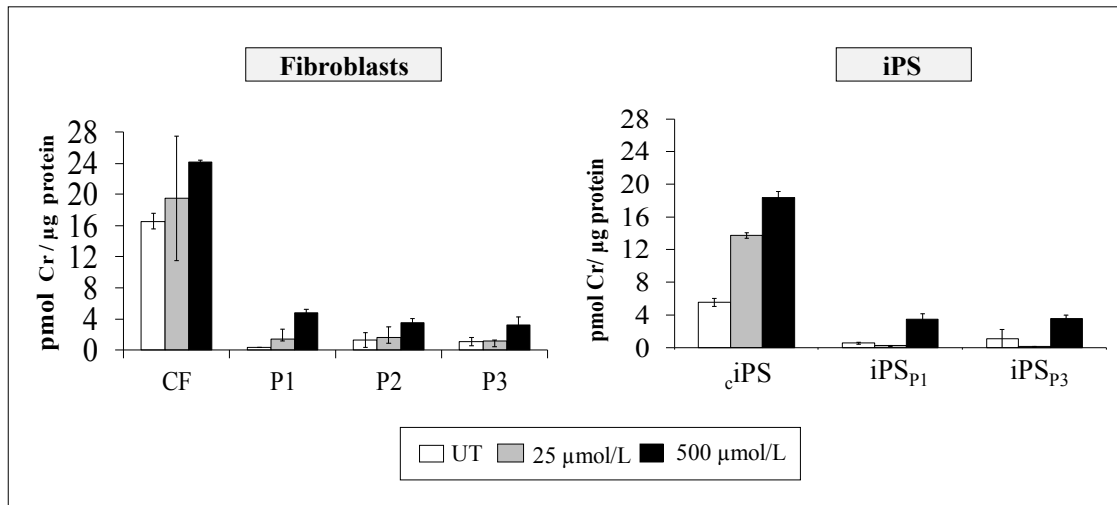
(3C and 3D) Intracellular arginine and glycine content in HUVEC.

(3E and 3F) Intracellular arginine and glycine content in HBMEC.



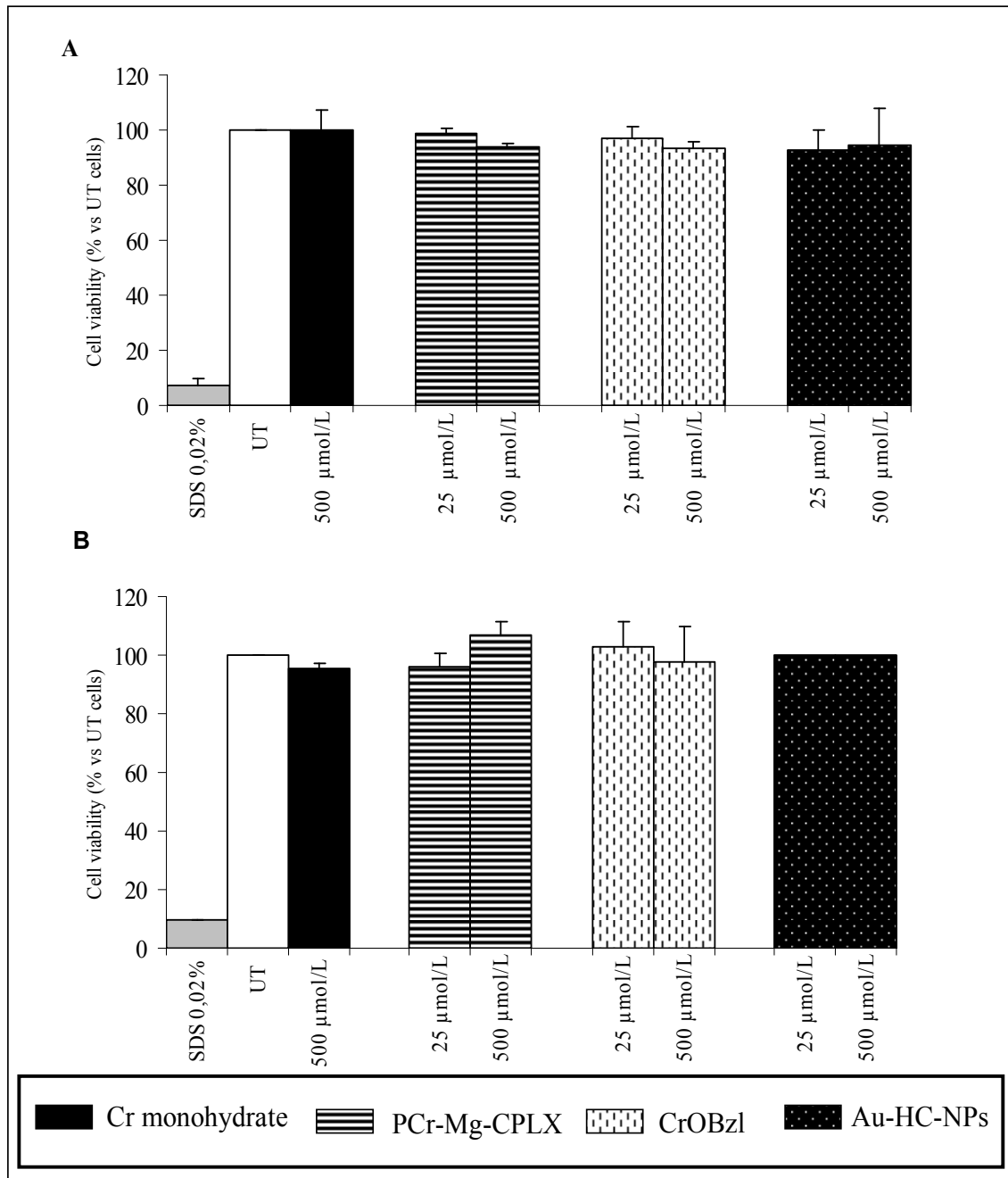
Cell lines were incubated with L-Arg:HCl(Guanido- $^{15}\text{N}_2$) and [$^{13}\text{C}_2$, ^{15}N]Glycine at concentration of 10 mmol/L for 24 h at 37°C under 5 % CO_2 . Arginine and glycine levels were determined by UHPLC-UV. scRNA: scrambled siRNA; UT: untreated. Experiments were performed in two independent experiments in duplicate. Data shown represent the mean \pm SD.

Supplemental Fig. 1. Validation of both fibroblasts and iPS cells lines according to the established methods of Cr uptake.

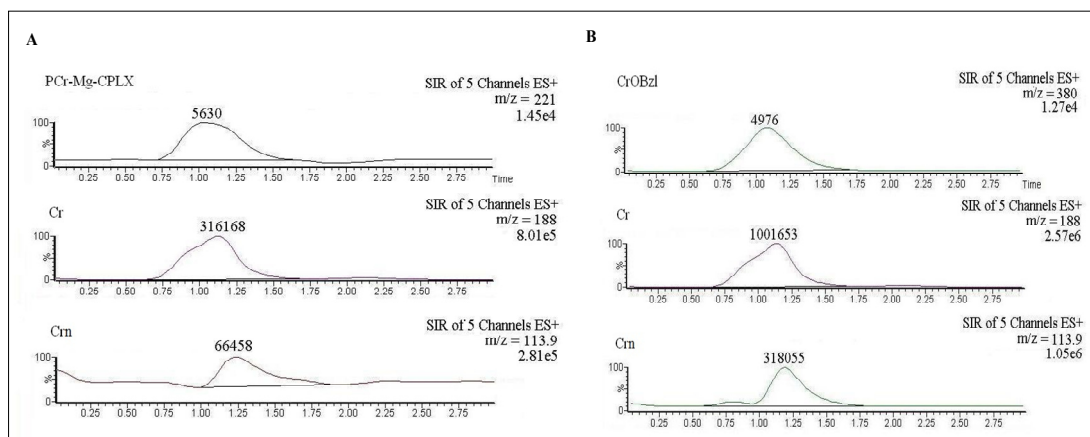


ciPS: control iPS; P: patient; UT: untreated. Experiments were performed in duplicate. Data shown represent the mean±SD.

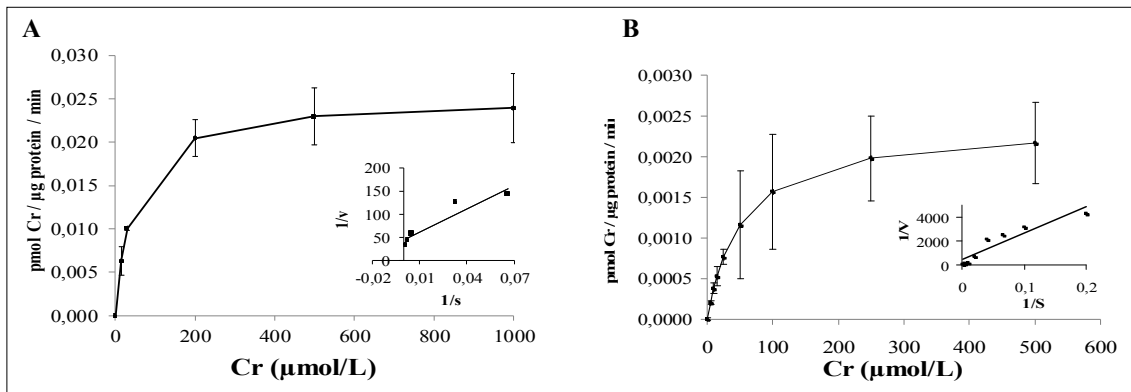
Supplemental Fig. 2. Cell viability after treatment with PCr-Mg-CPLX, CrOBzl and Au-HC-NPs in **(2A)** control fibroblasts and **(2B)** non-transfected HBMEC.



Cells were exposed to 25 and 500 $\mu\text{mol/L}$ of PCr-Mg-CPLX, CrOBzl and Au-HC-NPs for 24 h and cell viability was measured by MTT assay. Au-HC-NPs: gold Cr nanoparticles; Cr: creatine; Crn: creatinine; CrOBzl: Cr benzyl ester; PCr-Mg-CPLX: phosphocreatine-Mg-complex; SDS: sodium dodecyl sulphate; UT: untreated. The experiments were performed in triplicate. Data shown represent the mean \pm SD.

Supplemental Fig. 3. Composition of aqueous PCr-Mg-CPLX and CrOBzl solutions.

Solutions were prepared at 50 $\mu\text{mol/L}$ and analyzed by HPLC-ESI-MS/MS. In the figure it is represented the selected ion recording (SIR) chromatogram for **(3A)** PCr-Mg-CPLX and **(3B)** CrOBzl solutions. Cr: creatine; Crn: creatinine; CrOBzl: Cr benzyl ester; PCr-Mg-CPLX: phosphocreatine-Mg-complex.

Supplemental Fig. 4. Kinetics of Cr transport in **(4A)** HUVEC and **(4B)** HBMEC.

Cells were incubated with Cr-d₃ monohydrate at the concentrations shown for 30 min. The velocity as a function of substrate concentration followed the Michaelis–Menten model. The inset shows Lineweaver-Burk plot of the data used to calculate the V_{max} and k_m . The velocity (v) of creatine uptake was expressed as pmol/ μg protein per min and each point represents the mean \pm SD of the duplicate. Cr: creatine.

References

- [1] J.B. Walker, Creatine: biosynthesis, regulation, and function, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 50 (1979) 177-242.
- [2] M. Wyss, R. Kaddurah-Daouk, Creatine and creatinine metabolism, *Physiol. Rev.* 80 (2000) 1107-1213.
- [3] T. Wallimann, M. Wyss, D. Brdiczka, K. Nicolay, H.M. Eppenberger, Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis, *Biochem. J.* 281 (1992) 21-40.
- [4] G.S. Salomons, S.J. Van Dooren, N.M. Verhoeven, K.M. Cecil, W.S. Ball, T.J. DeGrauw, C. Jakobs, X-linked creatine transporter (*SLC6A8* gene) defect: a new creatine deficiency syndrome, *Am. J. Hum. Genet.* 68 (2001) 1497-1500.
- [5] G.M. Mancini, C.E. Catsman-Berrevoets, I.F. de Coo, F.K. Aarsen, J.H. Kamphoven, J.G. Huijmans, M. Duran, M.S. van der Knaap, C. Jakobs, G.S. Salomons, Two novel mutations in *SLC6A8* cause creatine transporter defect and distinctive X-linked mental retardation in two unrelated Dutch families, *Am. J. Med. Genet. A.* 132 A (2005) 288-295.
- [6] A. Sempere, C. Fons, A. Arias, P. Rodríguez-Pombo, R. Colomer, B. Merinero, P. Alcaide, A. Capdevila, A. Ribes, R. Artuch, J. Campistol, Creatine transporter deficiency in two adult patients with static encephalopathy, *J. Inherit. Metab. Dis.* 32 (2009) Suppl 1:S91-96.
- [7] T.J. deGrauw, K.M. Cecil, A.W. Byars, G.S. Salomons, W.S. Ball, C. Jakobs, The clinical syndrome of creatine transporter deficiency, *Mol. Cell. Biochem.* 244 (2003) 45-48.
- [8] J.M. van de Kamp, O.T. Betsalel, S. Mercimek-Mahmutoglu, L. Abulhoul, S. Grünewald, I. Anselm, H. Azzouz, et al., Phenotype and genotype in 101 males with X-linked creatine transporter deficiency, *J. Med. Genet.* 50 (2013) 463-472.
- [9] K.M. Cecil, G.S. Salomons, W.S. Jr Ball, B. Wong, G. Chuck, N.M. Verhoeven, C. Jakobs, T.J. DeGrauw, Irreversible brain creatine deficiency with elevated serum and urine creatine: a creatine transporter defect?, *Ann. Neurol.* 49 (2001) 401-404.
- [10] A. Bizzi, M. Bugiani, G.S. Salomons, D.H. Hunneman, I. Moroni, M. Estienne, U. Danesi, C. Jakobs, G. Uziel, X-linked creatine deficiency syndrome: a novel mutation in creatine transporter gene *SLC6A8*, *Ann. Neurol.* 52 (2002) 227-231.

- [11] T.J. deGrauw, G.S. Salomons, K.M. Cecil, G. Chuck, A. Newmeyer, M.B. Schapiro, C. Jakobs, Congenital creatine transporter deficiency, *Neuropediatrics*. 33 (2002) 232-238.
- [12] I.A. Anselm, F.S. Alkuraya, G.S. Salomons, C. Jakobs, A.B. Fulton, M. Mazumdar, M. Rivkin, R. Frye, T.Y. Poussaint, D. Marsden, X-linked creatine transporter defect: a report on two unrelated boys with a severe clinical phenotype, *J. Inherit. Metab. Dis.* 29 (2006) 214-219.
- [13] P. Póo-Argüelles, A. Arias, M.A. Vilaseca, A. Ribes, R. Artuch, A. Sans-Fito, A. Moreno, C. Jakobs, G. Salomons, X-Linked creatine transporter deficiency in two patients with severe mental retardation and autism, *J. Inherit. Metab. Dis.* 29 (2006) 220-223.
- [14] M. Dezortova, F. Jiru, J. Petrsek, V. Malinova, J. Zeman, M. Jirsa, M. Hajek, ¹H MR spectroscopy as a diagnostic tool for cerebral creatine deficiency, *MAGMA*. 21 (2008) 327-332.
- [15] S. Ohtsuki, M. Tachikawa, H. Takanaga, H. Shimizu, M. Watanabe, K. Hosoya, T. Terasaki, The blood-brain barrier creatine transporter is a major pathway for supplying creatine to the brain, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22 (2002) 1327-1335.
- [16] L. Perasso, A. Cupello, G.L. Lunardi, C. Principato, C. Gandolfo, M. Balestrino, Kinetics of creatine in blood and brain after intraperitoneal injection in the rat, *Brain Res.* 974 (2003) 37-42.
- [17] G. Lunardi, A. Parodi, L. Perasso, A.V. Pohvozcheva, S. Scardone, E. Adriano, T. Florio, C. Gandolfo, A. Cupello, S.V. Burov, M. Balestrino, The creatine transporter mediates the uptake of creatine by brain tissue, but not the uptake of two creatine-derived compounds, *Neuroscience*. 142 (2006) 991-997.
- [18] J. López-Viota, S. Mandal, A.V. Delgado, J.L. Toca-Herrera, M. Möller, F. Zanuttin, M. Balestrino, S. Krol, Electrophoretic characterization of gold nanoparticles functionalized with human serum albumin (HSA) and creatine, *J. Colloid. Interface Sci.* 332 (2009) 215-223.
- [19] V. Leuzzi, M.G. Alessandri, M. Casarano, R. Battini, G. Cioni, Arginine and glycine stimulate creatine synthesis in creatine transporter 1-deficient lymphoblasts, *Anal. Biochem.* 375 (2008) 153-155.
- [20] H. Vernon, K. Clark, J.P. Bressler, In Vitro Models to study the blood brain barrier, *Methods Mol. Biol.* 758 (2011) 153-168.

- [21] A. Tóth, S. Veszélka, S. Nakagawa, M. Niwa, M.A. Deli, Patented in vitro blood-brain barrier models in CNS drug discovery, *Recent Pat. CNS Drug Discov.* 6 (2011) 107-118.
- [22] I. Wilhelm, C. Fazakas, I.A. Krizbai, In vitro models of the blood-brain barrier, *Acta Neurobiol. Exp.* 71 (2011) 113-128.
- [23] A. Arias, M. Corbella, C. Fons, A. Sempere, J. García-Villoria, A. Ormazabal, P. Poo, M. Pineda, M.A. Vilaseca, J. Campistol, P. Briones, T. Pàmpol, G.S. Salomons, A. Ribes, R. Artuch, Creatine transporter deficiency: prevalence among patients with mental retardation and pitfalls in metabolite screening, *Clin. Biochem.* 40 (2007) 1328-1331.
- [24] C. Fons, A. Sempere, A. Arias, A. López -Salas, P. Poo, M. Pineda, M. Mas, M.A. Vilaseca, G.A. Salomons, A. Ribes, R. Artuch, J. Campistol, Arginine supplementation in four patients with X-linked creatine transporter defect, *J. Inherit. Metab. Dis.* 31 (2008) 724-728.
- [25] P. Alcaide, B. Merinero, P. Ruiz-Sala, E. Richard, R. Navarrete, A. Arias, A. Ribes, R. Artuch, J. Campistol, M. Ugarte, P. Rodríguez-Pombo, Defining the pathogenicity of creatine deficiency syndrome, *Hum. Mutat.* 32 (2011) 282-291.
- [26] A. Arias, A. Ormazabal, J. Moreno, B. González, M.A. Vilaseca, J. García-Villoria, T. Pàmpol, P. Briones, R. Artuch, A. Ribes, Methods for the diagnosis of creatine deficiency syndromes: A comparative study, *J. Neurosci. Methods.* 156 (2006) 305-309.
- [27] O. Ardon, C. Amat di San Filippo, G.S. Salomons, N. Longo, Creatine transporter deficiency in two half-brothers, *Am. J. Med. Genet. A.* 152A (2010) 1979-1983.
- [28] R. Devés, C.A. Boyd, Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function, *Physiol. Rev.* 78 (1998) 487-545.
- [29] U. Groth, L.E. Rosenberg, Transport of dibasic amino acids, cystine, and tryptophan by cultured human fibroblasts: absence of a defect in cystinuria and Hartnup disease, *J. Clin. Invest.* 51 (1972) 2130-2142.
- [30] M.F. White, G.C. Gazzola, H.N. Christensen, Cationic amino acid transport into cultured animal cells. I. Influx into cultured human fibroblasts, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 4443-4449.

- [31] V. Dall'Asta, O. Bussolati, R. Sala, B.M. Rotoli, G. Sebastio, M.P. Sperandeo, G. Andria, G.C. Gazzola, Arginine transport through system y^+L in cultured human fibroblasts: normal phenotype of cells from LPI subjects, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 279 (2000) C1829-1837.
- [32] O. Bussolati, R. Sala, A. Astorri, B.M. Rotoli, V. Dall'Asta, G.C. Gazzola, Characterization of amino acid transport in human endothelial cells, *Am. J. Physiol.* 265 (1993) C1006-1014.
- [33] Y. Arancibia, L. Sobrevia, Transport of L-arginine mediated by system y^+L in human fetal endothelial cells, *J. Physiol.* 517P (1999) 47P.
- [34] R. Sala, B.M. Rotolo, E. Colla, R. Visigalli, A. Parolari, O. Bussolati, G.C. Gazzola, V. Dall'Asta, Two-way arginine transport in human endothelial cells: TNF- α stimulation is restricted to system y^+ , *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 282 (2002) C134-143.
- [35] G.E. Mann, D.L. Yudilevich, L. Sobrevia, Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells, *Physiol. Rev.* 83 (2003) 183-252.
- [36] R.A. Hawkins, R.L. O'Kane, I.A. Simpson, J.R. Viña, Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids, *J. Nutr.* 136(1 Suppl) (2006) 218S-26S.
- [37] R.L. O'Kane, J.R. Viña, I. Simpson, R. Zaragoza, A. Mokashi, R.A. Hawkins, Cationic amino acid transport across the blood-brain barrier is mediated exclusively by system y^+ , *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291 (2006) E412-419.
- [38] J.C. Kelly, E.F. Otto, R.E. Hillman, Glycine transport by human diploid fibroblasts--absence of a defect in cells from patients with nonketotic hyperglycinemia, *Pediatr. Res.* 13 (1979) 127-130.
- [39] B.V. Zlokovic, D.J. Begley, D.G. Chain, Blood-brain barrier permeability to dipeptides and their constituent amino acids, *Brain Res.* 271 (1983) 65-71.
- [40] K. Hosoya, A. Yamamoto, S. Akanuma, M. Tachikawa, Lipophilicity and transporter influence on blood-retinal barrier permeability: a comparison with blood-brain barrier permeability, *Pharm. Res.* 27 (2010) 2715-2724.
- [41] S. Furuya, M. Watanabe, Novel neuroglial and gliogial relationships mediated by L-serine metabolism, *Arch. Histol. Cytol.* 66 (2003) 109-121.
- [42] J.H. Yang, A. Wada, K. Yoshida, Y. Miyoshi, T. Sayano, K. Esaki, M.O. Kinoshita, S. Tomonaga, N. Azuma, M. Watanabe, K. Hamase, K. Zaitzu, T. Machida, A. Messing, S. Itohara, Y. Hirabayashi, S. Furuya, Brain-specific *Phgdh* deletion

reveals a pivotal role for L-serine biosynthesis in controlling the level of D-serine, an N-methyl-D-aspartate receptor co-agonist, in adult brain, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 41380-41390.

[43] C. Aragón, B. López-Corcuera, Structure, function and regulation of glycine neurotransmitters, *Eur. J. Pharmacol.* 479 (2003) 249-262.

[44] K. Von Figura, F. Hanefeld, D. Isbrandt, S. Stöckler-Ipsiroglu, Guanidinoacetate methyltransferase deficiency, in: C. Scriver, A. Beaudet, W. Sly, D. Valle (Eds.), *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw-Hill Company, United States, 2001, pp .1897-1908.

[45] O. Braissant, H. Henry, M. Loup, B. Eilers, C. Bachmann, Endogenous synthesis and transport of creatine in the rat brain: an in situ hybridization study, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 86 (2001) 193-201.

[46] O. Braissant, E. Béard, C. Torrent, H. Henry, Dissociation of AGAT, GAMT and SLC6A8 in CNS: relevance to creatine deficiency syndromes, *Neurobiol. Dis.* 37 (2010) 423-433.

[47] V. Valayannopoulos, N. Boddaert, A. Chabli, V. Barbier, I. Desguerre, A. Philippe, A. Afenjar, M. Mazzuca, D. Cheillan, A. Munnich, Y. de Keyzer, C. Jakobs, G.S. Salomons, P. de Lonlay, Treatment by oral creatine, L-arginine and L-glycine in six severely affected patients with creatine transporter defect, *J. Inherit. Metab. Dis.* 35 (2012) 151-157.

[48] J.M. van de Kamp, P.J. Pouwels, F.K. Aarsen, L.W. ten Hoopen, D.L. Knol, J.B. de Klerk, I.F. de Coo, J.G. Huijmans, C. Jakobs, M.S. van der Knaap, G.S. Salomons, G.M. Mancini, Long-term follow-up and treatment in nine boys with X-linked creatine transporter defect, *J. Inherit. Metab. Dis.* 35 (2012) 141-149.

[49] A. Chilosi, V. Leuzzi, R. Battini, M. Tosetti, G. Ferretti, A. Comparini, M. Casarano, E. Moretti, M.G. Alessandri, M.C. Bianchi, G. Cioni, Treatment with L-arginine improves neuropsychological disorders in a child with creatine transporter defect, *Neurocase.* 14 (2008) 151-161.

[50] A. Chilosi, M. Casarano, A. Comparini, F.M. Battaglia, M.M. Mancardi, C. Schiaffino, M. Tosetti, V. Leuzzi, R. Battini, G. Cioni, Neuropsychological profile and clinical effects of arginine treatment in children with creatine transport deficiency, *Orphanet J. Rare Dis.* 7 (2012) 43.

[51] S. Mercimek-Mahmutoglu, M.B. Connolly, K.J. Poskitt, G.A. Horvath, N. Lowry, G.S. Salomons, B. Casey, G. Sinclair, C. Davis, C. Jakobs, S. Stockler-

Ipsiroglu, Treatment of intractable epilepsy in a female with SLC6A8 deficiency, *Mol. Genet. Metab.* 101 (2010) 409-412.

[52] J.M. van de Kamp, P.J. Pouwels, F.K. Aarsen, L.W. ten Hoopen, D.L. Knol, J.B. de Klerk, I.F. de Coo, J.G. Huijmans, C. Jakobs, M.S. van der Knaap, G.S. Salomons, G.M. Mancini, Long-term follow-up and treatment in nine boys with X-linked creatine transporter defect, *J. Inher. Metab. Dis.* 35 (2012) 141-149.

Artículo 2. Analysis of the Cr/CK/PCr/ATP system in cerebral creatine deficiency syndromes.

Pajares S, Arias A, García-Villoria J, Ribes A.

Artículo en preparación.

RESUMEN

Se ha descrito que la determinación de creatina quinasa (CK) en plasma podría ser un buen marcador de los síndromes de deficiencia de creatina (Cr) cerebral (CCDS). Por ello, nos propusimos estudiar no sólo la actividad CK, sino el sistema energético relacionado con Cr en su conjunto (Cr/CK/Creatina fosfato (CrP)/ATP). Nuestro principal objetivo era el de conocer si estos parámetros serían buenos biomarcadores de las CCDS. En este trabajo se describe en primer lugar la puesta a punto y validación de la metodología para el análisis simultáneo de ATP, ADP, AMP, CrP y Cr mediante cromatografía líquida de alta resolución y ionización por electrospray-acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-ESI-MS/MS). El método obtenido tiene una buena capacidad analítica, con una buena linealidad, recuperación y bajos niveles de límite de detección, límite de cuantificación e imprecisión.

Estos analitos se estudiaron en fibroblastos de 9 pacientes con CCDS (6 pacientes con deficiencia del transportador de creatina (CRTR) y 3 pacientes con deficiencia de s-adenosil-L-metionina:N-guanidinoacetato metiltransferasa (GAMT) y 50 líneas de fibroblastos control. En los pacientes se observaron niveles significativamente elevados respecto a los controles en cuanto a la concentración de ATP (media±SEM: 27.6±2.2 nmol/mg prot vs 19.9±1.1 nmol /mg prot, p=0.0081) y ADP (10.9±0.9 nmol/mg prot vs 8.5±0.4 nmol /mg prot, p=0.0243). Sin embargo, no se encontraron diferencias ni en la concentración de AMP (3.6±0.5 nmol/mg prot vs 3.5±0.4 nmol/mg prot, p=0.6665) ni en la carga de energía celular (ϕ) (0.78± 0.01 vs 0.76± 0.01, p=0.6111). En cuanto a los niveles de CrP y Cr, se obtuvieron valores más bajos en los pacientes que en los controles (CrP: 7.9±3.3 nmol/mg prot vs 11.9±1.2 /mg prot, p=0.0741; Cr: 9.2±1.7 nmol/mg prot vs 11.3±0.5 nmol/mg prot, p=0.0656), de los cuales, los pacientes con deficiencia de CRTR tenían niveles inferiores a los pacientes con deficiencia de GAMT. El estudio de la relación CrP/ATP mostró valores significativamente más bajos en los pacientes que en los controles (0.26±0.09 vs 0.69±0.09, p=0.0081).

Con respecto a la actividad CK en fibroblastos, en su conjunto no se detectaron diferencias significativas entre pacientes y controles (141 ± 78.9 IU/ g prot vs 112.6 ± 73.1 IU/ g prot, $p=0.2926$). Sin embargo, en plasma los niveles de CK fueron más bajos en 2 pacientes con deficiencia de CRTR y en 1 paciente con deficiencia de GAMT, de un total de 4 pacientes analizados.

Este es el primer estudio, en el que se analiza en conjunto cada uno de los marcadores involucrados en el sistema energético de la Cr en pacientes con CCDS. Sin embargo, su utilización como biomarcadores plasmáticos requeriría el estudio de un mayor número de pacientes. En cambio, el análisis individual del contenido de Cr/CrP/ATP en los fibroblastos podría ser útil para la evaluación de la respuesta celular a tratamientos.

Analysis of the Cr/CK/PCr/ATP system in cerebral creatine deficiency syndromes

Pajares S, Arias A, García-Villoria J, Ribes A*.

Sección de Errores Congénitos del Metabolismo-IBC, Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clínic, CIBERER, IDIBAPS, Barcelona, Spain

*Corresponding author: Sección de Errores Congénitos del Metabolismo-IBC, Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clínic, CIBERER, IDIBAPS, Barcelona, Spain

c/ Mejia Lequerica s/n Helios III, 08028 Barcelona, Spain Tel: +0034 932279340 Fax: +0034 932275668.

E-mail address: aribes@clinic.ub.es (Antònia Ribes)

Keywords

Creatine; CRTR; AGAT; GAMT; Creatine transporter deficiency; CCDS; Phosphocreatine; Creatine kinase; ATP; ADP; AMP; HPLC-ESI-MS/MS.

Abbreviations

AGAT: L-arginine: glycine amidinotransferase; CCDS: cerebral creatine deficiency syndromes; CK: creatine kinase; Cr: creatine; CRTR: creatine transporter; CRTR-D: creatine transporter deficiency; FBS: fetal bovine serum; GAMT: guanidinoacetate N-methyltransferase; GAMT-D: guanidinoacetate N-methyltransferase deficiency; PCr: phosphocreatine.

Abstract

Creatine (Cr) is a nitrogenous organic amino acid that plays an important role in the cellular energy homeostasis through creatine kinase (CK) system which becomes Cr in phosphocreatine (PCr). The intracellular pool of Cr is maintained 50% through diet and the remainder is synthesized endogenously by two enzymes, the L-arginine: glycine amidinotransferase (AGAT) and the adenosyl-L-methionine:N-guanidinoacetate methyltransferase (GAMT). Cr is uptaken by the cell through a specific creatine transporter (CRTR). A previous study has shown decreased CK levels in serum from one patient with CRTR deficiency (CRTR-D) and one patient with GAMT deficiency (GAMT-D) suggesting CK as a possible biomarker of the cerebral Cr deficiency syndromes (CCDS). Based on these previous findings, we aimed to study the CK activity in plasma and fibroblasts, and also the Cr/PCr/ATP system in fibroblasts from patients with CRTR-D (n=6) and GAMT-D (n=3). For this purpose, we set up the analysis of adenine nucleotides by HPLC-ESI-MS/MS, and CK activity was also measured using a biochemical autoanalyzer. Plasma CK activity was low in 2 patients with CRTR-D and 1 patient with GAMT-D (of a total of 4 patients analyzed), while no differences were observed in the CK of fibroblasts. Moreover, ATP and ADP content were significantly high in most of the patients, although, no changes were observed in the total cell energy charge (ϕ). A decrease in Cr and PCr concentration was also observed, being lower in patients with CRTR-D than in patients with GAMT-D. In conclusion, plasma CK activity could be a good biomarker of CCDS, and maybe, the individual analysis of Cr/PCr/ATP content in fibroblasts could be useful for the evaluation of cellular response to treatments.

Introduction

Creatine (Cr) is a guanidino compound involved in the cellular energy homeostasis [1]. Cellular Cr content is maintained 50% through diet and the remainder is synthesized endogenously [2]. The synthesis consists of two steps, firstly arginine and glycine is converted to ornithine and guanidinoacetate (GAA) through L-arginine: glycine amidinotransferase (AGAT, EC 2.1.4.1) mostly in kidney, and secondly, S-adenosyl-L-methionine:N-guanidinoacetate methyltransferase (GAMT, EC 2.1.1.2) converts GAA

to Cr using S-adenosylmethionine occurring mostly in liver [3]. Cr is internalized into the cell through a specific transporter, the Cr transporter (CRTR), and is non-enzymatically converted to creatinine which is secreted by the kidney into the urine [3]. Cr exists in the cell both as free Cr and the phosphorylated form, PCr. Intracellular Cr is converted to PCr via creatine kinase (CK). Different CK isoforms exist and each one plays a specific function. Mitochondrial CKs (mtCKs) use ATP to convert Cr to PCr, while cytosolic CKs (cCKs) use PCr to convert ADP into ATP at sites of energy demand, and to convert the excess of ATP to PCr for energy storage [4, 5]. Therefore, the Cr/CK/PCr system is used as an intracellular buffer for ATP synthesis in tissues with high energy requirements such as skeletal muscle and brain [3].

Three inherited disorders of Cr metabolism have been described: GAMT deficiency (GAMT-D, MIM#612736), AGAT deficiency (AGAT-D, MIM#612718) and CRTR deficiency (CRTR-D, MIM#300352), characterized all of them by a decrease in cerebral Cr and known as cerebral Cr deficiency syndromes (CCDS) [6].

Low serum CK was previously described in one patient with CRTR-D and one patient with GAMT-D, suggesting CK as a marker of these disorders [7]. Given these results, we aimed to study CK activity in plasma and fibroblasts, and also the Cr/PCr/ATP system in fibroblasts from patients with CRTR-D and GAMT-D to corroborate these previous findings.

Material and methods

Reagents

ATP, ADP, AMP, PCr, Cr, adenosine- $^{13}\text{C}_{10}$ 5'triphosphate (ATP- $^{13}\text{C}_{10}$, $^{15}\text{N}_5$) and ammonium acetate were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Cr- d_3 was purchased from CDN isotopes (Paris, France). Methanol and acetonitrile were LC/MS PAI grade and were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Milli-Q system (Millipore) purified water was used.

Subjects

Fibroblasts were obtained from 6 children with CRTR-D and 3 patients with GAMT-D genetically confirmed [8-12]. A total of 50 fibroblast cell lines which were referred to our center for metabolic study and were not diagnosed with an inborn error of

metabolism were used as control fibroblasts. EDTA plasma samples were obtained in 2 patients with CRTR-D (patient 2 and 6) and 2 patients with GAMT-D (patient 7 and 8). Biochemical, molecular and clinical data are summarized in Table 1. Plasma samples and skin biopsies were obtained in accordance with the Helsinki Declaration of 1964, as revised in 2000. Informed consent was obtained from the patients' parents.

Cell culture

Fibroblasts were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS), 100 IU/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin at 37°C, 5% CO₂ and 95% humidity until reach to confluence. Cells were harvested with trypsin and pellets were washed twice with saline solution and stored at -80°C until their analysis.

Extraction and HPLC-ESI-MS/MS

The extraction procedure was performed according to Jiang et al. methodology with some modifications [13]. Briefly, cellular pellets were resuspended with 300 µL of pre-cooled water, and were lysed by sonication; 100 µL of the supernatant were mixed with 100 µL of pre-cooled methanol. To the mixture, the internal standards Cr-d₃ and ATP-¹³C₁₀, ¹⁵N₅ were added at the final concentration of 7 µg/mL and 15 µg/mL respectively. The mix was vortexed for 30s and centrifuged during 10 min at 14,000 g at 4°C. The supernatant was transferred to a chromatography vial for direct injection (30 µL) into the high-pressure-liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS) (Waters-Micromass model Quattro micro™ API). The chromatographic separation was performed on a Hypersil™ BDS C₁₈ column (2.1 mmx100mm, 5 µm, Thermo Fisher Scientific, USA). The mobile phase consisted of 2 mmol/L ammonium acetate in water (mobile phase A) and 2 mmol/L ammonium acetate in acetonitrile (mobile phase B), both adjusted with ammonia to pH 10. The flow rate was 0.2 mL/min at isocratic conditions. Mass spectrometer was operated in the electrospray negative ion mode for ATP, ADP, AMP and PCr and positive ion mode for Cr using multiple reaction monitoring (MRM) mode. Nitrogen and argon were used as nebulizing and collision gas, respectively. Dwell time for each transition was 200 ms and the inter-channel delay was 20 ms. Run time was 2.5 min. The following instrumental setting was used: source temperature 120 °C, desolvation temperature

300 °C and capillary voltage 3.5 kV. Data acquisition and data analysis were performed using MassLynx™ (V3.2) software. The quantification of ATP, ADP, AMP and PCr was relative to the internal standard ATP-¹³C₁₀,¹⁵N₅ and Cr relative to Cr-d₃. External calibration curves were used. Results were normalized being relative to the total amount of protein, expressed as nmol of ATP, ADP, AMP, PCr or Cr / mg protein. Cell energy charge (ϕ) was also represented and was calculated as $([ATP]+1/2*([ADP]))/([ATP]+[ADP]+[AMP])$ [14].

Linearity

A stock solution of 1 mg/mL of ATP, ADP, AMP, PCr and Cr in water was prepared. Serial dilutions were prepared at concentrations ranging from 1 to 64 µg/mL of ATP, ADP, AMP, PCr and Cr with added fibroblasts pellet matrix. Standard samples were processed six times and analyzed as samples. Calibration curves were constructed by linear regression analysis of the ratio of ATP, ADP, AMP or PCr/ ATP-¹³C₁₀,¹⁵N₅ areas and Cr/Cr-d₃ areas to the corresponding concentrations.

Limit of detection and quantification

Successive dilutions of ATP, ADP, AMP, PCr and Cr were measured to estimate the limit of detection (LOD) from a signal-to-noise (S/N) ratio of 3 and the limit of quantification (LOQ) from S/N ratio >10. All the analyses were performed in triplicate.

Precision and accuracy

The within-day imprecision (% coefficient of variation, % CV) and accuracy were evaluated by performing 10 analyses of a spiked fibroblasts matrix with standards at concentrations of 1, 8 and 64 µg/mL in the same day. To assess the between-day imprecision and accuracy, spiked fibroblasts matrix with standards (1, 8 and 64 µg/mL) were processed in 6 independent preparations in different days. The accuracy was expressed as the percent relative error (% RE), calculated as mean concentration subtracting the theoretical concentration, divided by the theoretical amount, and multiplied by 100.

Recovery

Recovery was evaluated by adding known amounts of ATP, ADP, AMP, PCr and Cr (8, 16 and 64 µg/mL) to a pooled fibroblasts sample. All the analyses were performed in triplicate.

Determination of CK activity

Fibroblasts pellets were resuspended in 125 µL of lysis buffer (1% Triton X-100, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8), 150 mmol/L NaCl, 0.1% sodium dodecyl sulphate, 1 mmol/L phenylmethanesulfonylfluoride, 2 µg/ml aprotinin, 8 µg/ml leupeptin and 5 mmol/L EDTA) on ice, and were lysed by sonication (three times 5s at standard capacity). Lysates were centrifuged during 10 min at 14,000 g at 4°C.

The supernatant from fibroblasts pellets, as well as, plasma samples were used to measure the CK activity using an Olympus AU 600 biochemical autoanalyser. Analysis was performed with the manufacturer's original reagents (Olympus) and standard method [15].

Protein concentration was measured in the supernatant of fibroblasts by Lowry method using Kit DC Protein Assay (Bio Rad), which was performed per triplicate in 96-well plates and whose quantification was performed in the POLARstar Omega plate reader. CK results were normalized relative to the total amount of proteins.

Statistical analysis

Statistical analysis and graphs were performed using Microsoft Excel and GraphPad Prism 6 software. The reference values of CK, ATP, ADP, AMP, PCr and Cr in fibroblasts were established analyzing 50 control fibroblasts samples. The unpaired nonparametric Mann-Whitney U-test was used to evaluate the significance of differences among different age groups in controls, and between patients and controls. A p-value < 0.05 was considered statistical significant.

Results

Method validation of ATP, ADP, AMP, PCr and Cr assay by HPLC-ESI-MS/MS

The calibration curve for each compound showed a linear regression of $r^2 \geq 0.9972$. The LOD of the assay was 0.25 $\mu\text{g/mL}$ for ATP, ADP and AMP; 0.5 $\mu\text{g/mL}$ for PCr, and 0.024 $\mu\text{g/mL}$ for Cr. The LOQ was 0.5 $\mu\text{g/mL}$ for ATP, ADP and AMP; 1 $\mu\text{g/mL}$ for CrP, and 0.05 $\mu\text{g/mL}$ for Cr. The within-day and between-day imprecision was $<14.1\%$ and $<15\%$ respectively for all analytes. The within-day and between-day accuracy was $<7.6\%$ and $<9.5\%$ respectively. The recovery was $\geq 89.6\%$. The optimized MS parameters are described in Table 2 and all validation data is shown in Table 3.

ATP, ADP, AMP, PCr and Cr content in fibroblasts

Nucleotides content in patients' fibroblasts showed a significant increase in the mean of ATP and ADP concentration compared with control fibroblasts (ATP mean \pm SEM: 27.6 \pm 2.2 nmol/mg prot vs 19.9 \pm 1.1 nmol /mg prot, $p=0.0081$; ADP mean \pm SEM: 10.9 \pm 0.9 nmol/mg prot vs 8.5 \pm 0.4 nmol /mg prot, $p=0.0243$). The concentration of AMP was similar in patients and controls (AMP mean \pm SEM: 3.6 \pm 0.5 nmol/mg prot vs 3.5 \pm 0.4 nmol/mg prot, $p=0.6665$) (Figure 1). No changes were observed in the total cell energy charge (ϕ) (mean \pm SEM: 0.78 \pm 0.01 vs 0.76 \pm 0.01, $p=0.6111$) (Figure 1).

The mean of PCr and Cr concentration were lower in patients compared with control fibroblasts (PCr mean \pm SEM: 7.9 \pm 3.3 nmol/mg prot vs 11.9 \pm 1.2 /mg prot, $p=0.0741$; Cr mean \pm SEM: 9.2 \pm 1.7 nmol/mg prot vs 11.3 \pm 0.5 nmol/mg prot, $p=0.0656$), being more decreased in CRTR deficient patients than GAMT deficient patients (Figure 1).

The PCr/ATP ratio showed significant statistical differences between patients and controls, being lower in patients than in controls (mean \pm SEM: 0.26 \pm 0.09 vs 0.69 \pm 0.09, $p=0.0081$) (Figure 1).

CK activity in plasma and fibroblasts

Plasma CK activity showed reduced levels in 2 patients with CRTR-D (patient 2 and 6) and 1 patient with GAMT-D (patient 8), while other patient with GAMT-D (patient 7) had normal CK levels, compared with age-matched controls (Figure 2).

However, no significant differences were found in the CK activity in fibroblasts (mean \pm SEM: 141 \pm 78.9 IU/ g protein vs 112.6 \pm 73.1 IU/ g protein, p=0.2926) (Figure 2).

Discussion

Cr is a non essential amino acid that plays an important role in the cellular energy metabolism [1]. Cr acts as a supplier of high energy phosphates (ATP) through the CK which converts Cr in PCr. Therefore, the system consisting of Cr/CK/PCr/ATP behaves as a shuttle of energy from sites of energy production at mitochondria to cytoplasmic sites of energy utilization [4, 5]. Inherited metabolism disorders of Cr including AGAT, GAMT and CRTR deficiencies are characterized by a brain Cr deficiency [6], and a previous study has reported low serum CK levels in one patient with CRTR-D and one patient with GAMT-D [7]. Based on these findings, we aimed to evaluate the CK activity in plasma and fibroblasts, and also the Cr/PCr/ATP system in fibroblasts from patients with CCDS. For this purpose we set up the simultaneous analysis of ATP, ADP, AMP, PCr and Cr by HPLC-ESI-MS/MS. Our method showed a good analytical performance, being a rapid assay with a good linearity, recovery and low imprecision in both within-day and between-day results.

The present study analyzed for the first time the overall Cr/CK/PCr/ATP system in fibroblasts from patients with CCDS. Intracellular CK activity did not show significant differences between patients' fibroblasts and control fibroblasts. Nevertheless, in consonance with previous report [7], low plasma CK concentration was found in 2 patients with CRTR-D and 1 patient with GAMT-D, of a total of 4 patients analyzed (Figure 2).

These contradictory results could be explained by the different tissue energy requirements and the different isoforms of CK. The analysis of CK activity performed in our study is based on the measurement of the total CK activity [15, 16]. It has been described that total CK concentration in serum is composed predominantly by CK-MM (mostly expressed in skeletal and cardiac muscle), followed by CK-MB (expressed in cardiac muscle) in lower percentages (1-3%), and rarely CK-BB (expressed in brain) [15, 17].

Based on this evidence, it would be assumable to think that the reduction of plasma CK activity observed in CCDS mainly would be a reflection of a possible alteration of CK-

MM. On the contrary, normal CK in fibroblasts, maybe would be due to the low energy requirements of this tissue.

In accordance with previous studies [6], fibroblasts from patients with CCDS had low intracellular PCr and Cr concentration, being more reduced in CRTR deficient patients than in patients with GAMT-D. Interestingly, the ATP and ADP content were high in these patients, in spite of the low PCr and Cr levels, and the normal CK activity in fibroblasts. Analyzing all these data, a possible explanation to this situation would be the following: the substrate, Cr, is low in CRTR-D and GAMT-D, due to the defects in the transport and synthesis of Cr respectively, so the production of its phosphorylated product (PCr) is limited resulting in low PCr content, in spite of having a normal CK activity. In response to this event, the different cellular mechanisms of ATP production would be activated in order to supply energy to the cell, what would explain the high levels of ATP and ADP levels observed in patients' fibroblasts.

In conclusion, plasma CK activity could be a good biomarker of CCDS better than CK activity in fibroblasts. Moreover, the individual analysis of Cr/PCr/ATP content in fibroblasts maybe could be useful for the evaluation of cellular response to treatments.

Acknowledgments

This study was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS, grant number PS09/02128). Dr. Angela Arias was supported by the CIBER of Rare Diseases (CIBERER).

Table 1. Biochemical, molecular and clinical data of 6 patients with CRTR-D and 3 patients with GAMT-D.

Patient ^a	Diagnosis	Age of diagnosis	Urine Cr (Cr / Crn)	Cr uptake (pmol Cr / μ g protein)		Plasma GAA (μ mol/L)	GAMT activity (pmol GAA/h*mg protein)	¹ H-MRS Cr peak	Mutation ^c	Effect on protein	Clinical symptoms
				25 μ mol/L	500 μ mol						
p1 ^[8]	CRTR-D	11 months	3.2	0.6	4.8	-	-	Absent	c.462G>A	p.Trp154*	Mental delay, autism, language delay, epilepsy.
p2 ^[9, 10]	CRTR-D	7 years	6.8	2.4	5	-	-	Low	c.1631C>T	p.Pro544Leu	Mild mental delay, expressive language disorder, hypotonia, normal gross and fine motor function.
p3 ^[8]	CRTR-D	8 years	2.4	0.14	2.3	-	-	NA	c.1396G>A	p.Gly466Arg	Motor and mental delay, ataxia, dystonia, seizures, behavioral disorders, bilateral parietal atrophy.
p4 ^[9, 10]	CRTR-D	9 years	6.8	0.04	4.8	-	-	Absent	c.942_944delCTT	p.Phe315del	Mental delay, seizures, autism, psychosis.
p5 ^[8]	CRTR-D	9 years	2.6	2.4	7.8	-	-	Absent	c.1079_1081delTCT	p.Phe360del	NA
p6 ^[8]	CRTR-D	17 years	2.7	0.14	6.1	-	-	Absent	c.1222_1224delTTC	p.Phe408del	Mental delay, seizures, autism.
p7 ^[8]	GAMT-D	11 years	-	-	-	23.5	5.8	Absent	NA	NA	Severe language delay, cognitive deficit.
p8 ^[8]	GAMT-D	11 years	-	-	-	12	3.7	Absent	c.[145delT]+[145delT]	p.[Tyr49fs]+[p.Tyr49fs]	Motor and mental delay, myoclonus.
p9 ^[8]	GAMT-D	45 years	-	-	-	18	4.1	Absent	c.[316C>T]+[407C>T]	p.[Gln106*]+[p.Thr136Met]	Mental delay, epilepsy.
Control ^b			0.01-1.6 ^[11] (\leq 6 years; 0.02-1.1 ^[11] (7-16	15-50 ^[9] (n=24)	20-61 ^[9] (n=24)	0.7-2.7 ^[11] (\leq 11 1.2-3.6 ^[11] (12-16	100-195 (n=6) ^[12]				

^aPatients previously reported (8-10).

^bReference values previously reported (9, 11, 12).

^cFor cDNA numbering +1 corresponds to the A of the first ATG translation initiation codon. RefSeq cDNA: NM_005629.3 (*SLC6A8*); NM_000156.5 (*GAMT*).

Cr: creatine; Crn: creatinine; CRTR-D: Creatine transporter deficiency;

GAA: guanidinoacetate; GAMT-D: adenosyl-L-methionine:N-guanidinoacetate methyltransferase deficiency.

Table 2. Optimized MS parameters in the MRM mode and chromatographic separation of ATP, ADP, AMP, PCr and Cr.

(2A) Optimized mass spectrometer parameters for the detection of each metabolite and (2B) MRM extracted ion chromatograms of ATP, ADP, AMP, PCr and Cr. Cr: creatine; PCr: phosphocreatine.

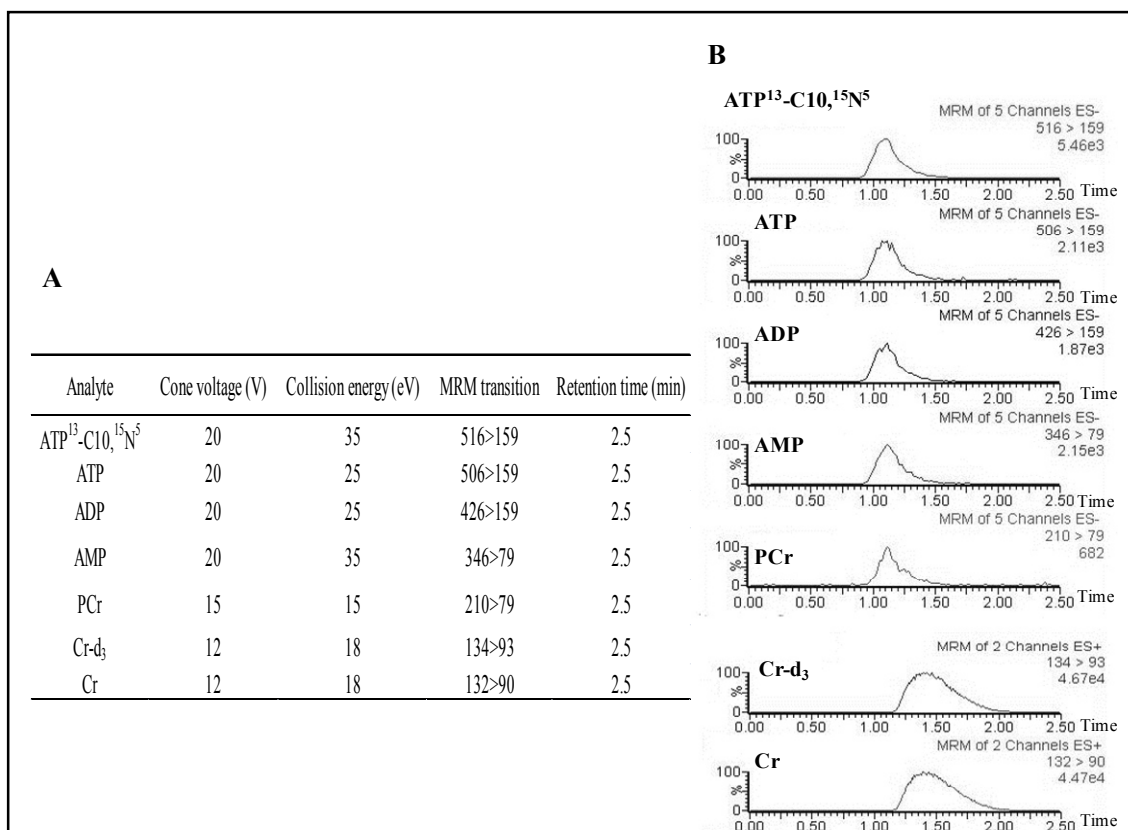


Table 3. Validation results of ATP, ADP, AMP, PCr and Cr by HPLC-ESI-MS/MS.

Cr: creatine; PCr: phosphocreatine.

	<i>ATP</i>	<i>ADP</i>	<i>AMP</i>	<i>CrP</i>	<i>Cr</i>
Calibration curve (n=6)					
<i>Mean slope (range; SD)</i>	0.042 (0.037-0.057; 0.008)	0.035 (0.018-0.048; 0.010)	0.039 (0.02-0.063; 0.018)	0.009 (0.0056-0.015; 0.004)	0.118 (0.088-0.139; 0.019)
<i>Mean Intercept (range; SD)</i>	0.019 (0.005-0.034; 0.012)	-0.009 (-0.037-(+0.031); 0.023)	0.038 (-0.005-(+0.108); 0.044)	0.017 (0.007-0.037; 0.011)	0.020 (-0.042-(+0.076); 0.044)
<i>Mean coefficient of linear regression, r² (range;SD)</i>	0.9983 (0.9929- 0.9999;	0.9972 (0.9919-0.9993; 0.0027)	0.9986 (0.9971-0.9997; 0.0009)	0.9973 (0.9931-0.9991; 0.0024)	0.9986 (0.9970- 0.9996;0.0009)
Within-day, n=10					
<i>Imprecision (% CV)</i>					
1 µg/mL	8.7	6.9	4.5	14.1	6.7
8 µg/mL	4.4	3.9	5.1	8.7	7.3
64 µg/mL	5.8	6.1	8	9.9	4.3
<i>Accuracy (% RE)</i>					
1 µg/mL	-11	0.7	-8.7	-28.7	-47.1
8 µg/mL	-6	-7.8	-10.8	-28.3	1.1
64 µg/mL	-1.1	7.6	6.4	3.8	3.7
Between-day, n=10					
<i>Imprecision (% CV)</i>					
1 µg/mL	14.9	9.9	7.7	14	11.1
8 µg/mL	7.4	8.4	9.7	10.2	8.4
64 µg/mL	3.2	6.6	8	5.4	7.9
<i>Accuracy (% RE)</i>					
1 µg/mL	-1.7	9.5	0.5	-27.4	-9.7
8 µg/mL	-2.4	0.6	9.3	8	4.4
64 µg/mL	-3.4	7.6	0.6	-1.1	4.4
Recovery (%), n=3					
8 µg/mL	109.6	96.1	135.1	164	106.6
16 µg/mL	128.6	113.6	147	187.8	104.1
64 µg/mL	89.6	116.5	154.2	158.4	105.8
LOD (µg/mL), n=3	0.25	0.25	0.25	0.5	0.024
LOQ (µg/mL), n=3	0.5	0.5	0.5	1	0.05

Table 4. ATP, ADP, AMP, PCr, Cr and CK levels in control fibroblasts and patients' fibroblasts, and also plasma CK activity, from patients with CRTR-D and GAMT-D.

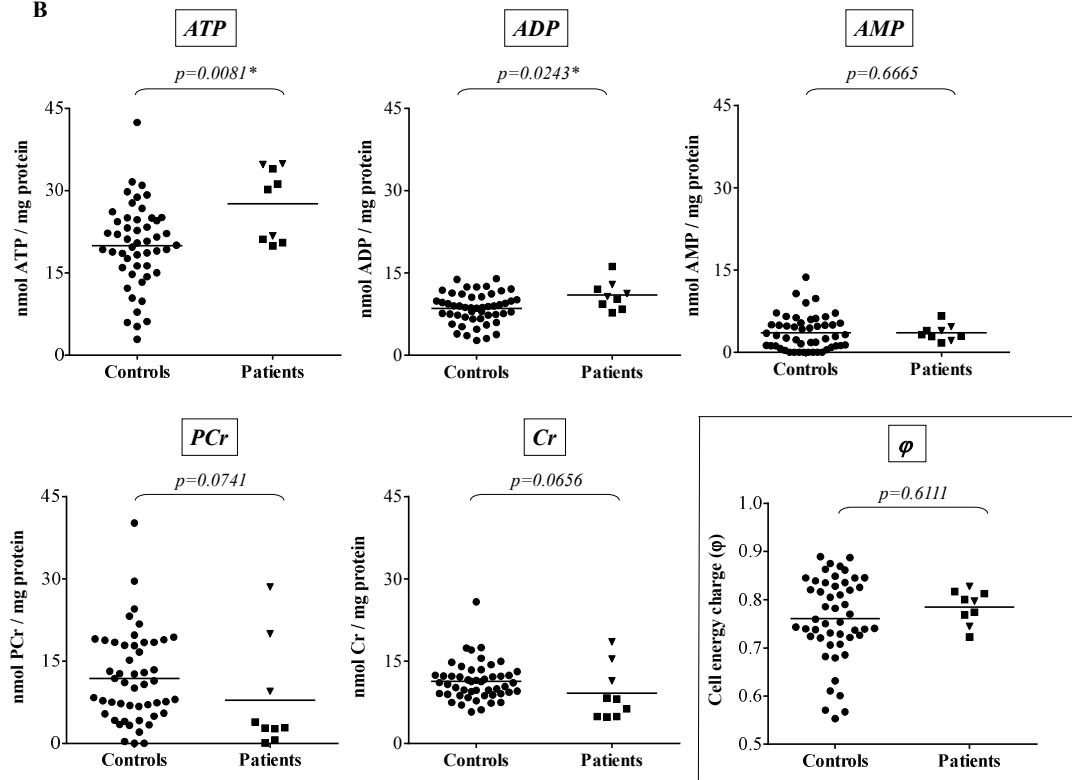
(4A) Concentration of ATP, ADP, AMP, PCr, Cr and CK in control fibroblasts and concentration range in patients. **(4B)** ATP, ADP, AMP, PCr, Cr and ϕ represented as box-and-whisker plots with mean. Cell energy charge (ϕ) is calculated as $([ATP]+1/2*[ADP])/([ATP]+[ADP]+[AMP])$. **(4C)** CK activity in plasma (1) and fibroblasts (2). Significant differences were considered when $p<0.05$ (*).

CK: creatine kinase; Cr: creatine; CRTR-D: Creatine transporter deficiency; GAMT-D: adenosyl-L-methionine:N-guanidinoacetate methyltransferase deficiency; PCr: phosphocreatine.

A

Control fibroblasts						
	ATP (nmol/mg protein)	ADP (nmol/mg protein)	AMP (nmol/mg protein)	PCr (nmol/mg protein)	Cr (nmol/mg protein)	CK (IU CK/g protein)
Median	20.3	8.7	3	10.9	11.1	88.1
5th percentile	5.6	3.3	0.1	0.2	6.6	39.2
95th percentile	31.3	13.1	10.2	26.8	17.4	273.4
Minimum	2.9	2.7	0.1	0.1	5.8	32.9
Maximum	42.4	14	13.7	40.2	25.8	380
Fibroblasts from CRTR-D and GALT-D patients						
	ATP (nmol/mg protein)	ADP (nmol/mg protein)	AMP (nmol/mg protein)	PCr (nmol/mg protein)	Cr (nmol/mg protein)	CK (IU CK/g protein)
Median	30.2	10.7	3.2	2.9	8.1	116.0
5th percentile	19.9	7.7	1.7	0.1	4.8	103.8
95th percentile	34.9	16.2	6.6	28.5	18.5	349.2
Minimum	19.9	7.7	1.7	0.1	4.8	103.8
Maximum	34.9	16	6.6	40.2	18.5	349.2

B

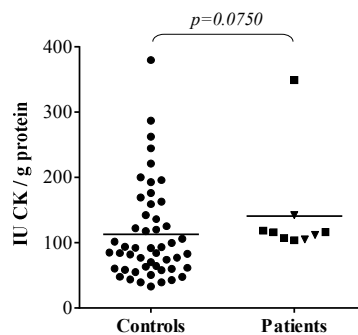


C

Patient	Plasma CK activity
	IU/L
P2	32
P6	4
P7	88
P8	25

Plasma control values of CK activity:
62-235 IU/L (1-12 years)
64-288 IU/L (12-18 years)

2) CK activity in fibroblasts



■ Patients with CRTR-D ▼ Patients with GALT-D

References

- [1] M. Wyss, R. Kaddurah-Daouk, Creatine and creatinine metabolism, *Physiol. Rev.* 80 (2000) 1107-1213.
- [2] B.J. Hoogwerf, D.C. Laine, E. Greene, Urine C-peptide and creatinine (Jaffe method) excretion in healthy young adults on varied diets: sustained effects of varied carbohydrate, protein, and meat content, *Am. J. Clin. Nutr.* 43 (1986) 350-360.
- [3] K. Von Figura, F. Hanefeld, D. Isbrandt, S. Stöckler-Ipsiroglu, Guanidinoacetate methyltransferase deficiency, in: C. Scriver, A. Beaudet, W. Sly, D. Valle (Eds.), *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw-Hill Company, United States, 2001, pp.1897-1908.
- [4] T. Wallimann, M. Wyss, D. Brdiczka, K. Nicolay, H.M. Eppenberger, Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis, *Biochem. J.* 281 (1992) 21-40.
- [5] T. Wallimann, M. Dolder, U. Schlattner, M. Eder, T. Hornemann, E. O'Gorman, A. Rück, D. Brdiczka, Some new aspects of creatine kinase (CK): compartmentation, structure, function and regulation for cellular and mitochondrial bioenergetics and physiology, *Biofactors* 8 (1998) 229-234.
- [6] S. Mercimek-Mahmutoglu, S. Stöckler-Ipsiroglu, G.S. Salomons, Creatine Deficiency Syndromes, in: R.A. Pagon, M.P. Adam, T.D. Bird, C.R. Dolan, C.T. Fong, K. Stephens (Eds.), *GeneReviews™* [Internet], Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015.
- [7] S. Mercimek-Mahmutoglu, K. Al-Thihli, E. Roland, Is low serum creatine kinase a nonspecific screening marker for creatine deficiency syndromes?, *Mol. Genet. Metab.* 106 (2012) 251-252.
- [8] P. Alcaide, B. Merinero, P. Ruiz-Sala, E. Richard, R. Navarrete, A. Arias, A. Ribes, R. Artuch, J. Campistol, M. Ugarte, P. Rodríguez-Pombo, Defining the pathogenicity of creatine deficiency syndrome, *Hum. Mutat.* 32 (2011) 282-291.
- [9] A. Arias, M. Corbella, C. Fons, A. Sempere, J. García-Villoria, A. Ormazabal, P. Poo, M. Pineda, M.A. Vilaseca, J. Campistol, P. Briones, T. Pàmols, G.S. Salomons, A. Ribes, R. Artuch, Creatine transporter deficiency: prevalence among patients with

mental retardation and pitfalls in metabolite screening, *Clin. Biochem.* 40 (2007) 1328-1331.

[10] C. Fons, A. Sempere, A. Arias, A. López-Salas, P. Póo, M. Pineda, M. Mas, M.A. Vilaseca, G.A. Salomons, A. Ribes, R. Artuch, J. Campistol, Arginine supplementation in four patients with X-linked creatine transporter defect, *J. Inherit. Metab. Dis.* 31 (2008) 724-728.

[11] A. Arias, A. Ormazabal, J. Moreno, B. González, M.A. Vilaseca, J. García-Villoria, T. Pàmols, P. Briones, R. Artuch, A. Ribes, Methods for the diagnosis of creatine deficiency syndromes: A comparative study, *J. Neurosci. Methods.* 156 (2006) 305-309.

[12] A. Sempere, C. Fons, A. Arias, P. Rodríguez-Pombo, B. Merinero, P. Alcaide, A. Capdevila, A. Ribes, R. Duque, J. Eirís, P. Poo, E. Fernández-Alvarez, J. Campistol, R. Artuch, Cerebral creatine deficiency: First Spanish patients harbouring mutations in *GAMT* gene, *Med. Clin.* 133 (2009) 745-749.

[13] Y. Jiang, C. Sun, X. Ding, D. Yuan, K. Chen, B. Gao, Y. Chen, A. Sun, Simultaneous determination of adenine nucleotides, creatine phosphate and creatine in rat liver by high performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 66 (2012) 258-263.

[14] D.E. Atkinson, The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers, *Biochemistry.* 7 (1968) 4030-4034.

[15] M. Hørder, R.C. Elser, W. Gerhardt, M. Mathieu, E.J. Sampson, International Federation of Clinical Chemistry (IFCC): Scientific Division, Committee on Enzymes. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 7. IFCC method for creatine kinase (ATP: creatine (N-phosphotransferase, EC 2.7.3.2). IFCC Recommendation, *J. Automat. Chem.* 12 (1990) 22-40.

[16] G. Szasz, W. Gruber, Creatine kinase in serum: 4. Differences in substrate affinity among the isoenzymes, *Clin. Chem.* 24 (1978) 245-249.

[17] H. Lang, U. Würzburg, Creatine Kinase, an enzyme of many forms, *Clin. Chem.* 28 (1982) 1439-1447.

Artículo 3: Role of creatine as biomarker of mitochondrial diseases

Sonia Pajares, Angela Arias, Judit García-Villoria, Paz Briones, Antonia Ribes.

Mol Genet Metab. 2013 Feb;108(2):119-24.

RESUMEN

Dado que se han descrito falsos positivos al estudiar la creatina (Cr) como marcador de la deficiencia de CRTR y dado que diversos estudios sugieren que la Cr podría ser biomarcador en las enfermedades mitocondriales, en esta publicación estudiamos el papel de la Cr en 33 pacientes con enfermedades mitocondriales incluyendo 22 pacientes con deficiencia de la cadena respiratoria mitocondrial, 5 pacientes con depleción del mtDNA y 6 pacientes con mutaciones en NFU1. También se analizaron 9 pacientes con deficiencia de piruvato deshidrogenasa (PDH). El análisis mostró un incremento de Cr plasmática en los 33 pacientes con enfermedades mitocondriales comparado con los controles (Media \pm SEM, 146 \pm 28 vs. 71 \pm 2; $p < 0.0001$), aunque analizado de forma individual este incremento sólo era evidente en 9 pacientes. Este grupo incluía 6 pacientes con deficiencia de la cadena respiratoria, 2 pacientes con depleción del mtDNA y 1 paciente con mutaciones en NFU1. Los pacientes con deficiencia de PDH mostraron niveles normales de Cr en plasma.

Además, en este estudio también se compararon las concentraciones de Cr entre los pacientes que tenían un diagnóstico definitivo de deficiencia de la cadena respiratoria con los que no eran concluyentes. El análisis individualizado mostró que los niveles de Cr eran más bajos en los 20 pacientes con diagnóstico definitivo que en los 13 pacientes sin diagnóstico definitivo, aunque estas diferencias no eran significativas (media \pm SEM, 104 \pm 17 vs. 210 \pm 64; $p > 0.05$). Estos resultados se reflejaban en el estudio de correlación de Spearman en el que se evidenció que no habían diferencias entre ambos grupos ($r=0.61$, $p=0.025$), lo que permitió deducir que la Cr no sería útil para la clasificación de las deficiencias de cadena respiratoria.

Tampoco se halló ninguna correlación entre los niveles de Cr y los de lactato plasmático ($r=0.06$, $p=0.764$), ni entre la Cr y la actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria ($r=0.23$, $p=0.27$).

Para conocer mejor el poder marcador de la Cr en las enfermedades mitocondriales, calculamos su sensibilidad y especificidad. El análisis mostró que la Cr tenía una baja

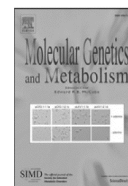
sensibilidad (60%) y una especificidad aceptable (83%) (cutoff ≥ 120 $\mu\text{mol/L}$) con una baja capacidad diagnóstica (AUC=0.64, $p < 0.05$).

Todo este trabajo nos permitió conocer más en profundidad el papel que tenía la Cr en las enfermedades mitocondriales, de modo que pudimos deducir que la Cr no es un biomarcador sensible para estas enfermedades, aunque niveles incrementados junto con la alteración de otros biomarcadores deberían tenerse en cuenta, ya que reforzarían la idea ante una sospecha de enfermedad mitocondrial.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Molecular Genetics and Metabolism

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymgme

Role of creatine as biomarker of mitochondrial diseases

Sonia Pajares ^{a,1}, Angela Arias ^{a,1}, Judit García-Villoria ^a, Paz Briones ^{a,b}, Antonia Ribes ^{a,*}^a Sección de Errores Congénitos del Metabolismo-IBC, Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clínic, CIBERER, IDIBAPS, Barcelona, Spain^b Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 November 2012

Accepted 22 November 2012

Available online 3 December 2012

Keywords:

Creatine

Mitochondrial disease

Biochemical marker

LC-MS/MS

ABSTRACT

Recent investigations have suggested creatine (Cr) as an additional biomarker of mitochondrial diseases. With the aim of corroborating previous findings, we have studied plasma Cr in a cohort of 33 patients with different mitochondrial diseases. Cr was clearly increased in 9 out of 33 patients. Therefore, positive patients represent only 28% of the total number, suggesting that Cr is not a sensitive biomarker of mitochondrial diseases although it does present an acceptable specificity (83%). High plasma Cr, together with other biomarkers, might be useful to reinforce the diagnosis of mitochondrial diseases.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Creatine (Cr) is a guanidino compound involved in the storage and transmission of phosphate-bound energy [1]. The intracellular pool of Cr is maintained 50% through diet and the remainder is synthesized endogenously [2]. Intracellular Cr is converted to phosphocreatine (PCr) via creatine kinase (CK). Different CK isoforms exist and each one plays a specific function. Mitochondrial CKs use ATP to convert Cr to PCr, cytosolic CKs use PCr to convert ADP into ATP at sites of energy demand, and to convert excess ATP to PCr for energy storage [3,4]. Therefore, the Cr/PCr/CK system is used as an intracellular buffer for ATP in tissues with intermittently high energy requirements such as skeletal muscle and brain.

Recently, two studies [5,6] revealed increased extracellular creatine levels in patients with mitochondrial respiratory chain deficiencies. These authors suggested Cr as a biomarker of mitochondrial diseases. It is reasonable to assume the importance of Cr in the cell energy metabolism and its connection with mitochondrial dysfunction, as the most prominent role of mitochondria is ATP production.

According to that hypothesis, we analyzed a cohort of patients with different mitochondrial diseases to test whether (in our hands) the measurement of plasma Cr could be a biomarker of these diseases.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

This is a retrospective study performed in 33 plasma samples with different mitochondrial diseases. Samples were stored at -80°C until analysis. Twenty two patients were diagnosed of different mitochondrial respiratory chain deficiencies. Five patients had mitochondrial DNA (mtDNA) depletion: 1 with mutations in *DGUOK* (patient 9), 1 in *SUCLG1* (patient 33) and 3 with unclassified mtDNA depletion (patients 22, 24 and 25) in which the following genes were screened for mutations: *DGUOK*, *MPV17* and *RRM2B* in patient 22, *DGUOK* and *TWINKLE* in patient 24 and *DGUOK*, *MPV17*, *TWINKLE* and *RRM2B* in patient 25, but no mutations were found. In 6 patients the mitochondrial disease was due to *NFU1* mutations. The mitochondrial disease was classified as definite, probable or possible according to Bernier et al. criteria [7]. Plasma samples from 9 patients with PDH deficiency were also analyzed. All the clinical histories were reviewed and they did not specify whether the patients received creatine treatment. Consequently, we assume this fact as a potential limitation of the study. Biochemical, molecular and clinical data of patients are shown in Table 1. Some of the patients have been previously reported [8–11].

Plasma samples from 161 healthy children ranging in age from 1 day to 17 years and 35 plasma samples from healthy adults were obtained at our hospital in accordance with the Helsinki Declaration of 1964, as revised in 2000.

2.2. Enzymatic determinations

CS and respiratory chain activities were determined in skeletal muscle, fibroblasts or liver tissue by spectrophotometric methods as previously described [12].

* Corresponding author at: Sección de Errores Congénitos del Metabolismo-IBC, Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clínic, CIBERER, IDIBAPS, c/Mejía Lequerica s/n Helios III, 08028 Barcelona, Spain. Fax: +34 932275668.

E-mail address: aribes@clinic.ub.es (A. Ribes).

¹ These authors contributed equally to this work.

Table 1
Biochemical, molecular and clinical data of 33 patients with mitochondrial diseases.

Patient	Bernier diagnostic score ^a [7]	Age at diagnosis (years)	Plasma Cr (μmol/L)	Lactate		Urine Organic acids	Enzyme activity (% respect to the lowest control value) (material)	Altered gene / mutation	Clinical Presentation
				Blood ^b	CSF ^c				
P1	2	<1	79	N	NA	LA, 2-HBA, SA, FA, 3-MGCA	C.I.: 72% (M)	–	Respiratory insufficiency, dysmorphic features, hypotonia, hematologic abnormalities, hepatosplenomegaly, hypertrophic cardiomyopathy, motor delay, exitus
P2	1	11	94	↑	↑	LA, 2-HBA, 3-HBA, FA	C.I.: Diagnosed elsewhere (M)	tRNA ^{Leu} / A3243G	MELAS, hypotonia, exitus
P3	1	10	67	↑	↑	LA	C.I.: Diagnosed elsewhere (M)	tRNA ^{Leu} / A3243G	MELAS, retinitis pigmentosa, deafness
P4	1	<1	163	N	NA	LA, FA	C.I.: 12% (M)	–	Leigh S, hypotonia, hypertrophic cardiomyopathy, respiratory insufficiency, nystagmus, exitus
P5	3	14	43	N	Normal	NA	C.I.III: 47% (M)	–	MELAS, statural delay, optic atrophy, hypotonia, motor delay, muscular dystrophy
P6	3	<1	94	NA	NA	EMA, SA	Normal	–	MC, seizures, hepatic alteration
P7	2	<1	629	N	NA	LA, GA, p-HBAA, AT	C.I.: 60% (M) C.I.III: 47% (M)	–	Hepatic alteration, hematologic abnormalities, respiratory insufficiency, seizures, exitus
P8	1	<1	360	NA	NA	LA	C.I.III: 84% (M)	MTCYB / A15078G	Respiratory insufficiency, hepatic alteration, exitus
P9 [8]	1	<1	80	↑↑↑	NA	LA, 3-PLA	C.I.III: 51% (L) C.I.IV: 35% (L)	mtDNA depletion: 93% (L) DcJ00K / c [763_766dupGATT] + [763_766dupGATT]	Hepatic alteration, renal insufficiency, exitus
P10 [9]	1	<1	49	↑↑	NA	LA, FA, p-HPPA, 2-KGA	C.I.III: 11% (M)	BCS1L / c [246C>T] + [279C>T]	Congenital cataracts, renal alteration, statural-ponderal delay, mental retardation, spasticity, hepatomegaly, exitus
P11	3	<1	78	↑	NA	LA, 3-HIVA, 3-MCC	C.I.III: 80% (M) C.I.V: 77% (M)	–	Neurological alteration, seizures, motor delay, dysmorphic abnormalities
P12	1	<1	126	↑↑	↑	LA, SA, FA, MA	C.I.: Diagnosed elsewhere (M)	–	Leigh S, hypotonia, MC, respiratory insufficiency, hepatomegaly, nystagmus, exitus
P13 [10]	1	4	36	↑	↑	3-MGCA	C.I.: 66% (F)	ND6 / T14487C	Leigh S, motor delay, seizures, neurological alteration
P14	1	31	42	↑↑	↑	LA, FA, 2-HBA	C.I.: 63% (F) C.I.V: 33% (M) / 29% (F)	–	Leigh S, ataxic-spastic syndrome
P15	1	1	96	N	NA	GA, 2-KAA, 2-HAA, 2-KGA	C.I.V: 70% (M)	–	Neurological abnormalities, motor delay, hypotonia, seizures, nystagmus, coarse facies, spasticity
P16	3	2	91	N	NA	EMA	C.I.V: Diagnosed elsewhere (M)	–	Seizures, axial hypotonia, severe encephalopathy, MC, optic atrophy, spastic tetraparesis
P17	2	<1	118	↑	Normal	LA, SA, FA, 2-KGA	C.I.V: 70% (M)	–	Statural-ponderal delay, hypotonia, hypoactivity

Patient ID	Age	Sex	Height (cm)	Weight (kg)	PMR	Seizures	ATP6 / T8993G	C:IV (M)	Findings	Diagnosis
P18	1	<1	68.55	↑	Normal	PMR, seizures, hypotonia	ATP6 / T8993G	C.IV: 56% (M) C.II+III: 10% (M) C.II: 24% (M) C.III: 34% (M) C.IV: 83% (M)	Coarse facies, motor delay, hypotonia, muscular dystrophy, myopathic signs, microcephaly	PMR, seizures, hypotonia
P19	3	2	59	N	Normal	—	—	C.I+III: 44% (M) C.III: 80% (M) C.IV: 20% (M)	Ponderal delay, demyelination, leukopenia, hypertrophic cardiomyopathy, neonatal multioorganic failure	Leigh S, visual loss, deafness, PMR, hypotonia
P20	1	<1	159	↑	NA	—	—	C.I+III: 83% (M) C.II+III: 24% (M) C.III: 29% (M) C.IV: 30% (M) Normal (F)	Coarse facies, statural-ponderal delay, ictericity, mental and motor retardation, spasticity, seizures, exitus	Coarse facies, statural-ponderal delay, ictericity, mental and motor retardation, spasticity, seizures, exitus
P21	1	NA	68	↑	Normal	—	COI / G5979A	C.III: 13% (M) C.IV: 61% (M)	Leigh S, visual loss, deafness, PMR, hypotonia	Leigh S, visual loss, deafness, PMR, hypotonia
P22	2	<1	43	NA	LA	—	mtDNA depletion: 75–80% (M)	C.I+III: 83% (M) C.II+III: 24% (M) C.III: 29% (M) C.IV: 30% (M) Normal (F)	Coarse facies, statural-ponderal delay, ictericity, mental and motor retardation, spasticity, seizures, exitus	Coarse facies, statural-ponderal delay, ictericity, mental and motor retardation, spasticity, seizures, exitus
P23	3	7	76	↑↑	LA, 3-MGCA	—	—	Normal (F)	Epileptic encephalopathy, flaccid tetraparesis, liver failure, exitus	Epileptic encephalopathy, flaccid tetraparesis, liver failure, exitus
P24	2	<1	230	↑	LA	—	mtDNA depletion: 90% (M)	NA	Hypotonia, exitus	Hypotonia, exitus
P25	2	2	583	↑↑↑	LA, 2-HIBA, 3-HIBA, 2-HIVA, p-HPPA, ACAC	—	mtDNA depletion: 80% (M), 70% (L)	Normal (M)	Cardiac arrest, hepatic insufficiency, leukoencephalopathy, renal insufficiency, exitus	Cardiac arrest, hepatic insufficiency, leukoencephalopathy, renal insufficiency, exitus
P26	3	<1	611	NA	LA	—	—	NA	Acute hepatorenal failure	Acute hepatorenal failure
P27 [11]	1	<1	84	NA	LA, 2-KGA	—	NFU1 / c.[622G>T] + [622G>T]	NA	Cardiomyopathy, pulmonary hypertension	Cardiomyopathy, pulmonary hypertension
P28 [11]	1	<1	56	↑	GA, 2HGA, 2KG, 2KAA, TG	—	NFU1 / c.[622G>T] + [622G>T]	NA	Pulmonary hypertension, neurological regression, hypotonia, muscle weakness	Pulmonary hypertension, neurological regression, hypotonia, muscle weakness
P29 [11]	1	<1	83	↑	LA, SA, FA, 2-KGA, TG	—	C.II+III: 56% (M)	C.II+III: 56% (M)	Hypotonia, edema, demyelination, progressive neurological deterioration	Hypotonia, edema, demyelination, progressive neurological deterioration
P30 [11]	1	<1	99	↑↑↑	LA, MA, FA, 2-KGA, TG	—	NFU1 / c.[622G>T] + [622G>T]	C.II+III: 39% (M) / 12% (F)	Somnolence, irritability, hepatomegaly, motor delay, hypotonia, statural delay, exitus	Somnolence, irritability, hepatomegaly, motor delay, hypotonia, statural delay, exitus
P31 [11]	1	<1	52	↑↑	LA, FA, GA, SA, MA, 2-KGA, 2-KAA, ACAC	—	NFU1 / c.[622G>T] + [622G>T]	C.I+III: 69% (M) C.II+III: 62% (M) C.II: 75% (M) C.III: 38% (M)	Hepatomegaly, regression	Hepatomegaly, regression
P32 [11]	1	<1	241	↑	TG, IVG, 3-MCC	—	NFU1 / c.[622G>T] + [622G>T]	NA	Pulmonary hypertension, irritability, exitus	Pulmonary hypertension, irritability, exitus
P33	1	<1	54	↑↑	MMA	—	SUCGL1 / c.[626C>A]+[531+44A>T]	Normal (F)	Leigh S, hypotonia, PMR	Leigh S, hypotonia, PMR

LA: lactic acid; GA: glutaric acid; 2-HBA: 2-hydroxybutyric acid; 3-HBA: hydroxybutyric acid; FA: fumaric acid; 3-MGCA: 3-methylglutaconic acid; EMA: ethylmalonic acid; SA: succinic acid; G: glyoxylate; p-HIBA: p-hydroxybenzaldehyde acid; p-HPLA: p-hydroxyphenyl-lactic acid; AT: n-acetyltyrosine; p-HPPA: p-hydroxyphenylpyruvic acid; p-HPLA: p-hydroxyphenylpyruvic acid; 3-PLA: 3-phenyl-lactic acid; 2-KGA: 2-ketoglutaric acid; 2-HIVA: 2-hydroxyisovaleric acid; 3-HIVA: 3-hydroxyisovaleric acid; 3-MCG: 3-methylcrotonylglycine; MA: malic acid; 2-KAA: 2-ketoacidic acid; 2-HAA: 2-hydroxyadipic acid; 2-HIBA: 2-hydroxyisobutyric acid; 3-HIBA: 3-hydroxyisobutyric acid; ACAC: acetoacetic acid; TG: triglyceride; IVG: isovalerylglycine; 3-HMGA: 3-hydroxy-3-methylglutaric acid; and MMA: methylmalonic acid.

M: muscle; F: fibroblasts; L: liver.
—: mutations not found.

NA: not available.

MCC: microcephaly, PMR: psychomotor retardation.

The patients with increased creatine are outlined in gray.

^a Patients were classified according to Bernier et al. diagnostic criteria [7]: 1 (Definite diagnosis), 2 (Probable diagnosis) and 3 (Possible diagnosis).

^b Blood lactate (Controls: 1–2 mmol/L); ↑ (>2–4 mmol/L); ↑↑ (>4–10 mmol/L); ↑↑↑ (>10 mmol/L).

^c LCR lactate (Controls: 1.1–3.2 mmol/L); ↑ (3.3 mmol/L–5 mmol/L).

2.3. Determination of mtDNA copy number

Analysis of mtDNA copy number was performed by quantitative real-time PCR as previously described [12] or by Southern blot in patients diagnosed many years ago (patients 9, 22 and 25) according to Solano et al. [13], with slight modifications, including the use of the 18S nuclear probe.

2.4. HPLC-MS/MS analysis

Creatine concentrations from patients and controls were analyzed by HPLC-MS/MS (Waters-Micromass Manchester, UK, model Quattro micro™ API) as previously described by Arias et al. [14].

2.5. Statistical analysis

SPSS for Windows (version 18.0, SPSS, Chicago, IL, USA) and Graphpad Prism 6.0 was used to perform statistical analysis. The Student's *t*-test was used to compare results among different age control groups as well as to analyze the significance of the differences in creatine concentrations

between patient and control samples, as well as between patients with definite and non definite respiratory chain disorder. Correlations between percentages of the respiratory chain activities and blood lactate concentrations versus plasma Cr, and also between the degrees of diagnosis certainty versus plasma Cr, were assessed using Spearman's correlation analysis. The diagnostic capacity of plasma Cr was assessed by 2×2 contingency table. Receiver-operating characteristic (ROC) curve was constructed and the area under ROC curve (AUC) was calculated to evaluate the discriminatory capability of plasma Cr.

3. Results and discussion

The Cr/CK/PhCr system plays a role in cellular energy homeostasis. CK acts as an intracellular energy shuttle, transferring high-energy phosphates from sites of de novo ATP production in the mitochondria to cellular sites of energy utilization [1,3]. Recent investigations [5,6] have reported a correlation between high plasma Cr concentration and mitochondrial diseases suggesting Cr as a useful biomarker for the diagnosis of these disorders.

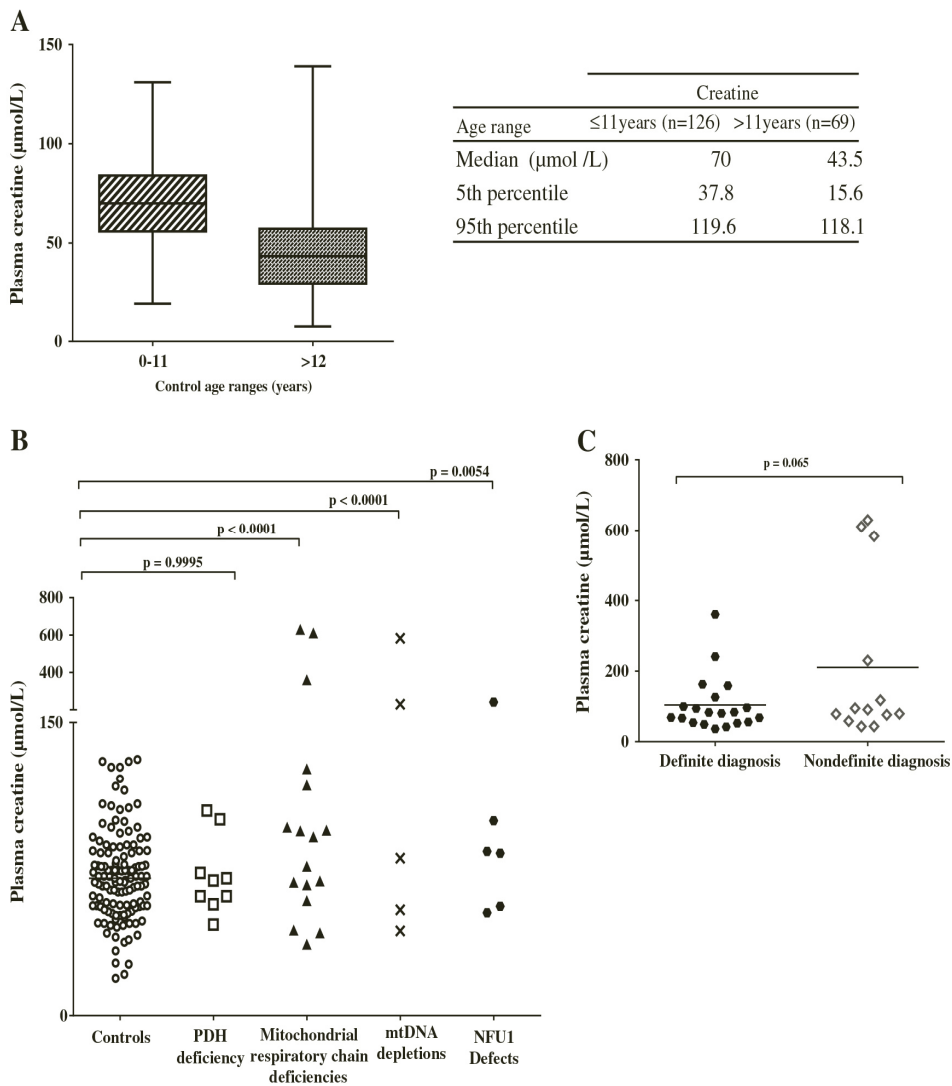


Fig. 1. Plasma Cr concentration in controls and patients with mitochondrial diseases. A) Reference values by age range of plasma creatine concentrations obtained by HPLC-MS/MS. Values are represented as box-and-whisker plots with minimum and maximum. B) Plasma creatine in PDH deficiency and mitochondrial diseases: mitochondrial respiratory chain deficiencies, mtDNA depletions and NFU1 defects. C) Plasma creatine in patients with definite and non definite diagnoses of mitochondrial respiratory chain deficiency, based on Bernier et al. criteria [7]. Significant differences were considered when $p < 0.05$.

With the aim of corroborating previous findings [5,6], we analyzed plasma Cr in a cohort of 33 patients affected with mitochondrial diseases as compared with a group of 196 healthy subjects.

Statistical analysis of the control group revealed a significant change ($p < 0.001$) in Cr concentration at the age of 11 years. Therefore, two control groups have been established (Fig. 1A). As we had previously observed [14], Cr decreases with age.

Patients with PDH deficiency were included as negative controls, as PDH is a mitochondrial enzyme that is not directly related to the production and consumption of ATP. And, actually, all the PDH deficient patients had normal Cr concentration in plasma (Fig. 1B).

The mean of Cr concentration was significantly higher in the cohort of 33 patients with mitochondrial diseases as compared with the mean of the corresponding age-matched controls (mean \pm SEM, 146 ± 28 vs. 71 ± 2 ; $p < 0.0001$) but, individually, only 9 patients showed a clear increase (Fig. 1B). This group of positive patients includes 6 patients with mitochondrial respiratory chain deficiencies, 2 patients with mitochondrial depletion syndrome and 1 patient with mutations in *NFU1*, which encodes for a mitochondrial protein involved in the delivery of FeS clusters to liponic acid synthase and to complex II or complex I–III of the mitochondrial respiratory chain [11,15].

Concerning the classification of mitochondrial respiratory chain disorders based on Bernier et al. criteria [7], we compared Cr concentrations between patients with a definite and non definite diagnosis. Cr mean concentration was lower in the 20 patients with definite diagnosis than in the 13 patients with non definite diagnosis, although the difference was not significant (mean \pm SEM, 104 ± 17 vs. 210 ± 64 ; $p > 0.05$) (Fig. 1C). Spearman's correlation reflects this situation ($r = 0.61$, $p = 0.025$) revealing that plasma Cr is similar in both groups of patients and, consequently, plasma Cr might be not useful for the classification of mitochondrial respiratory chain deficiencies.

Lactate is known as the gold standard biomarker of mitochondrial dysfunction, and blood lactate levels were available in 27 patients (Table 1). Therefore, we considered interesting to determine whether there was a significant correlation between plasma Cr and blood lactate. Spearman's correlation analysis was assessed and showed no correlation between both parameters ($r = 0.06$, $p = 0.764$) (Fig. 2A).

We applied the same test to 24 patients with available data of respiratory chain activities versus plasma Cr. Results also showed no

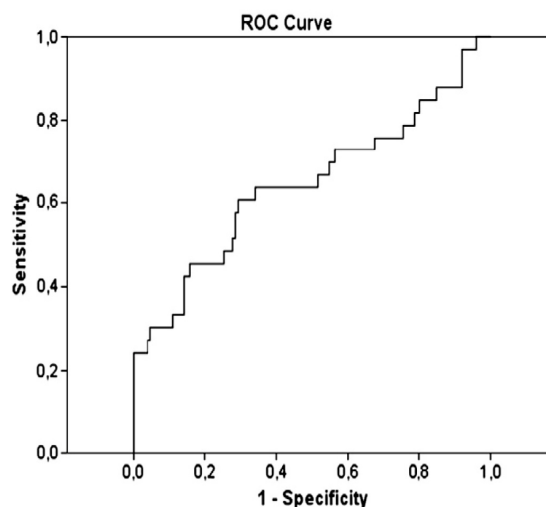


Fig. 3. Diagnostic performance of plasma Cr in the detection of patients with mitochondrial diseases. The diagnostic accuracy of Cr is represented by receiver-operating characteristic (ROC) curve analysis. The area under the ROC curve (AUC) for plasma Cr is 0.64 (Sen = 60%, Spe = 83%, cut off value ≥ 120 $\mu\text{mol/L}$).

correlation between respiratory chain activities and plasma Cr ($r = 0.23$, $p = 0.27$) (Fig. 2B).

We then speculated that high Cr might be associated to a particular clinical phenotype rather than to a specific defect. However, an accurate revision of the clinical phenotypes, excluded this possibility (Table 1).

To assess the performance of plasma Cr as a potential biomarker for patients with mitochondrial diseases, we calculated test sensitivity and specificity. The contingency table for the diagnostic capacity of Cr showed a low sensitivity (60%) and an acceptable specificity (83%) (cut-off threshold of ≥ 120 $\mu\text{mol/L}$). These results indicate a high percentage of false positives (40%) and a lower percentage of false negatives (17%). ROC curve used to determine the discriminatory capability of Cr between patients and healthy subjects showed that plasma Cr has a low diagnostic capability (AUC = 0.64, $p < 0.05$) in the detection of patients with mitochondrial diseases (Fig. 3).

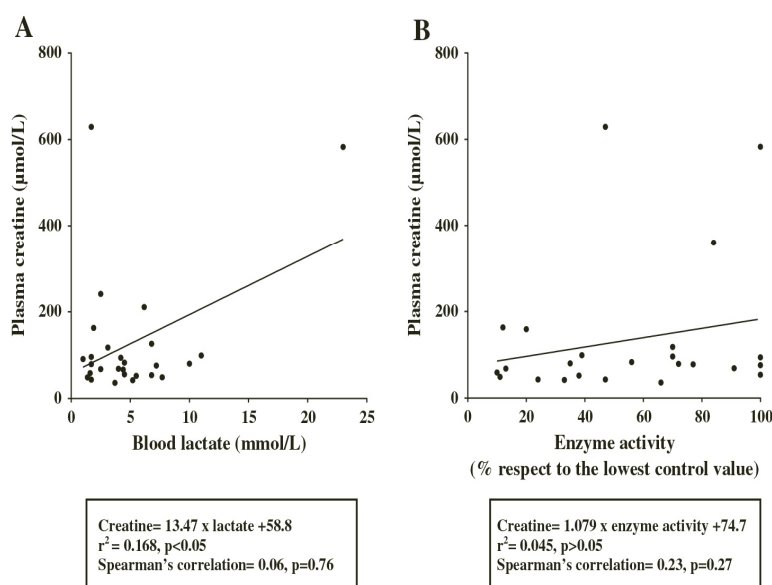


Fig. 2. Linear regression curves between A) plasma Cr and blood lactate and B) plasma Cr and respiratory chain activities. In patients with more than one affected respiratory chain complex, the lowest enzyme activity was used in the correlation analysis.

4. Conclusions

To summarize, our data are similar to the data reported by others [5,6] with some particular considerations. Plasma Cr elevation was present in 28% of the total patients with mitochondrial diseases. Therefore, Cr is not a sensitive biomarker for these disorders, but instead, Cr could be considered specific for mitochondrial diseases. Consequently, high levels of plasma Cr, together with alteration of other biomarkers, might be taken into account as they could be valuable to reinforce a suspected mitochondrial disease.

Acknowledgments

We thank all the physicians who sent the samples. We thank P. Alcalá, C. Fernández, M. Fernández and S. Moliner for their excellent technical assistance. This study was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS, grant number PS09/02128 and partially supported by FIS PI08/0307) from Ministerio de Sanidad, Spain. The CIBER of Rare Diseases (CIBERER) is an initiative of the ISCIII.

References

- [1] M. Wyss, R. Kaddurah-Daouk, Creatine and creatinine metabolism, *Physiol. Rev.* 80 (2000) 1107–1213.
- [2] B.J. Hoogwerf, D.C. Laine, E. Greene, Urine C-peptide and creatinine (Jaffe method) excretion in healthy young adults on varied diets: sustained effects of varied carbohydrate, protein, and meat content, *Am. J. Clin. Nutr.* 43 (1986) 350–360.
- [3] T. Wallimann, M. Wyss, D. Brdiczka, K. Nicolay, H.M. Eppenberger, Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis, *Biochem. J.* 281 (1992) 21–40.
- [4] T. Wallimann, M. Dolder, U. Schlattner, M. Eder, T. Hornemann, E. O'Gorman, A. Rück, D. Brdiczka, Some new aspects of creatine kinase (CK): compartmentation, structure, function and regulation for cellular and mitochondrial bioenergetics and physiology, *Biofactors* 8 (1998) 229–234.
- [5] O. Shaham, N.G. Slate, O. Goldberger, Q. Xu, A. Ramanathan, A.L. Souza, C.B. Clish, K.B. Sims, V.K. Mootha, A plasma signature of human mitochondrial disease revealed through metabolic profiling of spent media from cultured muscle cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 1571–1575.
- [6] S. Boenzi, D. Martinelli, R. Carozzo, F. Piemonte, V. DiCiommo, C. Rizzo, E. Bertini, C. Dionisi-Vici, Plasma creatine is elevated in mitochondrial disorders: a new biomarker for the diagnosis, *J. Inherit. Metab. Dis.* 34 (2011) S49–S286.
- [7] F.P. Bernier, A. Boneh, X. Dennett, C.W. Chow, M.A. Cleary, D.R. Thorburn, Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children, *Neurology* 59 (2002) 1406–1411.
- [8] M.A. Vilaseca, P. Briones, A. Ribes, E. Carreras, A. Llácer, J. Querol, Fatal hepatic failure with lactic acidemia, Fanconi syndrome and defective activity of succinate: cytochrome c reductase, *J. Inherit. Metab. Dis.* 14 (1991) 285–288.
- [9] M.A. Ramos-Arroyo, J. Hualde, A. Ayeche, L. De Meirleir, S. Seneca, N. Nadal, P. Briones, Clinical and biochemical spectrum of mitochondrial complex III deficiency caused by mutations in the BCS1L gene, *Clin. Genet.* 75 (2009) 585–587.
- [10] C. Ugalde, R.H. Triepels, M.J. Coenen, L.P. Van den Heuvel, R. Smeets, J. Uusimaa, P. Briones, J. Campistol, K. Majamaa, J.A. Smeitink, L.G. Nijtmans, Impaired complex I assembly in a Leigh syndrome patient with a novel missense mutation in the ND6 gene, *Ann. Neurol.* 54 (2003) 665–669.
- [11] A. Navarro-Sastre, F. Tort, O. Stehling, M.A. Uzarska, J.A. Arranz, M. Del Toro, M.T. Labayru, J. Landa, A. Font, J. García-Villoria, B. Merinero, M. Ugarte, L.G. Gutierrez-Solana, J. Campistol, A. García-Cazorla, J. Vaquerizo, E. Riudor, P. Briones, O. Elpeleg, A. Ribes, R. Lill, A fatal mitochondrial disease is associated with defective NDU1 function in the maturation of a subset of mitochondrial Fe-S proteins, *Am. J. Hum. Genet.* 89 (2011) 656–667.
- [12] A. Navarro-Sastre, F. Tort, J. García-Villoria, M. Ruiz Pons, A. Nascimento, J. Colomer, J. Campistol, M.E. Yoldi, E. López-Gallardo, J. Montoya, M. Unceta, M.J. Martínez, P. Briones, A. Ribes, Mitochondrial DNA depletion syndrome: new descriptions and the use of citrate synthase as a helpful tool to better characterize the patients, *Mol. Genet. Metab.* 107 (2012) 409–415.
- [13] A. Solano, J. Gámez, F.J. Carod, M. Pineda, A. Playán, E. López-Gallardo, A.L. Andreu, J. Montoya, Characterisation of repeat and palindrome elements in patients harbouring single deletions of mitochondrial DNA, *J. Med. Genet.* 40 (2003).
- [14] A. Arias, A. Ormazabal, J. Moreno, B. González, M.A. Vilaseca, J. García-Villoria, T. Pàmols, P. Briones, R. Artuch, A. Ribes, Methods for the diagnosis of creatine deficiency syndromes: a comparative study, *J. Neurosci. Methods* 156 (2006) 305–309.
- [15] C. Jessie, A. Janer, V. Levandovskiy, N. MacKay, T. Rouault, W.H. Tong, I. Ogilvie, E.A. Shoubridge, B. Robinson, Mutations in iron-sulfur cluster scaffold genes NDU1 and BOLA3 cause a fatal deficiency of multiple respiratory chain and 2-oxoacid dehydrogenase enzymes, *Am. J. Hum. Genet.* 89 (2011) 486–495.

2. ENFERMEDAD DE NIEMANN-PICK TIPO C

Artículo 4: Cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol in lipidosis: High levels in Niemann Pick type C, Cerebrotendinous Xanthomatosis and Lysosomal Acid Lipase deficiency. *J Lipid Res.* 2015;56(10):1926-35.

Sonia Pajares, Angela Arias, Judit García-Villoria, Judit Macías-Vidal, Emilio Ros, Javier de las Heras, Marisa Girós, Maria J. Coll, Antonia Ribes

RESUMEN

El trabajo descrito en esta publicación detalla, en primer lugar, la puesta a punto y validación de la metodología mediante HPLC-ESI-MS/MS para el análisis en plasma de dos oxистерoles, el colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol (CT) y 7-cetocolesterol (7-KC). En segundo lugar, se estudia el papel de CT y 7-KC como biomarcadores en una cohorte de 16 pacientes Niemann-Pick Tipo C (NPC) (3 con fenotipo neonatal, 5 con fenotipo infantil severa, 1 con fenotipo infantil tardía, 3 con fenotipo juvenil, 2 con fenotipo adulto, 1 paciente asintomático y 1 paciente sin datos). Con el objetivo de conocer la especificidad de estos biomarcadores también se estudiaron otros grupos de enfermedades: lisosomales (Fabry, Leucodistrofia Metacromática, Mucopolisidosis II/III y deficiencia de lipasa ácida lisosomal-LAL-), peroxisomales (beta-oxidation peroxisomal y desórdenes de la biogénesis), trastornos de los esteroides (Xantomatosis cerebrotendinosa (XCT) y Smith-Lemli-Opitz (SLO)) y otras enfermedades (hipercolesterolemia familiar, galactosemia, enfermedad hepática inespecífica y afectación neurológica).

Nuestro método se basa en la derivatización de los productos mediante dimetilglicina, identificándose el derivado mono-dimetilglicinato en mayor proporción que el bis-dimetilglicinato. La respuesta del mono-dimetilglicinato se mantenía proporcionalmente lineal a distintas concentraciones ensayadas por lo que se escogió este derivado para la cuantificación del CT. El ensayo era lineal hasta 800 ng/mL con un límite de detección (1 ng/mL) y de cuantificación (3 ng/mL) bajos. La precisión intra e inter-ensayo tenían un coeficiente de variación <8%, una buena exactitud (error relativo <9%) y una recuperación >92%.

Para establecer el rango control de concentraciones de CT y 7-KC, analizamos 107 muestras de plasmas de sujetos sanos, niños y adultos. El intervalo de confianza (IC) 95% para el CT fue de 3.5-4.4 ng/mL (rango edad: 1-55 años). En el caso de 7-KC se observaron diferencias significativas entre el grupo de edad pediátrica y el grupo de edad adulta siendo la concentración de 7-KC más baja en niños que en adultos (IC95%: 10.2-12.4 ng/mL vs 14-19.5 ng/mL respectivamente, $p < 0.0001$).

Los niveles de CT y 7-KC fueron superiores en los pacientes NPC comparado con los controles (IC95% para CT: 62-275 ng/mL vs 3.5-4.4 ng/mL, $p < 0.0001$; IC95% para 7-KC: 178-795 ng/mL vs 11.8-14, $p < 0.0001$). Además, el estudio mostró una buena correlación entre la edad de presentación de la enfermedad/fenotipo clínico y los niveles plasmáticos de CT y 7-KC observándose niveles más altos en las formas neonatales seguidas de las formas infantiles severas; y niveles más bajos en las formas infantiles tardías, juveniles y adultas.

Todos los pacientes NPC presentaron un fenotipo bioquímico clásico excepto dos pacientes que tenían un fenotipo bioquímico variante, los cuales también presentaron niveles elevados de CT y 7-KC, similares a los de pacientes con fenotipo clásico. También se encontraron incrementos de CT y 7-KC en un paciente NPC asintomático.

Para conocer la especificidad de estos biomarcadores analizamos varios grupos de enfermedades. El estudio mostró que el método tenía una sensibilidad del 100% para CT y 7-KC, y una especificidad del 86% para CT y 78% para 7-KC, con una buena capacidad diagnóstica para discriminar entre los individuos afectados de la enfermedad NPC y sujetos control (CT: AUC=0.992, $p < 0.05$; 7-KC: AUC= 0.932 ($p < 0.05$)).

En el análisis detallado de cada una de estas enfermedades se observó que los niveles de 7-KC eran elevados en la mayoría de los pacientes, mientras que CT sólo estaba incrementado en los pacientes con NPC, deficiencia de lipasa ácida lisosomal (LAL) y XCT.

Un hallazgo interesante en el estudio de los pacientes con XCT fue la detección de un pico adicional. Este compuesto comparte la misma masa y transición que CT, aunque eluye a un tiempo distinto. En base a datos bibliográficos todo apuntaba que podría tratarse de otro triol, el 3α , 7α , 12α trihidroxicoprostanol (THC), producto de la vía metabólica del ácido cólico, el cual se encuentra incrementado en pacientes XCT. Dadas estas premisas, analizamos varios pacientes con y sin tratamiento con ácido quenodeoxicólico (CDCA). Observamos que tras el tratamiento los niveles de este pico

disminuían considerablemente, mientras que los niveles de CT permanecían inalterados, lo que apoyaría nuestra hipótesis inicial de que se tratara de THC. Recientemente la cesión de este compuesto sintetizado por el Prof. Björkhem (Karolinska, Suecia) nos ha permitido identificar sin ambigüedades este compuesto. Este perfil característico podría ser útil para distinguir los pacientes NPC de los pacientes XCT. Además los resultados tras el tratamiento con CDCA sugieren que el THC podría ser un buen biomarcador para la monitorización del tratamiento en los pacientes XCT.

La aportación de este trabajo en el diagnóstico de la enfermedad de NPC ha sido relevante ya que nos ha permitido obtener un método sensible, fácil y rápido mediante HPLC-ESI-MS/MS para el diagnóstico bioquímico de la enfermedad de NPC. Además, esta metodología es útil para el diagnóstico de las formas variantes de la enfermedad, cuyo diagnóstico bioquímico mediante la tinción de filpina no es concluyente en la mayoría de los casos, además requiere el cultivo de fibroblastos, hecho que retrasa considerablemente el diagnóstico. El estudio realizado en una cohorte de pacientes NPC y sujetos sanos en el territorio español ha permitido establecer rangos de referencia propios de nuestra población para estos dos metabolitos y ha corroborado que CT es un biomarcador sensible de la enfermedad, aunque no específico.

Dada esta evidencia, hemos incluido esta estrategia en la primera línea diagnóstica de la enfermedad de NPC en nuestro laboratorio asistencial. Con ello, esperamos identificar nuevos pacientes, no sólo de la enfermedad NPC, sino también de otras enfermedades como XCT, deficiencia de LAL o NPA/NPB.

Cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol: high levels in Niemann-Pick type C, cerebrotendinous xanthomatosis, and lysosomal acid lipase deficiency[§]

Sonia Pajares,* Angela Arias,* Judit García-Villoria,* Judit Macías-Vidal,* Emilio Ros,[†] Javier de las Heras,[§] Marisa Girós,* Maria J. Coll,* and Antonia Ribes^{1,*}

Sección de Errores Congénitos del Metabolismo, Servicio de Bioquímica y Genética Molecular,* Institut d'Investigacions Biomèdiques Pi i Sunyer (IDIBAPS), and Ciber Enfermedades Raras (CIBERER) Instituto de Salud Carlos III, Hospital Clinic, Barcelona, Spain; Lipid Clinic, Endocrinology and Nutrition Service,[†] IDIBAPS, and Ciber Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN) Instituto de Salud Carlos III, Hospital Clinic, Barcelona, Spain; and Division of Pediatric Metabolism,[§] Hospital Universitario de Cruces, Barakaldo, Vizcaya, Spain

Abstract Niemann-Pick type C (NPC) is a progressive neurodegenerative disease characterized by lysosomal/endosomal accumulation of unesterified cholesterol and glycolipids. Recent studies have shown that plasma cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol (CT) and 7-ketocholesterol (7-KC) could be potential biomarkers for the diagnosis of NPC patients. We aimed to know the sensitivity and specificity of these biomarkers for the diagnosis of NPC compared with other diseases that can potentially lead to oxysterol alterations. We studied 107 controls and 122 patients including 16 with NPC, 3 with lysosomal acid lipase (LAL) deficiency, 8 with other lysosomal diseases, 5 with galactosemia, 11 with cerebrotendinous xanthomatosis (CTX), 3 with Smith-Lemli-Opitz, 14 with peroxisomal biogenesis disorders, 19 with unspecific hepatic diseases, 13 with familial hypercholesterolemia, and 30 with neurological involvement and no evidence of an inherited metabolic disease. CT and 7-KC were analyzed by HPLC-ESI-MS/MS as mono-dimethylglycine derivatives. Levels of 7-KC were high in most of the studied diseases, whereas those of CT were only high in NPC, LAL, and CTX patients. Consequently, although CT is a sensitive biomarker of NPC disease, including those cases with doubtful filipin staining, it is not specific. **7-KC is a very unspecific biomarker.**—Pajares, S., A. Arias, J. García-Villoria, J. Macías-Vidal, E. Ros, J. de las Heras, M. Girós, M. J. Coll, and A. Ribes. Cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol: high levels in Niemann-Pick type C, cerebrotendinous xanthomatosis, and lysosomal acid lipase deficiency. *J. Lipid Res.* 2015. 56: 1926–1935.

Supplementary key words oxysterols • 7-ketocholesterol • high-performance liquid chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry • 3 α ,7 α ,12 α -trihydroxycoprostanol

This work was supported by DG-SANCO from the European Union (EU) (No. 308901, an EU rare diseases registry for Niemann-Pick disease type A, B, and C) and Fondo de Investigaciones Sanitarias Grant PI10/00936. A. Arias was supported by the CIBER of Rare Diseases (CIBERER). J. Macías-Vidal is a recipient of the Juan Givón Fellowship from the Fundación Niemann-Pick de España. This study was supported in part by Actelion Pharmaceuticals Spain. CIBERER and CIBEROBN are initiatives of Instituto de Salud Carlos III, Spain.

Manuscript received 25 June 2015 and in revised form 22 July 2015.

Published, JLR Papers in Press, August 3, 2015
DOI 10.1194/jlr.M060343

Niemann-Pick type C (NPC; MIM#257220) is a progressive neurodegenerative disease caused by a disorder in the intracellular trafficking of cholesterol that leads to a lysosomal/endosomal accumulation of unesterified cholesterol and glycolipids in many tissues (1–3). The detection of free cholesterol accumulation by filipin staining in fibroblasts has been for many years the gold standard methodology for the biochemical diagnosis of the disease. This method has good sensitivity and specificity. However, juvenile or adult onset forms sometimes present interpretation difficulties (4). In addition, the method involves an invasive skin biopsy and the culture of fibroblasts that requires several weeks for the cellular growth, which delays the diagnosis. Some studies in cellular and animal models showed a correlation between lipid accumulation and cellular oxidative stress that produces an increase of reactive oxygen species and lipid peroxidation (5–8). In the NPC murine model, an increase of two oxysterols, cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol (CT) and 7-ketocholesterol (7-KC), has been observed (8). This evidence was later confirmed in NPC patients (8–13), showing a correlation between the oxysterol profile and the age of onset and severity of the disease (8, 14). Moreover, CT specifically has been found to be increased in NPC disease compared with other lysosomal and neurodegenerative diseases (8). These results

Abbreviations: 7-KC, 7-ketocholesterol; 7-KC-d₇, 7-ketocholesterol-25,26,26,26,27,27,27-d₇; AUC, area under receiver-operating characteristic curve; BHT, butylhydroxytoluene; CI, confidence interval; CT, cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol; CT-d₇, cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol-25,26,26,26,27,27,27-d₇; CTX, cerebrotendinous xanthomatosis; % CV, percentage coefficient of variation; LAL, lysosomal acid lipase; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; LSD, lysosomal storage disease; MRM, multiple reaction monitoring; NPC, Niemann-Pick type C; ROC, receiver-operating characteristic; SLO, Smith-Lemli-Opitz.

¹ To whom correspondence should be addressed.

e-mail: aribes@clinic.ub.es

[§] The online version of this article (available at <http://www.jlr.org>) contains a supplement.

Copyright © 2015 by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

This article is available online at <http://www.jlr.org>

suggest that CT and 7-KC might be good biomarkers for the diagnosis, prognosis, and probably therapeutic monitoring of NPC patients.

Over time different analytical methods have been described for the determination of oxysterols in plasma (9, 15–24). Recently, other authors (12, 13) developed new methods for the analysis of CT and 7-KC and confirmed previous results for the diagnosis of NPC disease. Based on this evidence, we aimed to investigate plasma CT and 7-KC not only in NPC patients but also in other patients that might potentially have an increase of CT and 7-KC in order to know the specificity and sensitivity of these biomarkers, as well as the possible pitfalls for the diagnosis of NPC disease.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

A total of 107 EDTA plasma samples obtained from children and adults, which were referred to our center for metabolic study and were not diagnosed with an inborn error of metabolism, were used as age-matched controls. EDTA plasma samples of 122 patients were studied including the following pathologies: 16 patients with NPC [the biochemical, molecular, and clinical data are summarized in supplementary Table 1 (25–28)]; 3 patients were under treatment with miglustat (patients 13, 15, and 16), and pretreatment samples were not available; 11 patients with lysosomal storage diseases (LSDs) including Fabry ($n = 5$), metachromatic leukodystrophy ($n = 2$), mucopolipidosis II/III ($n = 1$), and lysosomal acid lipase (LAL) deficiency ($n = 3$); 5 patients with galactosemia; 11 patients with cerebrotendinous xanthomatosis (CTX); 14 patients with peroxisomal disorders (including peroxisomal β -oxidation and biogenesis disorders); and 3 patients with Smith-Lemli-Opitz (SLO). Moreover, we analyzed plasma samples from 19 patients with hepatic disease (jaundice of prematurity, neonatal cholestasis, hepatosplenomegaly, and liver disease), 30 patients with neurological involvement (ataxia, gait disturbance, behavioral disorders, and language disorders) with no evidence of an inherited metabolic disease, and 13 patients with familial hypercholesterolemia with cholesterol in the range of 221–310 mg/dl (adult patients, $n = 5$) and 308–403 mg/dl (pediatric patients, $n = 8$). All the samples were collected and stored at -80°C until analysis.

Samples were obtained in accordance with the Helsinki Declaration of 1964, as revised in 2000. Informed consent was obtained from the patients or patients' parents.

Extraction, derivatization, and HPLC-ESI-MS/MS

The extraction procedure was performed according to Jiang et al. (9) with some modifications. Briefly, 50 μl of plasma was mixed with 150 μl of methanol that included a mixture of internal standards, cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol-25,26,26,27,27-d₇ (CT-d₇) and 7-ketocholesterol-25,26,26,26,27,27-d₇ (7-KC-d₇), at a concentration of 100 ng/ml. The mixture was vortexed for 30 s and centrifuged during 10 min at 16,100 g . The dried supernatant was derivatized using 20 μl 0.5 M of *N,N*-dimethylglycine hydrochloride (DMG)/2M 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP) in chloroform and 20 μl of *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimide (EDC) in chloroform during 1 h at 45°C in a shaking water bath. The dimethylglycine derivatives were extracted using a mixture of hexane-water (2:1). The organic phase was transferred to a clean tube, evaporated to dryness under nitrogen, and finally reconstituted with 250 μl of acetonitrile-water (70:30); 50 μl of the mixture was injected into the HPLC-ESI-MS/MS (Waters-Micromass model

Quattro micro™ API). To optimize the derivatization reaction, three different concentrations of CT and 7-KC (50, 200, and 2,500 ng/ml) with plasma matrix at different incubation times (30 min, 1 h, 1.5 h, 2 h, 2.5 h, 3 h, and 3.5 h) were studied.

The chromatographic separation was performed on a Symmetry®C₁₈ column (2.1 mm \times 50 mm, 3.5 μm ; Thermo Fisher Scientific). The mobile phase consisted of 1 mM ammonium formate in water (mobile phase A) and 1 mM ammonium formate in acetonitrile-water (95:5) (mobile phase B), both adjusted with formic acid to pH 3. The step gradient used increased linearly from 40% B to 80% B in 4 min, then to 100% during the next 1 min, followed by 40% during 1 min. The flow rate was 0.5 ml/min and the column temperature was 45°C . The mass spectrometer was operated in the electrospray positive ion mode using multiple reaction monitoring (MRM) mode. In our hands, the bis-dimethylglycine derivative of CT was not found. The corresponding $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ ion at m/z 591 and $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ ion at m/z 296 of the bis derivative were observed in negligible amounts. Because both target molecules can be formed ex vivo, we should find a reason to explain the discrepancies. One of the reasons could be the lower sensitivity of ESI compared with the atmospheric pressure chemical ionization (APCI) used by Jiang et al. (9) or the fact that perhaps the bis derivative is formed when using more drastic conditions of dryness of the reagents. However, as a prominent peak of monoderivative CT was detected, we decided to monitor the transitions 506 > 104 and 486 > 104 of the monodimethylglycine derivatives of CT and 7-KC, as well as 513 > 104 and 493 > 104 of the corresponding deuterated internal standards. Nitrogen and argon were used as nebulizing and collision gas, respectively. Dwell time for each transition was 200 ms, and the interchannel delay was 20 ms. Run time was 6.1 min. The following instrumental settings were used: source temperature, 150°C ; desolvation temperature, 500°C ; and capillary voltage, 3.2 kV. Data acquisition and data analyses were performed using MassLynx™ (V3.2) software. The quantification of the mono-dimethylglycine derivatives of CT and 7-KC was relative to the internal standards (CT-d₇ and 7-KC-d₇, respectively). External calibration curves were used.

To select the appropriate detection conditions and to optimize the mass spectrometer parameters, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of CT, CT-d₇, 7-KC, and 7-KC-d₇ were derivatized with dimethylglycine and monitored in the positive ion mode. To obtain the precursor and product ions, different cone voltage (10, 15, 20, 25, 30, and 35 V) or collision energy (10, 15, 20, 25, and 30 eV) in full scan or in daughter scan mode were tested.

Reagents

CT and CT-d₇ were purchased from Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canada), and 7-KC and 7-KC-d₇ from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Formic acid, ammonium formate, butylhydroxytoluene (BHT), DMG, EDC, and DMAP were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Methanol, acetonitrile, and hexane (LC/MS PAI grade) were obtained from Panreac (Barcelona, Spain), and chloroform from EMD Millipore Corporation (Madrid, Spain).

Selectivity

To know the interferences of the plasma matrix, five independent plasma samples with and without added internal standards were studied.

Linearity

A stock solution of 1 mg/ml of CT and 7-KC in methanol were prepared. Serial dilutions were prepared from a working solution (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) at concentrations of 3, 6, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400,



and 800 ng/ml with or without added plasma matrix. Standard samples were processed five times and analyzed as samples. Calibration curves were constructed by linear regression analysis of the ratio of CT/CT-d₇ and 7-KC/7-KC-d₇ areas to the corresponding concentrations.

Limit of detection and quantification

Successive dilutions of CT and 7-KC were measured to estimate the limit of detection (LOD) from a signal-to-noise (S/N) ratio of 3, and the limit of quantification (LOQ) from S/N ratio >10. All the analyses were performed in triplicate.

Imprecision and accuracy

The within-day imprecision (% coefficient of variation [% CV]) and accuracy were evaluated by performing 10 analyses of a spiked plasma matrix with standards at concentrations of 12.5, 100, and 800 ng/ml in the same day. To assess the between-day imprecision and accuracy, plasma matrix spiked with standards (12.5, 100, and 800 ng/ml) were processed in 10 independent preparations in different days. The accuracy was expressed as the percent relative error, calculated as mean concentration subtracting the theoretical concentration, divided by the theoretical amount, and multiplied by 100.

Recovery

Recovery was evaluated by adding known amounts of CT and 7-KC (25, 200, and 400 ng/ml) to a pooled plasma sample. All the analyses were performed in triplicate.

Sample stability

To assess sample stability, we used five different plasma samples from NPC patients. Two aliquots of each were prepared with and without the addition of BHT (0.1 mM). Freeze-thaw effects on CT and 7-KC were studied using three samples of plasma from NPC patients. Samples were frozen at -80°C and thawed at room temperature for ~ 2 h. One aliquot of 50 μl was taken from each sample and analyzed, then the initial sample was refrozen at -80°C . This cycle was repeated six times to yield six freeze-thaw samples. Stability of the processed samples was also studied by reinjecting the derivatized extract once a day during 5 days stored both at room temperature and at -20°C .

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 6 software and PASW Statistics 18.0. The unpaired nonparametric Mann-Whitney *U*-test was used to evaluate the significance of differences among different age groups in controls (with the exception of those age-matched groups with size ≥ 30 samples, for which the Student's *t*-test was used) and between patients and controls. Correlations between total cholesterol and CT and 7-KC levels were assessed using Spearman's correlation analysis. The diagnostic capacity of plasma CT and 7-KC was assessed by 2×2 contingency table. Receiver-operating characteristic (ROC) curve was constructed, and the area under ROC curve (AUC) was calculated to evaluate the discriminatory capability of plasma CT and 7-KC. A *P* value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Method validation

We could not validate the method proposed by Jiang et al. (9). We tried several MS/MS conditions, at different concentrations and several incubation times, but in none of them

could we find any daughter ion of the bis-dimethylglycine derivative of CT reported by these authors. We therefore decided to monitor the mono-dimethylglycine derivative of CT, and it was very prominent, as was that for 7-KC and the corresponding deuterated internal standards. Consequently, we modified the methodology of Jiang et al. (9) and validated our own method. The precursor ion peaks of CT, CT-d₇, 7-KC, and 7-KC-d₇ at *m/z* 506, 513, 486, and 493 were identified, and the most important daughter for each one was at *m/z* 104 (Fig. 1). Accordingly, the corresponding MRM modes (*m/z* 506 > 104, 513 > 104, 486 > 104, 493 > 104) were monitored. The derivatization yield for both CT and 7-KC was constant at different times and at the three different concentrations (supplementary Fig. 1). Consequently, 1 h incubation was considered enough to achieve a good compromise between a complete derivatization and a reduction of the total time of sample preparation.

The optimized MS parameters in the MRM mode and the chromatographic separation of the four compounds are shown in Fig. 2. CT and CT-d₇ eluted from the column at the retention time of 4 min, and 7-KC and KC-d₇ at 4.2 min.

The selectivity assay was performed both in methanol and plasma, and no significant interferences from endogenous substances at these retention times or at the corresponding MRM channels (supplementary Fig. 2A, B) were found. Interferences from the internal standards were also ruled out (supplementary Fig. 2C, D).

The calibration curve prepared in plasma matrix had similar slope and intercept as that prepared in methanol-water (Table 1). Consequently, plasma matrix was chosen in order to have the best similarity between standards and samples. The calibration curve from 3 to 800 ng/ml for CT and 7-KC showed a linear regression of $r^2 \geq 0.9908$. The LOD of the assay was 1 ng/ml, and the LOQ was 3 ng/ml for both compounds. The within-day and between-day imprecision was <6% for CT and <8% for 7-KC. The within-day and between-day accuracy was <9% and <6% for CT and <5% and <7% for 7-KC, respectively. The recovery was >91% for CT and >94% for 7-KC. All the validation data are shown in Table 2.

To avoid autoxidation of cholesterol during sample preparation, we added the antioxidant BHT to the plasma samples of NPC patients, but the addition of this antioxidant did not show remarkable changes of both CT and 7-KC as compared with samples lacking BHT (supplementary Fig. 3A). NPC samples kept at -80°C under six freeze-thaw cycles were reasonably stable showing a % CV <6% and <11% for CT and 7-KC, respectively (supplementary Fig. 3B). The derivatized samples were stable at -20°C for 44 days (supplementary Fig. 3C), and they were stable at least during 5 days if maintained at room temperature (supplementary Fig. 3D).

Subjects' study

Controls. We studied 107 control samples from donors aged 1 day to 55 years (mean of age, 9.7 years). Concerning CT concentration, no significant differences with age were found (95% confidence interval [CI], 3.5–4.4 ng/ml), whereas 7-KC concentration was significantly lower in

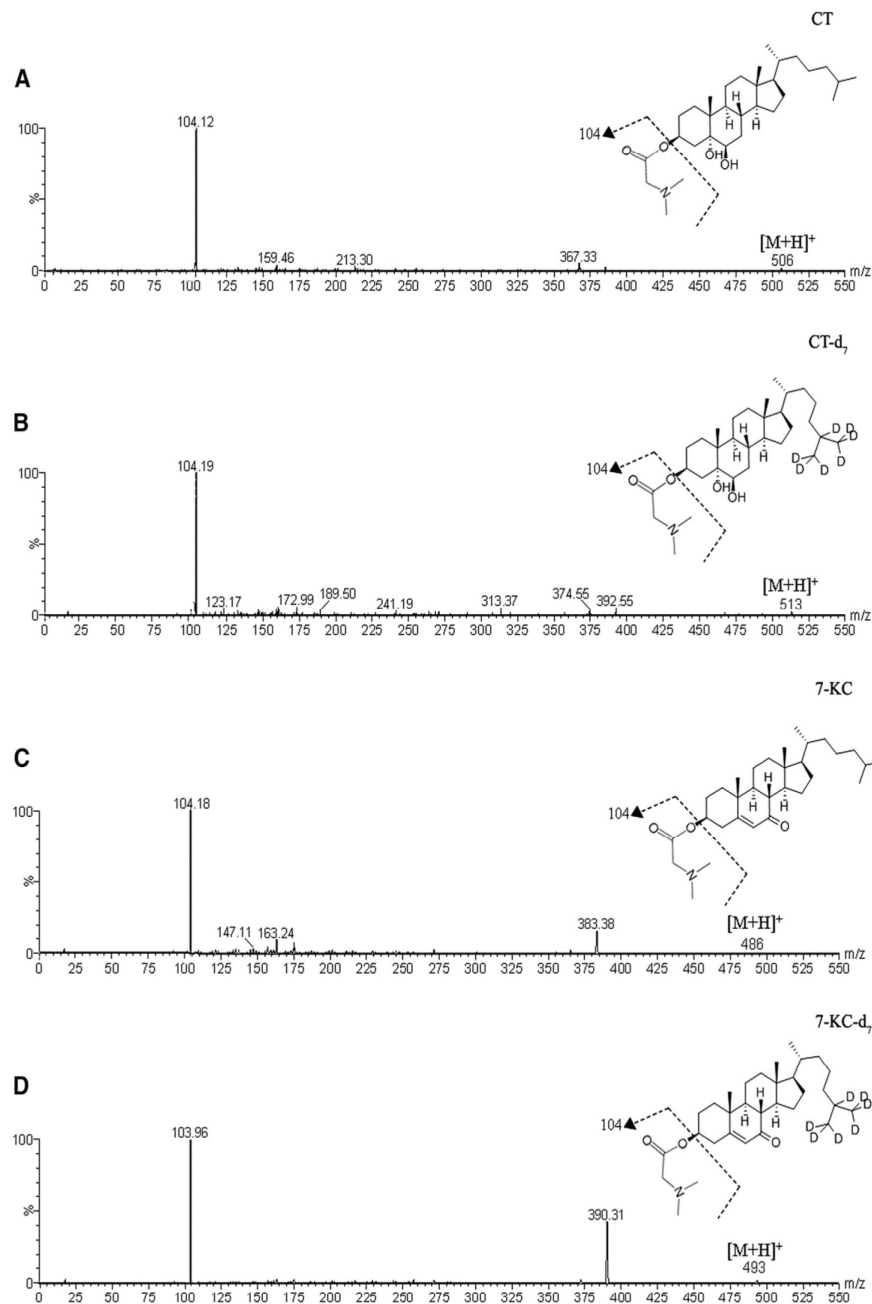


Fig. 1. ESI-MS/MS product ion spectra from the corresponding precursor ions. A: CT (m/z 506). B: CT- d_7 (m/z 513). C: 7-KC (m/z 486). D: 7-KC- d_7 (m/z 493).

children than in the adult group (95% CI, 10.2–12.4 ng/ml vs. 14–19.5 ng/ml, respectively; $P < 0.0001$; **Fig. 3A**).

NPC patients. Plasma samples of all patients showed significant differences for both CT and 7-KC compared with controls (95% CI for CT, 62–275 ng/ml vs. 3.5–4.4 ng/ml, $P < 0.0001$; 95% CI for 7-KC, 178–795 ng/ml vs. 11.8–14,

$P < 0.0001$; **Fig. 3B**). A negative correlation between CT and 7-KC levels and the age of disease onset was observed (**Fig. 3C**). The highest levels of CT and 7-KC (>400 ng/ml and >1,400 ng/ml, respectively) were found in patient 1, patient 2, and patient 3 presenting the neonatal form of the disease (supplementary Table 1), followed by patients presenting the severe infantile form (CT range, 64–158 ng/ml, and 7-KC

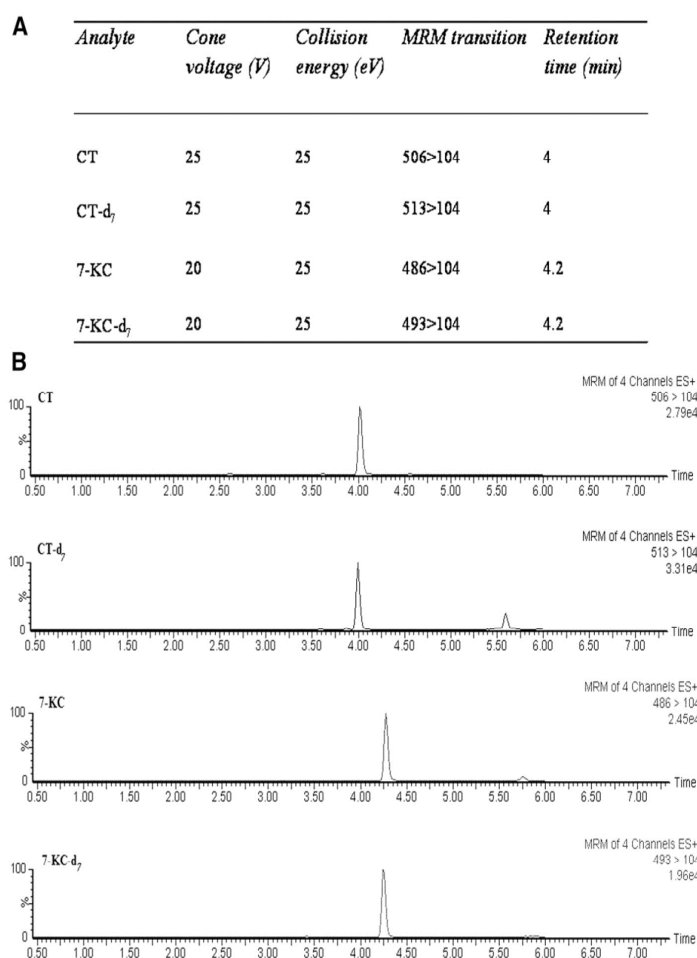


Fig. 2. Optimized MS parameters in the MRM mode and chromatographic separation of CT and 7-KC. Optimized MS parameters for the detection of each oxysterol (A) and MRM extracted ion chromatograms of CT, CT-d₇, 7-KC, and 7-KC-d₇ (B).

range, 164–505 ng/ml) (Fig. 3C). Patients with late infantile, juvenile, and adult forms present lower CT and 7-KC concentrations (range, 34–98 ng/ml and 73–203 ng/ml, respectively) (Fig. 3C; supplementary Table 1). All the patients but patients 11 and 13 presented the classical biochemical phenotype. Patients 11 and 13, with the juvenile form of the disease, presented a variant biochemical phenotype that was difficult to diagnose with the classical filipin staining, but CT and 7-KC concentrations were significantly higher (CT, 51 and 98 ng/ml; 7-KC, 111 and 183 ng/ml) compared with age-matched controls (supplementary Table 1). In addition, it is interesting to mention the case of one asymptomatic patient (patient 7) presenting the classical filipin staining and significantly high CT and 7-KC concentrations (CT, 57 ng/ml, and 7-KC, 122 ng/ml; supplementary Table 1).

Other LSDs. With the aim to know the possible overlapping of both compounds with other LSDs we analyzed samples of Fabry, metachromatic leukodystrophy, mucopolipidosis II/III, and LAL deficiency. Plasma CT concentration in

these patients was in the control range except for patients with LAL deficiency showing CT levels overlapping with those observed in different clinical phenotypes of NPC except the neonatal form (10.7, 22.2, and 49.3 ng/ml, respectively); 7-KC was high in all LSDs tested (mean, 77.7 ng/ml; range, 29.6–178; Fig. 3D).

Peroxisomal disorders. Patients with peroxisomal β -oxidation and biogenesis disorders showed normal CT, but some of the patients presented high levels of 7-KC (Fig. 3D).

TABLE 1. Calibration curves prepared both in methanol-water and plasma

Matrix	Slope	Intercept	r ²
CT			
Methanol-water	0.0076	0.048	0.998
Plasma	0.0077	0.07	0.998
7-KC			
Methanol-water	0.0079	0.074	0.995
Plasma	0.0081	0.079	0.996

TABLE 2. Validation results of CT and 7-KC by HPLC-ESI-MS/MS

	CT		7-KC	
	Imprecision (% CV)	Accuracy (%)	Imprecision (% CV)	Accuracy (%)
Calibration curve, n = 5				
Mean slope (range; SD)	0.0080 (0.0074–0.0089; 0.0006)		0.0044 (0.0037–0.0049; 0.0005)	
Mean intercept (range; SD)	0.39 (0.29–0.44; 0.061)		0.10 (0.09–0.12; 0.013)	
Mean coefficient of linear regression, r^2 (range; SD)	0.9908 (0.9830–0.999; 0.006)		0.9926 (0.9817–0.9975; 0.0058)	
Within day, n = 10				
12.5 ng/ml	5.5	3.8	5.5	0.3
100 ng/ml	3.6	1.7	4.4	3.7
800 ng/ml	2.4	8.9	3.9	4.4
Between day, n = 10				
12.5 ng/ml	5.8	1.5	5.8	4
100 ng/ml	5.8	5.3	7.9	6.4
800 ng/ml	2.9	0.5	7.7	5.4
Recovery (%), n = 3				
25 ng/ml	94.4		94	
200 ng/ml	98.2		107	
400 ng/ml	91.8		100.7	
LOD (ng/ml), n = 3	1		1	
LOQ (ng/ml), n = 3	3		3	

Sterol disorders. Patient with SLO syndrome showed normal CT, but the levels of 7-KC were high in all three patients (Fig. 3D). All CTX patients showed high levels of CT and 7-KC (CT mean, 43.7 ng/ml, and range, 25.4–88.6; 7-KC mean, 830 ng/ml, and range, 137–1,529) clearly overlapping with NPC patients (Fig. 3D). It is interesting to remark that a big peak eluting prior CT was detected in all CTX patients (Fig. 4). CT and this peak share the same molecular ion (m/z 506) and the same prominent daughter ion (m/z 104) (Fig. 4) and fit well with the triol ($3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -trihydroxycoprostanol) already described to be found in CTX (29). Interestingly, we have evaluated four CTX patients before and after treatment with chenodeoxycholic acid, and as expected, $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -trihydroxycoprostanol and 7-KC showed an impressive decrease, but the levels of CT remained unchanged (Table 3).

Patients with other disorders. Patients with galactosemia, unspecific hepatic diseases, or different neurological affection and patients with familial hypercholesterolemia all showed CT and 7-KC within the control range (Fig. 3D).

Correlation between total cholesterol and high levels of CT and 7-KC in plasma

Spearman's correlation analysis including all the patients available (NPC, CTX, and LAL deficiency) was assessed and showed a moderate negative correlation between total cholesterol and CT ($r = -0.679$, $P < 0.0001$), and between total cholesterol and 7-KC ($r = -0.687$, $P < 0.0001$; supplementary Fig. 4).

Sensitivity and specificity

To assess the performance of plasma CT as a potential biomarker for patients with NPC, we calculated test sensitivity and specificity. The contingency table for the diagnostic capacity showed high sensitivity (100%) and an acceptable specificity (88.7%) (cutoff threshold of ≥ 8 ng/dl). These results indicate an absence of false negatives and

a mild percentage of false positives (11.3%). ROC curve used to determine the discriminatory capability of CT between NPC patients and healthy subjects showed that plasma CT has a high detection capability (AUC = 0.992, $P < 0.05$). Concerning 7-KC, sensitivity and specificity were 100% and 79.8%, respectively (cutoff threshold of ≥ 22.8 ng/dl for age < 18 years and ≥ 34.5 ng/ml for age ≥ 18 years), without a false-negative percentage, but with a mild rate (20.2%) of false positives (AUC = 0.932, $P < 0.05$).

DISCUSSION

The first approach for the diagnosis of NPC is clinical suspicion, and the gold standard methodology for the biochemical diagnosis is filipin staining in cultured fibroblasts (1–3). However, this method is time consuming, and some forms of the disease present interpretation difficulties. Therefore, it is desirable to have the concurrence of other methods or other biomarkers to help the diagnosis of this disease. Recent studies have shown that plasma CT and 7-KC could be potential biomarkers for the diagnosis of NPC patients (8–13). We aimed to determine the sensitivity and specificity of these biomarkers for the diagnosis of NPC compared with patients suffering from other lysosomal, peroxisomal, or sterol disorders, or other patients with hepatic or neurological alterations, as well as patients with familial hypercholesterolemia.

To this aim, we initially followed the method described by Jiang et al. (9), but we could not validate it. We tried several MS/MS conditions, at different concentrations and several incubation times, but in none of them could we find appreciable amounts of the bis-dimethylglycine derivative of CT reported by these authors. On the contrary, we detected predominantly the mono-dimethylglycine derivative of CT. In agreement with our findings, Boenzi et al. (12) also showed that the bis-derivative of CT was not formed, although the derivatization reagent was

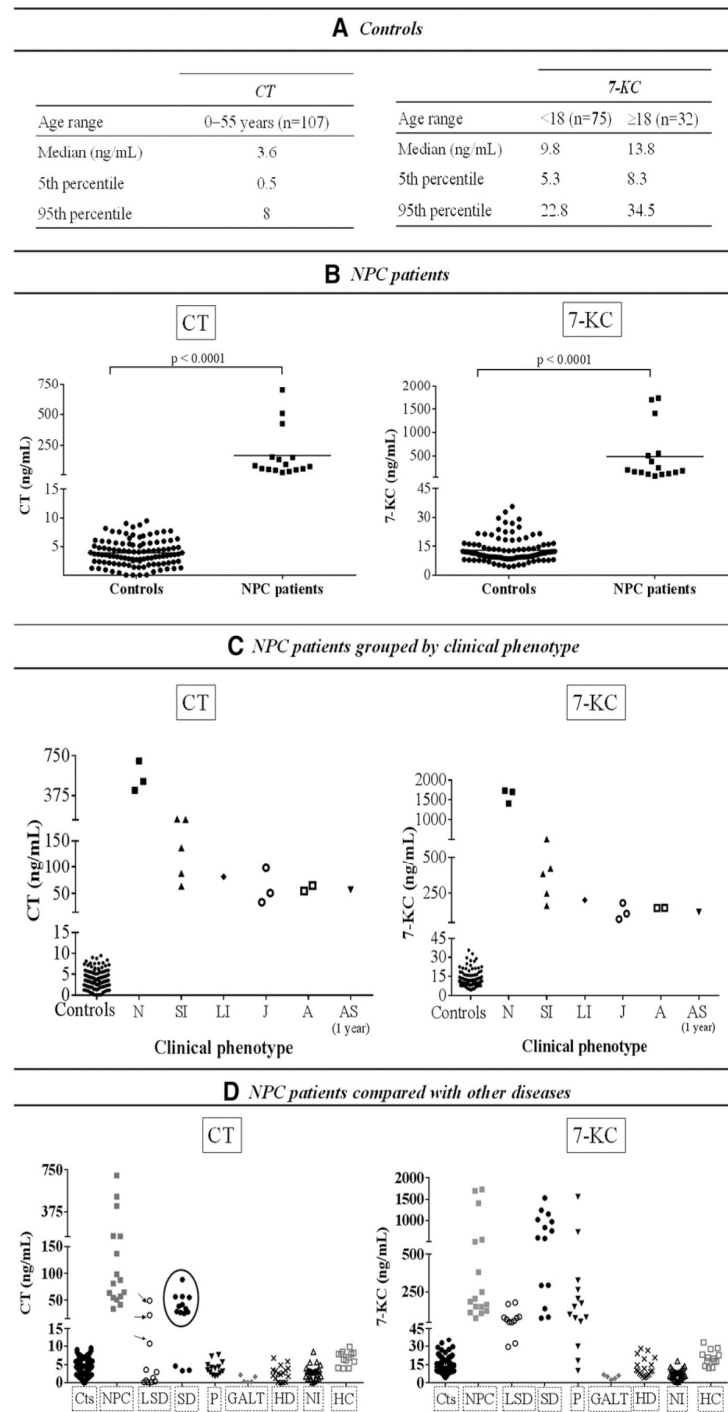


Fig. 3. Plasma CT and 7-KC concentration in controls, NPC patients, and other diseases. A: CT and 7-KC concentration in controls: reference values by age range. B: CT and 7-KC in NPC patients. C: NPC patients grouped by clinical phenotype. D: NPC patients compared with other diseases: LSD [metachromatic leukodystrophy (n = 2), mucopolipidosis II/III (n = 1), and LAL-deficient patients (n = 3)]; sterol disorders [CTX (n = 11) and SLO (n = 3)]; peroxisomal β -oxidation or biogenesis disorders (n = 14); galactosemia (n = 5); hepatic diseases (n = 19); patients with neurological involvement (n = 30); and patients with familial hypercholesterolemia (n = 13). Black arrow indicates LAL-deficient patients. Black circle indicates CTX patients. A, adult; AS, asymptomatic; Cts, controls; GALT, galactosemia; HC, hypercholesterolemia; HD, hepatic diseases; J, juvenile; LI, late infantile; N, neonatal; NI, neurological involvement; P, peroxisomal diseases; SD, sterol disorders; SI, severe infantile. Significant differences were considered when $P < 0.05$.

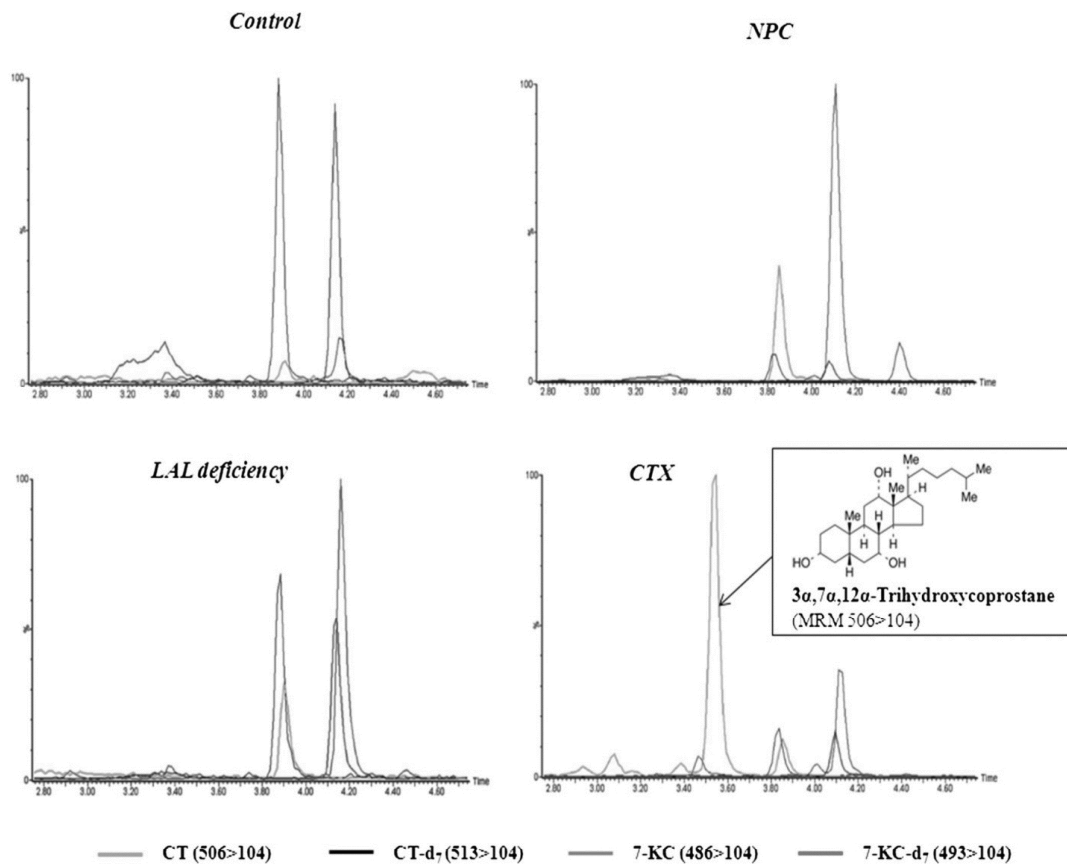


Fig. 4. Plasma MRM of control, NPC, CTX, and LAL deficiency. MRM-extracted ion chromatograms of CT (506 > 104), CT-d₇ (513 > 104), 7-KC (486 > 104), and 7-KC-d₇ (493 > 104) in a control, LAL-deficient patient, NPC patient, and CTX patient. CTX patient showed a peak with the same 7-KC transition that eluted at 3.46 min (blue line) and is probably 7- α -hydroxycholest-4-en-3-one.

different. Our method showed a good analytical performance with the capability to discriminate between patients and controls. We have demonstrated that CT monoderivative and 7-KC monoderivative are stable compounds in a wide range of concentrations and temperatures. Therefore, both compounds in their monoderivative form were good analytes to be used for the purpose of this study. In addition, HPLC-MS/MS with ESI is an instrument available in most laboratories, whereas APCI (9) is not. Therefore, our method and also the method described by Boenzi et al. (12) represent an advantage as they facilitate the general use of laboratories working in the diagnosis of in-

herited metabolic diseases. We would like to emphasize that we participate in the external quality control program "Special Assays in Serum" managed by ERNDIM (www.erndimq.nl), which includes CT and 7-KC. The mean value obtained with the present method fits very well with the mean value obtained by other laboratories using other methods (data not shown).

Concerning NPC patients, a positive correlation between CT and 7-KC profile and the clinical severity of the disease was found. These results are in agreement with those reported by other authors (8, 14). The neonatal form presented with the highest levels of both oxysterols, whereas

TABLE 3. Levels of CT, 3 α ,7 α ,12 α -trihydroxycoprostanone, and 7-KC before and after chenodeoxycholic treatment in CTX patients

CTX Patient	CT		3 α ,7 α ,12 α -Trihydroxycoprostanone		7-KC	
	Pre-T	Post-T	Pre-T	Post-T	Pre-T	Post-T
CTX-1	28	35	1,251	24	596	38
CTX-2	57	88	1,732	363	838	112
CTX-3	57	47	3,101	29	1,021	51
CTX-4	55	48	2,588	121	1,529	56

T, treatment. Values are expressed as ng/ml.

these levels were intermediate in the severe infantile form and were much lower in the late infantile, juvenile, and adult forms (Fig. 3C). Moreover, two patients with the variant biochemical phenotype (patients 11 and 13) included in our study showed high CT and 7-KC, close to the levels of patients with the classical phenotype. Consequently, the method appears useful to identify those cases with doubtful filipin staining, including the adult presentation and the asymptomatic form of the disease. These data are remarkable because few correlations between CT and 7-KC and the biochemical and clinical phenotypes have been previously published (14).

To determine the specificity of these biomarkers, we studied other diseases that might potentially have high levels of CT and 7-KC. In fact, high levels of 7-KC were found in all lysosomal diseases tested. These results are in agreement with a previous study showing elevated 7-KC in patients with Gaucher and infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (8). However, CT was only high in patients with LAL deficiency, overlapping with the adult and the infantile form of NPC (Fig. 3D). These results support the data previously reported at the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism (SSIEM) meeting in one patient (30) with LAL deficiency and those reported many years ago (31, 32) showing accumulation of oxygenated esteryl esters, including 7-ketocholesteryl esters, 5,6- α -epoxycholesteryl esters, and 5,6- β -epoxycholesteryl esters in liver, spleen, and adrenal samples of patients with LAL deficiency. In addition, Amraoui et al. (30) and Klinke et al. (13) also reported an increase of CT and 7-KC in Niemann-Pick type A and B (NPA/NPB) patients. Therefore, levels of CT and 7-KC were higher than normal not only in NPC but also in other lysosomal lipidosis. The primary product of cholesterol autoxidation is cholesterol-5,6-epoxide (5,6-EC), which is then cleaved either enzymatically or nonenzymatically to give CT (15, 33–35). Moreover, a recent study suggested that CT would be a substrate for ABCG1 (36) involved in cellular export of oxysterols, sterols, phospholipids, and sphingomyelin, suggesting that ABCG1 would act as an oxysterol detoxification system removing CT from cells. All these findings could explain the high plasma levels of CT in these patients, which would result from intracellular 5,6-EC accumulation, their hydrolysis into CT, and their efflux to plasma via ABCG1. However, it remains to be known how 5,6-epoxycholesteryl esters could be transesterified.

Moreover, 7-KC was also high in patients with CTX and SLO syndrome, as has been previously described (37–39), but it is interesting to note that all CTX patients showed high plasma levels not only of 7-KC but also of CT (Fig. 3D), data not previously described, and a very big peak of another triol presumably of 3 α ,7 α ,12 α -trihydroxycoprostanol (Fig. 4). The MS/MS data of this compound fit very well with the identity of 3 α ,7 α ,12 α -trihydroxycoprostanol, in the metabolic pathway of cholic acid (40, 41); in addition, it is a substrate for sterol 27-hydroxylase activity that is deficient in CTX. On the other hand, this compound and 7-KC decreased dramatically after chenodeoxycholic treatment (Table 3), whereas CT remained unchanged. Therefore, it is quite clear that it is an

intermediate in cholic acid biosynthesis, and the most likely possibility is 3 α ,7 α ,12 α -trihydroxycoprostanol. This peculiar profile could be useful to distinguish CTX from NPC and other lipidosis. Moreover, our results suggest that 3 α ,7 α ,12 α -trihydroxycoprostanol would be a good biomarker for treatment monitoring.

Other patients with liver disease including cholestasis, galactosemia, neurologic symptoms, or familial hypercholesterolemia showed CT and 7-KC within the control range, which therefore will not interfere with the diagnosis of the diseases previously mentioned.

In conclusion, we have demonstrated that CT is a sensitive but not a specific biomarker of NPC disease. Moreover, the present procedure is quick and sensitive for the diagnosis of all NPC variants. Based on this evidence, we have included this approach in the first-line diagnostic algorithm of NPC disease in our laboratory. Therefore, we expect this inclusion will be of help to uncover new patients with not only NPC but also other diseases such as CTX, SLO, LAL deficiency, or NPA/NPB. ■

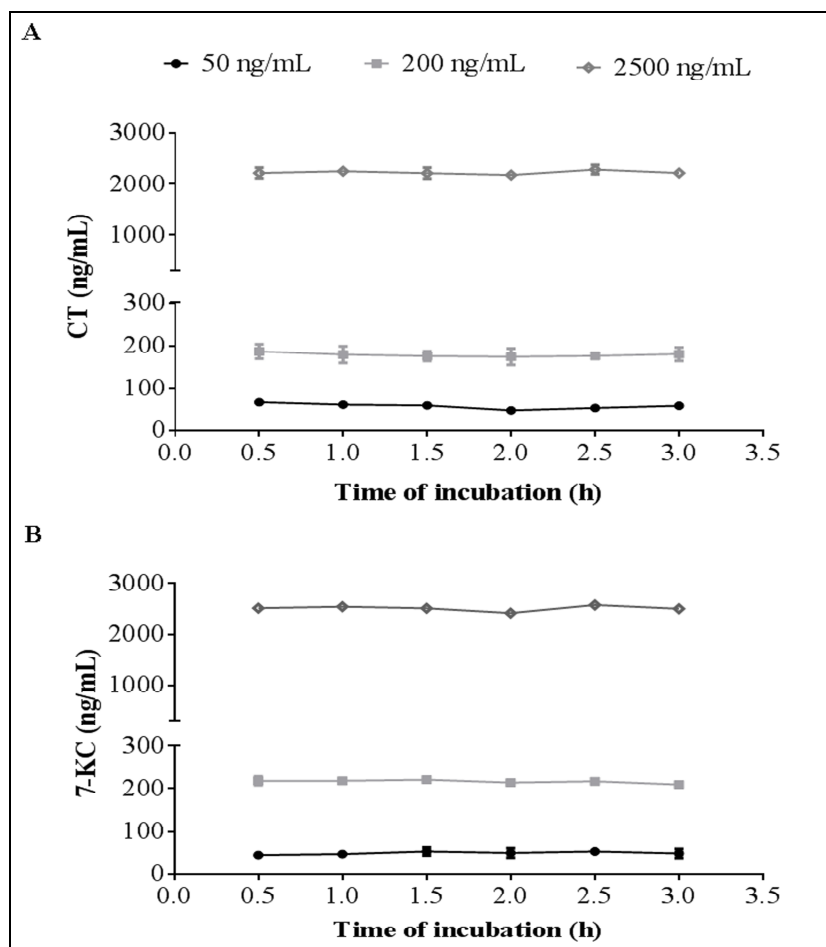
The authors thank Dr. Gregori Casals and Dr. Nayra Rico from Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clinic, and Dr. Rafael Artuch from Hospital Sant Joan de Deu who provided plasma samples from hypercholesterolemic patients.

REFERENCES

1. Vanier, M. T. 2010. Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J. Rare Dis.* **5**: 16.
2. Patterson, M. C., C. J. Hendriksz, M. Walterfang, F. Sedel, M. T. Vanier, and F. Wijburg; NP-C Guidelines Working Group. 2012. Recommendations for the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C: an update. *Mol. Genet. Metab.* **106**: 330–344.
3. Vanier, M. T. 2015. Complex lipid trafficking in Niemann-Pick disease type C. *J. Inherit. Metab. Dis.* **38**: 187–199.
4. Vanier, M. T., C. Rodriguez-Lafrasse, R. Rousson, N. Gazzah, M. C. Juge, P. G. Pentchev, A. Revol, and P. Louisot. 1991. Type C Niemann-Pick disease: spectrum of phenotypic variation in disruption of intracellular LDL-derived cholesterol processing. *Biochim. Biophys. Acta.* **1096**: 328–337.
5. Tint, G. S., P. Pentchev, G. Xu, A. K. Batta, S. Shefer, G. Salen, and A. Honda. 1998. Cholesterol and oxygenated cholesterol concentrations are markedly elevated in peripheral tissue but not in brain from mice with the Niemann-Pick type C phenotype. *J. Inherit. Metab. Dis.* **21**: 853–863.
6. Reddy, J. V., I. G. Ganley, and S. R. Pfeffer. 2006. Clues to neurodegeneration in Niemann-Pick type C disease from global gene expression profiling. *PLoS One.* **1**: e19.
7. Zampieri, S., S. H. Mellon, and T. D. Butters. 2009. Oxidative stress in NPC1 deficient cells: protective effect of allopregnanolone. *J. Cell. Mol. Med.* **13**: 3786–3796.
8. Porter, F. D., D. E. Scherrer, M. H. Lanier, S. J. Langmade, V. Molugu, S. E. Gale, D. Olzeski, R. Sidhu, D. J. Dietzen, R. Fu, et al. 2010. Cholesterol oxidation products are sensitive and specific blood-based biomarkers for Niemann-Pick C1 disease. *Sci. Transl. Med.* **2**: 56ra81.
9. Jiang, X., R. Sidhu, F. D. Porter, N. M. Yanjanin, A. O. Speak, D. T. te Vruchte, F. M. Platt, H. Fujiwara, D. E. Scherrer, J. Zhang, et al. 2011. A sensitive and specific LC-MS/MS method for rapid diagnosis of Niemann-Pick C1 disease from human plasma. *J. Lipid Res.* **52**: 1435–1445.
10. Lin, N., H. Zhang, W. Qiu, J. Ye, L. Han, Y. Wang, and X. Gu. 2014. Determination of 7-ketocholesterol in plasma by LC-MS for rapid diagnosis of acid SMase-deficient Niemann-Pick disease. *J. Lipid Res.* **55**: 338–343.

11. Zhang, H., Y. Wang, N. Lin, R. Yang, W. Qiu, L. Han, J. Ye, and X. Gu. 2014. Diagnosis of Niemann-Pick disease type C with 7-ketocholesterol screening followed by NPC1/NPC2 gene mutation confirmation in Chinese patients. *Orphanet J. Rare Dis.* **9**: 82.
12. Boenzi, S., F. Deodato, R. Taurisano, D. Martinelli, D. Verrigni, R. Carozzo, E. Bertini, A. Pastore, C. Dionisi-Vici, and D. W. Johnson. 2014. A new simple and rapid LC-ESI-MS/MS method for quantification of plasma oxysterols as dimethylaminobutyrate esters. Its successful use for the diagnosis of Niemann-Pick type C disease. *Clin. Chim. Acta.* **437**: 93–100.
13. Klinke G., M. Rohrbach, R. Giugliani, P. Burda, M. R. Baumgartner, C. Tran, M. Gautschi, D. Mathis, and M. Hersberger. 2015. LC-MS/MS based assay and reference intervals in children and adolescents for oxysterols elevated in Niemann-Pick diseases. *Clin Biochem.*
14. Stampfer, M., S. Theiss, Y. Amraoui, X. Jiang, S. Keller, D. S. Ory, E. Mengel, C. Fischer, and H. Runz. 2013. Niemann-Pick disease type C clinical database: cognitive and coordination deficits are early disease indicators. *Orphanet J. Rare Dis.* **8**: 35.
15. Kudo, K., G. T. Emmons, E. W. Casserly, D. P. Via, L. C. Smith, J. St Pyrek, and G. J. Schroepfer, Jr. 1989. Inhibitors of sterol synthesis. Chromatography of acetate derivatives of oxygenated sterols. *J. Lipid Res.* **30**: 1097–1111.
16. Teng, J. I., and L. L. Smith. 1995. High-performance liquid chromatographic analysis of human erythrocyte oxysterols as delta 4-3-ketone derivatives. *J. Chromatogr. A.* **691**: 247–254.
17. Dzeletovic, S., O. Breuer, E. Lund, and U. Diczfalusy. 1995. Determination of cholesterol oxidation products in human plasma by isotope dilution-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **225**: 73–80.
18. Schroepfer, G. J., Jr. 2000. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol. Rev.* **80**: 361–554.
19. Zhang, Z., D. Li, D. E. Blanchard, S. R. Lear, S. K. Erickson, and T. A. Spencer. 2001. Key regulatory oxysterols in liver: analysis as delta4-3-ketone derivatives by HPLC and response to physiological perturbations. *J. Lipid Res.* **42**: 649–658.
20. Griffiths, W. J., Y. Wang, G. Alvelius, S. Liu, K. Bodin, and J. Sjövall. 2006. Analysis of oxysterols by electrospray tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **17**: 341–362.
21. Jiang, X., D. S. Ory, and X. Han. 2007. Characterization of oxysterols by electrospray ionization tandem mass spectrometry after one-step derivatization with dimethylglycine. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**: 141–152.
22. Honda, A., K. Yamashita, H. Miyazaki, M. Shirai, T. Ikegami, G. Xu, M. Numazawa, T. Hara, and Y. Matsuzaki. 2008. Highly sensitive analysis of sterol profiles in human serum by LC-ESI-MS/MS. *J. Lipid Res.* **49**: 2063–2073.
23. Matsyk, S., and G. Schmitz. 2013. Application of gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry to the determination of sterol components in biological samples in consideration of the ionization mode. *Biochimie.* **95**: 489–495.
24. Griffiths, W. J., P. J. Crick, and Y. Wang. 2013. Methods for oxysterol analysis: past, present and future. *Biochem. Pharmacol.* **86**: 3–14.
25. Macías, J. 2012. Molecular Aspects of Both Lysosomal Transport Diseases: Cystinosis and Niemann-Pick Disease Type. MS Thesis. University of Barcelona, Barcelona, Spain.
26. Macías-Vidal, J., L. Rodríguez-Pascau, G. Sánchez-Ollé, M. Lluch, L. Vilageliu, D. Grinberg, and M. J. Coll; Spanish NPC Working Group. 2011. Molecular analysis of 30 Niemann-Pick type C patients from Spain. *Clin. Genet.* **80**: 39–49.
27. Macías-Vidal, J., L. Gort, M. Lluch, M. Pineda, and M. J. Coll. 2009. Nonsense-mediated mRNA decay process in nine alleles of Niemann-Pick type C patients from Spain. *Mol. Genet. Metab.* **97**: 60–64.
28. Fernandez-Valero, E. M., A. Ballart, C. Iturriaga, M. Lluch, J. Macias, M. T. Vanier, M. Pineda, and M. J. Coll. 2005. Identification of 25 new mutations in 40 unrelated Spanish Niemann-Pick type C patients: genotype-phenotype correlations. *Clin. Genet.* **68**: 245–254.
29. Oftebro, H., I. Björkhem, S. Skrede, A. Schreiner, and J. I. Pedersen. 1980. Cerebrotendinous xanthomatosis: a defect in mitochondrial 26-hydroxylation required for normal biosynthesis of cholic acid. *J. Clin. Invest.* **65**: 1418–1430.
30. Amraoui, Y., E. Mengel, and J. B. Hennermann. 2014. Oxysterols in Niemann-Pick type C: limitations of sensitivity and specificity (Abstract). *J. Inherit. Metab. Dis.* **37** (Suppl. 1): S150.
31. Assmann, G., D. S. Fredrickson, H. R. Sloan, H. M. Fales, and R. J. Highet. 1975. Accumulation of oxygenated sterol esters in Wolman's disease. *J. Lipid Res.* **16**: 28–38.
32. Fitoussi, G., A. Nègre-Salvayre, M. T. Pieraggi, and R. Salvayre. 1994. New pathogenetic hypothesis for Wolman disease: possible role of oxidized low-density lipoproteins in adrenal necrosis and calcification. *Biochem. J.* **301**: 267–273.
33. Björkhem, I. 2013. Five decades with oxysterols. *Biochimie.* **95**: 448–454.
34. Sevanian, A., and L. L. McLeod. 1986. Catalytic properties and inhibition of hepatic cholesterol-epoxide hydrolase. *J. Biol. Chem.* **261**: 54–59.
35. Silvente-Poirot, S., and M. Poirot. 2012. Cholesterol epoxide hydrolase and cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* **12**: 696–703.
36. Engel, T., M. Fobker, J. Buchmann, F. Kannenberg, S. Rust, J. R. Nofer, A. Schürmann, and U. Seedorf. 2014. 3 β ,5 α ,6 β -Cholestanetriol and 25-hydroxycholesterol accumulate in ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1)-deficiency. *Atherosclerosis.* **235**: 122–129.
37. Björkhem, I. 1986. Assay of unesterified 7-oxocholesterol in human serum by isotope dilution-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **154**: 497–501.
38. Burnett, J. R., E. A. Moses, K. D. Croft, A. J. Brown, K. Grainger, S. D. Vasikaran, E. Leitersdorf, and G. F. Watts. 2001. Clinical and biochemical features, molecular diagnosis and long-term management of a case of cerebrotendinous xanthomatosis. *Clin. Chim. Acta.* **306**: 63–69.
39. Björkhem, I., U. Diczfalusy, A. Lövgren-Sandblom, L. Starck, M. Jonsson, K. Tallman, H. Schirmer, L. B. Ousager, P. J. Crick, Y. Wang, et al. 2014. On the formation of 7-ketocholesterol from 7-dehydrocholesterol in patients with CTX and SLO. *J. Lipid Res.* **55**: 1165–1172.
40. Björkhem, I., H. Oftebro, S. Skrede, and J. I. Pedersen. 1981. Assay of intermediates in bile acid biosynthesis using isotope dilution-mass spectrometry: hepatic levels in the normal state and in cerebrotendinous xanthomatosis. *J. Lipid Res.* **22**: 191–200.
41. Honda, A., G. Salen, Y. Matsuzaki, A. K. Batta, G. Xu, E. Leitersdorf, G. S. Tint, S. K. Erickson, N. Tanaka, and S. Shefer. 2001. Differences in hepatic levels of intermediates in bile acid biosynthesis between Cyp27(–/–) mice and CTX. *J. Lipid Res.* **42**: 291–300.

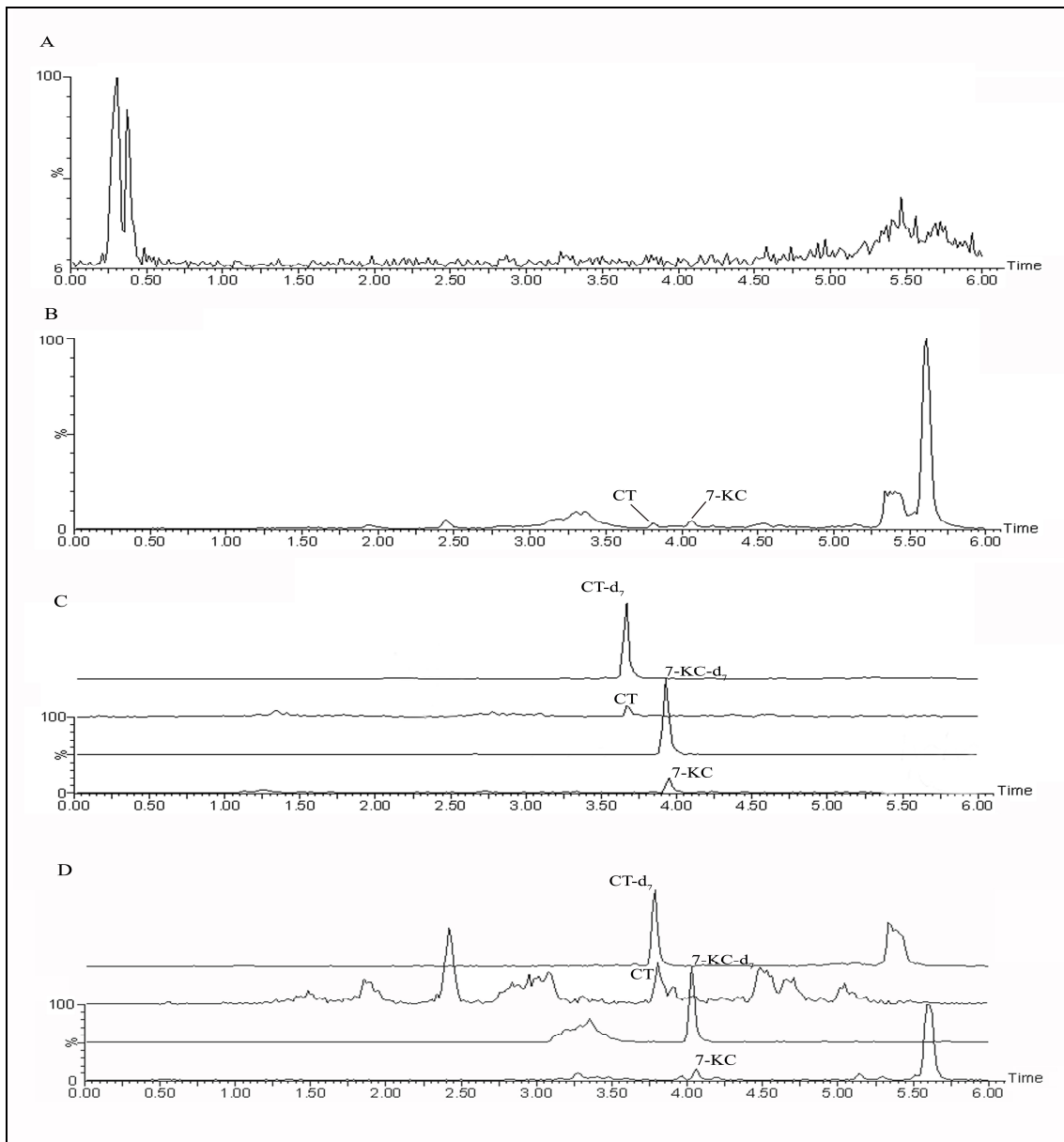
Supplemental Fig. 1. Mono-dimethylglycine derivatives of **(1A)** CT and **(1B)** 7-KC at different concentrations and times of incubation.



Samples (50, 200 and 2500 ng/mL) were incubated at 45°C in a shaking water bath (30 min, 1h, 1.5h, 2h, 2.5h and 3h). Experiments were performed in triplicate. CT: cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol; 7-KC: 7-ketocholesterol.

Supplemental Fig. 2. Selectivity of the assay for CT and 7-KC.

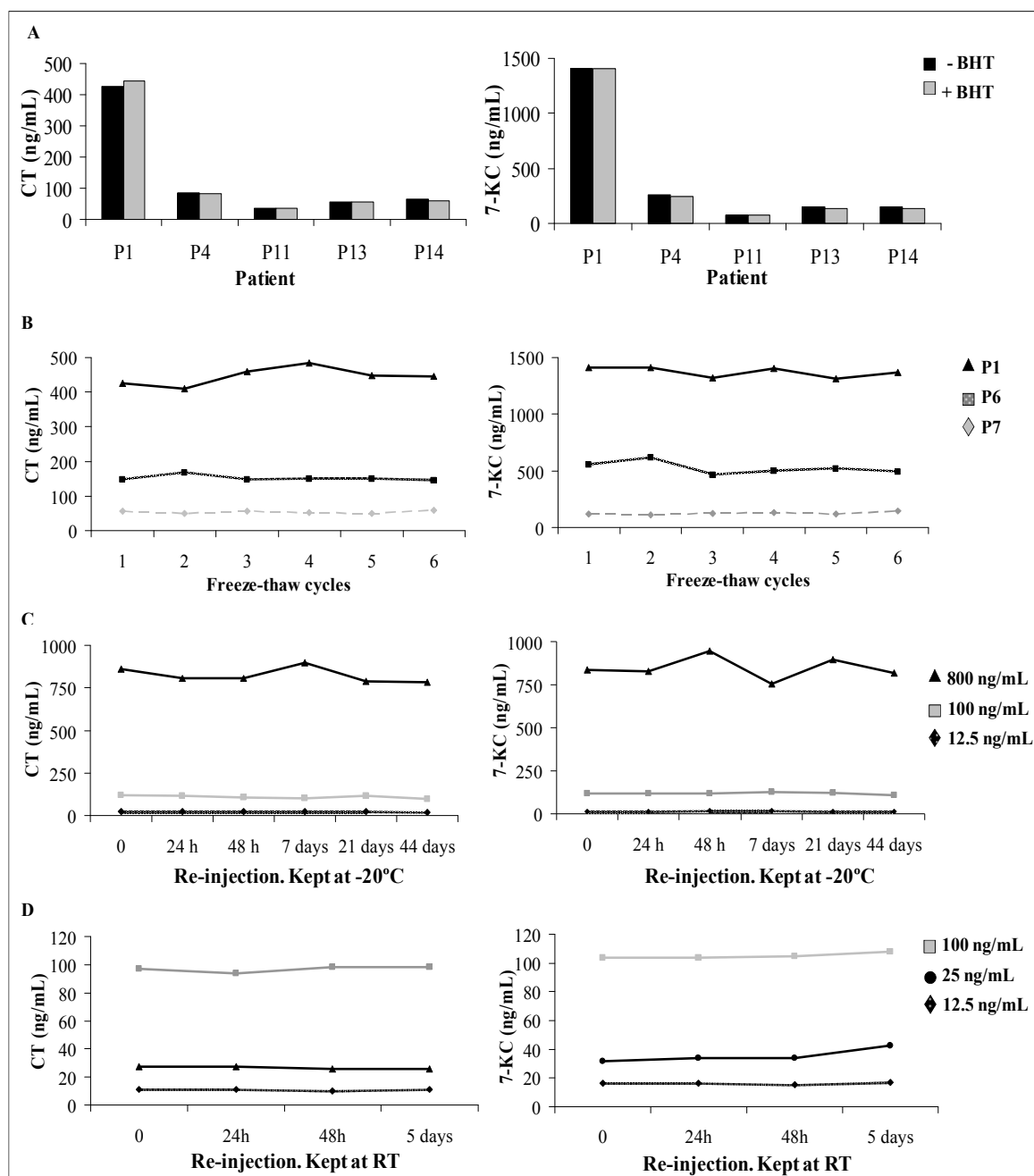
Selected chromatograms resulting from: **(2A)** analysis of methanol without internal standards; **(2B)** plasma control without internal standards; **(2C)** methanol with added CT and 7-KC as well as internal standards and **(2D)** plasma control with added internal standards.



Retention time for CT and CT-d₇ was 4 min and for 7-KC and 7-KC-d₇ was 4.2 min. The MRM channels were 506>104, 513>104, 486>104 and 493>104 for CT, CT-d₇, 7-KC and 7-KC-d₇ respectively. CT: cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol; CT-d₇: cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol-d₇; 7-KC: 7-ketocholesterol; 7-KC-d₇: 7-ketocholesterol-d₇.

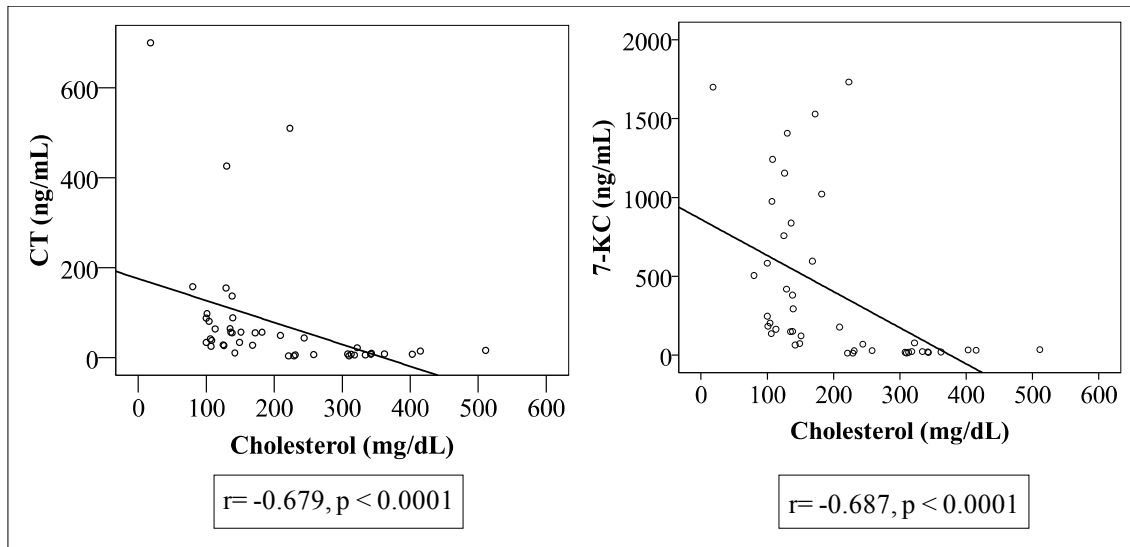
Supplemental Fig. 3. Sample stability of CT and 7-KC.

(3A) Stability in 5 plasma samples from NPC patients with and without addition of BHT; (3B) after 6 freeze-thaw cycles using 3 plasma samples from NPC patients; (3C) after derivatization and storage at -20°C and (3D) after derivatization and storage at room temperature.



CT: cholestane- $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triol; 7-KC: 7-ketocholesterol; BHT: butylhydroxytoluene; P: patient; RT: room temperature.

Supplemental Fig. 4. Correlation between high levels of CT and 7-KC and total cholesterol in NPC, CTX and LAL deficiency.



Correlation is represented as Spearman's correlation between CT and total cholesterol ($r=-0.679$, $p<0.0001$) and between 7-KC and total cholesterol ($r=-0.687$, $p<0.0001$). CT: cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol; 7-KC: 7-ketocholesterol.

Supplemental Table 1. Biochemical, molecular and clinical data of 16 NPC patients.

Patient ^a	Origin	Age of diagnosis	Age of oxysterols analysis	Clinical symptoms	Clinical phenotype ^c	Biochemical phenotype ^d	Mutation ^e	Effect on protein	CT (ng/mL)	7-KC (ng/mL)
P1	Spanish	2 months	2 months	Hepatosplenomegaly, malnutrition, renal cysts.	Neonatal	Classical	c.[274C>T]+[1024T>C]	p.[Gln92*]+[Trp342Arg]	426	1407
P2 ⁽²⁵⁾	Moroccan	3 months	3 months	Hepatosplenomegaly, neonatal jaundice, statural-ponderal delay.	Neonatal	Classical	c.[3746G>A]+[3746G>A]	p.[Ser1249Asn]+[Ser1249Asn]	700	1699
P3	Spanish	3 months	2 months	Hepatosplenomegaly, cholestasis, mild hypotonia.	Neonatal	Classical	In study	In study	510	1731
P4 ⁽²⁶⁾	Moroccan	11 months	2 years	Statural-ponderal delay, splenomegaly.	Severe infantile	Classical	c.[3557G>A]+[3557G>A]	p.[Arg1186His]+[Arg1186His]	64	164
P5 ⁽²⁷⁾	Spanish	11 months	5 years	Splenomegaly	Severe infantile	Classical	c.[2323C>T]+[1604G>T]	p.[Gln775*]+[Gly535Val]	158	505
P6 ⁽²⁵⁾	Spanish	1 year	2 years	Psicomotor delay, neonatal jaundice, hepatosplenomegaly, hypotonia, ataxia, motor and mental delay, tremor.	Severe infantile	Classical	c.[3175C>T]+[3175C>T]	p.[Arg1059*]+[Arg1059*]	155	419
P7 ⁽²⁸⁾	Spanish	1 year	14 years	Without neurological involvement, only hepatomegaly, now asymptomatic	?	Classical	c.[1301C>T]+[2261T>A]	p.[Pro434Leu]+[Met754Lys]	57	122
P8	Spanish	23 months	23 months	NA	Severe infantile	NA	NA	NA	137	381
P9 ⁽²⁵⁾	Spanish	2 years	6 years	Ataxia, motor and mental delay, splenomegaly, neonatal jaundice, spasticity, statural-ponderal delay.	Severe infantile	Classical	c.[346C>T]+[3493G>A]	p.[Arg116*]+[Val1165Met]	88	247

Patient ^a	Origin	Age of diagnosis	Age of oxysterols analysis	Clinical symptoms	Clinical phenotype ^c	Biochemical phenotype ^d	Mutation ^e	Effect on protein	CT (ng/mL)	7-KC (ng/mL)
P10 ⁽²⁵⁾	Spanish	4 years	4 years	Splenomegaly, psicomotor delay.	Late infantile	Classical	c.[352_353delAG]+[530G>A]	p.[Gln119ValfsX8]+[Cys177Tyr]	81	203
P11	Spanish	8 years	17 years	Ataxia, dysarthria, motor delay, ophthalmoplegy.	Juvenile	Variant	c.[346C>T] + [3493G>A]	p.[R116X] + [V1165M]	51	111
P12 ⁽²⁶⁾	Spanish	10 years	16 years	Hepatosplenomegaly, dribbling, ophthalmoplegy, motor clumsiness, dysarthria, hypotonia.	Juvenile	Classical	c.[2746_2748delAAT]+[3451G>A]	p.[Asn916del]+[Ala1151Thr]	34	73
P13 ⁽²⁶⁾	Spanish	13 years	17 years	Learning delay, mental weakness, progressive cerebellar syndrome, seizures, peripheral neuropathy, retinitis pigmentosa.	Juvenile	Variant	c.[2932C>T]+[2983T>C]	p.[Arg978Cys]+[Phe995Leu]	98	183
P14	Spanish	NA	27 years	Splenomegaly, hypercholesterolemia.	NA	NA	c.[530G>A]+[2747A>G]	p.[C177Y]+[N916S]	42	105
P15 ^{(26)b}	Spanish	30 years	36 years	Hepatosplenomegaly, ataxia, dysarthria, dysphagia, dystonia, ophthalmoplegy, dysmetria.	Adult	Classical	c.[3349dupC]+[3672C>G]	p.[Leu1117ProfsX4]+[Phe1224Leu]	55	150
P16 ^{(26)b}	Spanish	29 years	34 years	Splenomegaly, ataxia, dysarthria, ophthalmoplegy, psychiatric disorders, dysmetria, dystonia.	Adult	Classical	c.[3349dupC]+[3672C>G]	p.[Leu1117ProfsX4]+[Phe1224Leu]	65	149

^aPatients previously reported (25-28). ^bP15 and P16 are affected siblings. ^cClassification of clinical phenotypes by age at onset of neurological symptoms. ^dDefined by the degree of severity of alterations of intracellular cholesterol using filipin staining. ^eFor cDNA numbering +1 corresponds to the A of the first ATG translation initiation codon RefSeq cDNA NM_000271.3.

CT: cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol; 7-KC: 7-ketocholesterol; NA: not available.

P13, P15 and P16 are under treatment with miglustat. Pre-treatment samples were not available.

RESUMEN DE RESULTADOS Y

DISCUSIÓN GENERAL

RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN GENERAL

Las enfermedades raras se caracterizan por su baja incidencia en la población general (>1:2000). En este grupo se encuentran las enfermedades metabólicas hereditarias, que en su mayoría son enfermedades graves, crónicas, degenerativas y en muchos casos mortales, afectando en gran medida a pacientes en edad pediátrica.

La baja incidencia de estas enfermedades hace que su diagnóstico sea muchas veces difícil de establecer, dilatándose en el tiempo, por lo que en muchas ocasiones, estas enfermedades están infradiagnosticadas. Por ello, el desarrollo de herramientas sensibles, rápidas y robustas que permitan un diagnóstico precoz de la enfermedad, así como la valoración de su pronóstico, es de sumo interés. Otro aspecto importante de estas enfermedades es el desarrollo de terapias específicas y eficaces, ya que todavía son inexistentes en muchos casos.

En esta tesis se estudian estos dos aspectos, el desarrollo de herramientas terapéuticas y diagnósticas aplicado concretamente a dos enfermedades metabólicas hereditarias: la deficiencia del transportador de creatina (CRTR) y la enfermedad de Niemann-Pick tipo C (NPC).

1. DEFICIENCIA DEL TRANSPORTADOR DE CREATINA (CRTR)

Nuestro grupo empezó a trabajar en este tema hace unos 10 años, a raíz de la descripción de los primeros casos de pacientes con deficiencia de CRTR, guanidinoacetato metiltransferasa (GAMT) y L-arginina:glicina amidinotransferasa (AGAT) [59, 78-79, 82]. Un aspecto importante de estas enfermedades es que existe tratamiento para la deficiencia de AGAT y GAMT, lo que supone un beneficio para la mayoría de estos pacientes, ya que el pronóstico de la enfermedad cambiará radicalmente. Por el contrario, la deficiencia de CRTR no dispone actualmente de una terapia. Como consecuencia, empezó a surgir el interés por estas enfermedades con el objetivo de identificar posibles pacientes y conocer de este modo su prevalencia en nuestro país. Por ello, en el marco de un trabajo común entre nuestro centro, el Hospital Sant Joan de Déu (HSJD) y el Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares (CEDEM) de la Universidad Autónoma de Madrid, se desarrolló un proyecto FIS para el diagnóstico clínico, bioquímico y molecular de estas enfermedades.

En una primera etapa del estudio, en nuestro centro se desarrollaron tres técnicas bioquímicas para la detección en orina y plasma de los biomarcadores específicos de esta enfermedad, la creatina (Cr) y guanidinoacetato (GAA), mediante HPLC-fluorescencia, HPLC-MS/MS y GC-MS. La metodología de HPLC-ESI-MS/MS es rápida y sensible, sin embargo, a diferencia de la metodología mediante HPLC-fluorescencia y GC-MS, ésta era poco accesible en la mayoría de los laboratorios. Por ello, nuestro grupo decidió realizar un estudio intercomparativo entre los tres métodos [282]. Los ensayos de validación mostraron que todas estas técnicas tenían una buena linealidad, sensibilidad, exactitud y recuperación. Los tres métodos eran adecuados para el análisis de GAA en orina, además de presentar una buena correlación entre sí, según los análisis de Passing-Bablok realizados. Sin embargo, cuando se comparaba la ratio Cr/creatinina (Crm) se observó que los resultados obtenidos mediante HPLC-ESI-MS/MS eran equiparables con los obtenidos mediante GC-MS, pero no con los de HPLC-fluorescencia. También se establecieron por primera vez valores de referencia de Cr y GAA en orina mediante las tres metodologías en nuestra población control. No obstante, se decidió finalmente utilizar sólo HPLC-ESI-MS/MS tanto para el análisis de orina como de plasma, ya que tiene mayor sensibilidad y requiere de menos tiempo que las otras técnicas. También se establecieron valores de referencia para Cr y GAA en plasma [282].

Una vez realizado el análisis de Cr y GAA en fluidos biológicos, es necesario realizar su confirmación diagnóstica con segundas pruebas bioquímicas enzimáticas y el estudio genético. En el año 2001 el grupo de la Dra. Salomons [82] demostró que en un paciente con deficiencia de CRTR la captación de Cr en fibroblastos era deficiente, por lo que se dictaminó que esta prueba era un buen método diagnóstico para esta enfermedad. Por ello, en una segunda etapa nuestro grupo se propuso de implementar dicha metodología siguiendo la descrita por Salomons y col. [82]. Se consiguió establecer esta técnica con éxito y se obtuvieron valores control en fibroblastos.

La implementación de todas estas técnicas de diagnóstico junto con el trabajo clínico de los neuropediatras del HSJD, nos permitió identificar los primeros 10 pacientes con deficiencia de CRTR en el territorio español, además de una paciente heterocigota, de un total de 2800 pacientes analizados con retraso mental, del lenguaje, autismo y epilepsia sin diagnóstico conocido [102, 104, 283-284]. Estos resultados evidenciaron que la prevalencia de esta enfermedad en nuestro país era más baja que la descrita en

otras poblaciones [95, 285-287]. Además, se diagnosticaron los 3 primeros pacientes con deficiencia de GAMT sobre un estudio de 1200 pacientes [288].

En cuanto a la terapia de la enfermedad, tal y como se ha comentado anteriormente, no existe ningún tratamiento eficaz para la deficiencia de CRTR. En esta enfermedad la suplementación con Cr resulta ineficaz debido, por un lado, a la elevada polaridad de la Cr que dificulta su paso a través de la barrera hematoencefálica (BHE) y, por otro lado, debido a la baja o nula capacidad de CRTR para transportar Cr al cerebro [34, 38]. Por ello, las últimas investigaciones para encontrar una terapia para esta enfermedad se centran en el desarrollo de moléculas lipofílicas que sean capaces de cruzar la BHE de una forma independiente de CRTR. La creatina-etil-éster (CEE) es una molécula lipofílica derivada de la Cr que ha sido utilizada por muchos atletas para mejorar el rendimiento físico y que no tenía efectos secundarios [289]. Dada la disponibilidad de este compuesto en el mercado y en base a esta evidencia se propuso de evaluar la eficacia de la suplementación de CEE en fibroblastos de pacientes con deficiencia de CRTR. Los resultados en los cultivos celulares mostraron un incremento notable en la concentración de Cr intracelular, superior incluso al observado tras la administración con Cr monohidrato en concentraciones de 500 μ M durante 72h de incubación. Estos resultados prometedores condujeron a tratar 4 pacientes con CEE durante 1 año en el HSJD, pero desafortunadamente el tratamiento no mostró mejoría clínica ni aumento en el pico de Cr cerebral [290].

Algunos autores también describieron que la suplementación con los precursores de Cr producía un incremento en la síntesis de Cr intracelular en linfoblastos [109] y una mejoría clínica en estos pacientes [110]. Como consecuencia, nuestro grupo se propuso de analizar el efecto de la administración de arginina y glicina en fibroblastos de pacientes con deficiencia de CRTR con el objetivo de corroborar esta evidencia. Sin embargo, los resultados mostraron que no había diferencias en la concentración de Cr intracelular. Del mismo modo también se administró arginina a 4 pacientes con deficiencia de CRTR y tampoco se demostró ninguna efectividad [112].

Todo este trabajo dio lugar a la publicación de diversos artículos [102-104, 112, 283-284, 288, 290] y a la realización de tres tesis doctorales [291-293]. A partir de entonces nuestro grupo desarrolló un nuevo proyecto enfocado a la búsqueda de terapias y al

estudio de biomarcadores en las deficiencias cerebrales de Cr, con el que emergió parte de esta tesis doctoral.

1.1 ESTUDIO DE POSIBLES TERAPIAS PARA LA DEFICIENCIA DEL TRANSPORTADOR DE CR (CRTR)

Eficacia de los derivados de Cr (PCr-Mg-CPLX, CrOBzl y Au-HC-NPs)

Tras nuestro estudio de la efectividad de CEE [290], otros autores describieron nuevos derivados de Cr (fosfocreatina-Mg-complex (PCr-Mg-CPLX), creatina-benzil-éster (CrOBzl) y nanopartículas de oro (Au-HC-NPs)) [113, 294] cuya suplementación en cortes de cerebro de ratón producía un incremento en la concentración de Cr intracelular [113]. Ante estos resultados prometedores, el Dr. Balestrino de la Universidad de Génova (Italia) responsable de estos estudios contactó con nosotros con el interés de evaluar la eficacia de estos compuestos en los fibroblastos de pacientes con deficiencia de CRTR. Establecimos una colaboración para este estudio y además creímos también de interés probar estos compuestos en células iPS. Éstas, fueron obtenidas por el grupo del Dr. J.C. Izpizua (Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona) a partir de fibroblastos de los mismos pacientes, que fueron validadas en la presente tesis (Figura suplementaria 1, Artículo 1) (FIS PS09/02128). Además, también probamos la eficacia de estos derivados en otras líneas celulares como células endoteliales humanas de vena umbilical (HUVEC) y células endoteliales microvasculares cerebrales humanas (HBMEC), en las que silenciamos CRTR mediante la estrategia de silenciamiento génico con siRNA con el objetivo de obtener un modelo *in vitro* de barrera hematoencefálica (BHE) y endotelio vascular con las características de la deficiencia de CRTR (Fig. 20).

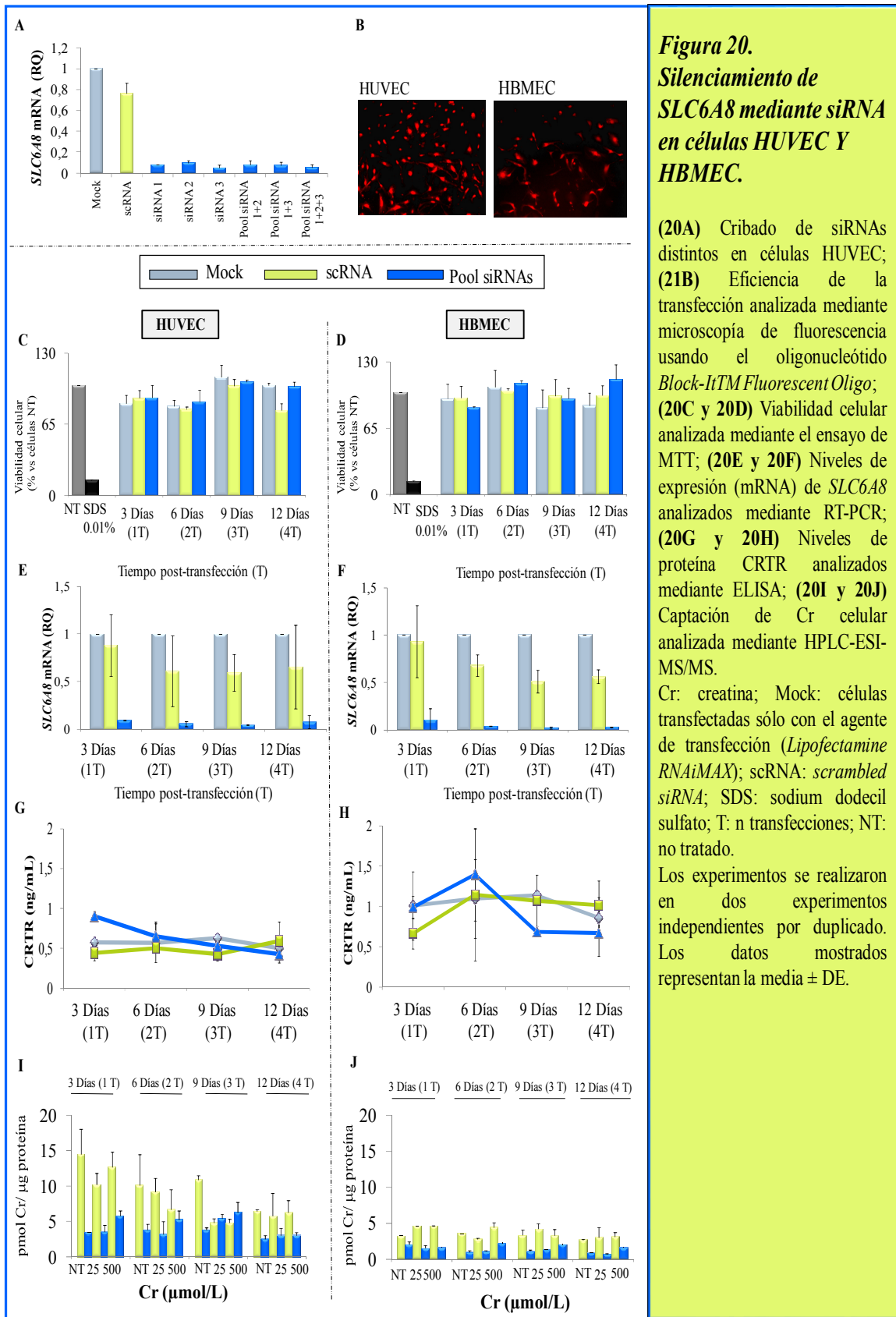


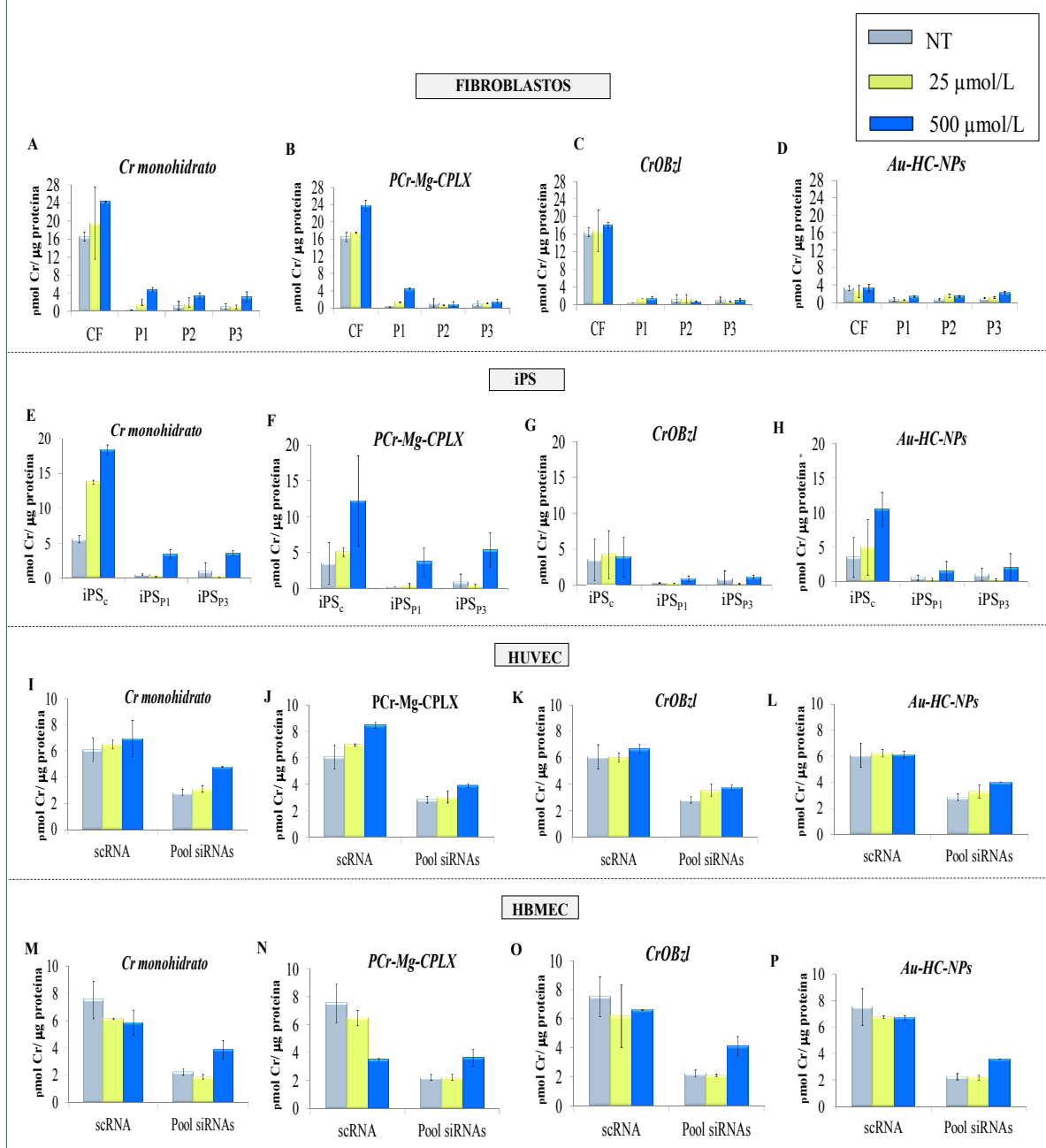
Figura 20.
Silenciamiento de *SLC6A8* mediante siRNA en células HUVEC Y HBMEC.

(20A) Cribado de siRNAs distintos en células HUVEC; (21B) Eficiencia de la transfección analizada mediante microscopía de fluorescencia usando el oligonucleótido *Block-It™ Fluorescent Oligo*; (20C y 20D) Viabilidad celular analizada mediante el ensayo de MTT; (20E y 20F) Niveles de expresión (mRNA) de *SLC6A8* analizados mediante RT-PCR; (20G y 20H) Niveles de proteína CRTR analizados mediante ELISA; (20I y 20J) Captación de Cr celular analizada mediante HPLC-ESI-MS/MS. Cr: creatina; Mock: células transfectadas sólo con el agente de transfección (*Lipofectamine RNAiMAX*); scRNA: *scrambled siRNA*; SDS: sodium dodecil sulfato; T: n transfecciones; NT: no tratado. Los experimentos se realizaron en dos experimentos independientes por duplicado. Los datos mostrados representan la media ± DE.

A diferencia de lo que se observó en cerebro de ratón [113], los niveles de Cr intracelular que nosotros observamos tras la sobrecarga con dichos derivados no

mostraron ningún incremento significativo, comparado con los obtenidos tras la sobrecarga con Cr monohidrato (Fig. 21).

Figura 21. Captación celular de PCr-Mg-CPLX, CROBZl y AU-HC-NPS en fibroblastos, iPS, HUVEC y HBMEC.

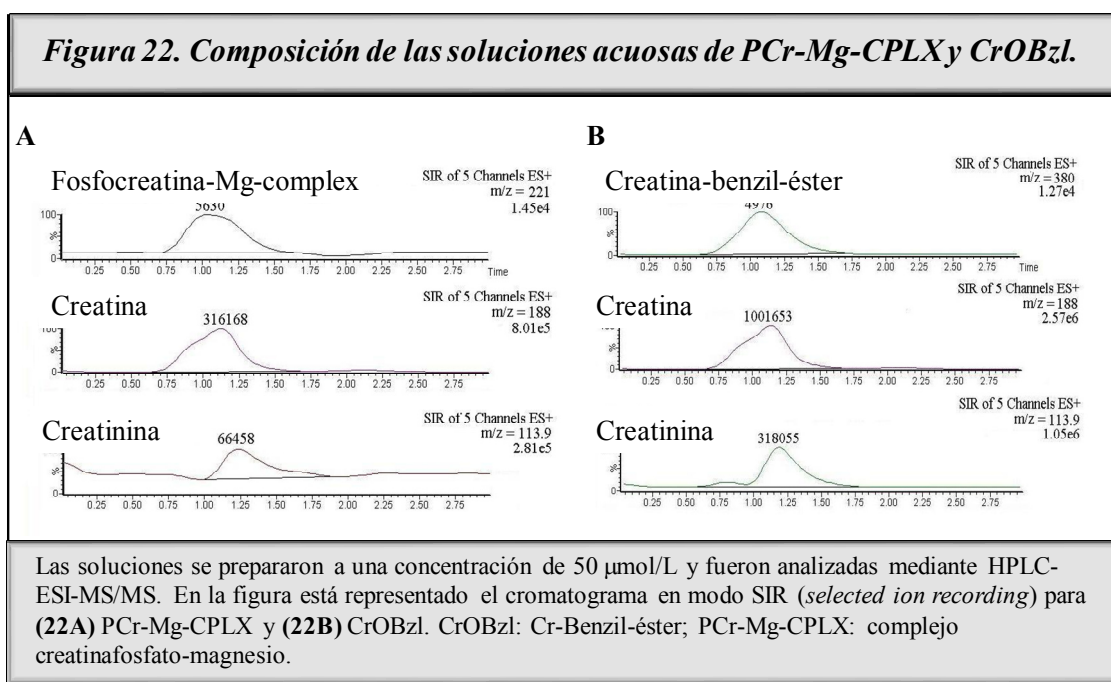


(21A-21D) Captación celular en fibroblastos derivados de 3 pacientes con deficiencia de CRTR y fibroblastos control. (21E-21H) Captación celular en iPS obtenidas a partir de fibroblastos de pacientes con deficiencia de CRTR e iPS control. (21I-21L) Captación celular en HUVEC transfectadas con siRNA y scRNA. (21M-21P) Captación celular en HBMEC transfectadas con siRNA y scRNA. Se utilizó Cr monohidrato como control de captación celular. Las células fueron incubadas con cada uno de los compuestos durante 24 h a 37°C y 5% CO₂. Los niveles intracelulares de Cr fueron analizados mediante HPLC-ESI-MS/MS.

Au-HC-NPs: nanopartículas de oro de Cr; CF: fibroblastos control; ciPS: iPS control; Cr: creatina; CrOBZl: Cr-benzil-éster; PCr-Mg-CPLX: complejo de creatinafosfato-magnesio; scRNA: *scrambled siRNA*; NT: no tratado.

Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado. Los datos mostrados representan la media ±DE.

Estos resultados insatisfactorios nos condujeron a una revisión metodológica. Después de analizar varias posibilidades, observamos que las correspondientes soluciones acuosas de PCr-Mg-CPLX y CrOBzl se hidrolizaban dando lugar a un aumento del porcentaje de Cr libre y Crn y una baja proporción del compuesto puro como resultado de una hidrólisis acuosa (Fig. 22). Estos resultados estaban en línea con las observaciones hechas por Lunardi y col. [113] quienes demostraron que CrOBzl era degradado a Crn y alcohol bencílico. En cuanto a las nanopartículas de oro desconocemos si pudo haber un proceso de agregación influenciado por el pH o las sales del medio, o si la entrada a la célula fue parcial. No hemos podido dar respuesta a estas cuestiones ya que no disponíamos de ningún sistema de marcaje de este compuesto ni de la técnica de microscopía electrónica de transmisión para comprobar su entrada al interior de la célula. Las nanopartículas fueron diseñadas y obtenidas por el grupo del Dr. Balestrino. Se siguieron estrictamente las recomendaciones para su disolución proporcionadas por dicho grupo.



Estos ensayos han ayudado a evidenciar que CrOBzl, PCr-Mg-CPLX y Au-HC-NPs no reúnen las características óptimas para ser considerados como terapia de la deficiencia de CRTR y han contribuido a la idea de que son necesarias otras estructuras derivadas de la Cr que den lugar a compuestos más estables. Recientemente se han descrito nuevos derivados de Cr que parecerían ser buenos candidatos para dicha terapia, ya que incrementan la Cr intracelular en comparación con Cr monohidrato en modelos

celulares y animales de la enfermedad. Algunos de estos compuestos son derivados de Cr unida a amidas [116], Cr unida a ésteres de ácidos grasos [115] o el compuesto cíclico de la Cr, la ciclocreatina [114]. Dada esta evidencia, nos hemos puesto en contacto con estos autores para evaluar la eficacia de estos compuestos en las líneas celulares de que disponemos.

Eficacia de los precursores de Cr

Respecto a los precursores de Cr, existe discrepancia en cuanto a su eficacia. Algunos autores han descrito un incremento de Cr cerebral en algunos pacientes con deficiencia de CRTR tras la administración de arginina y glicina [110-111] pero otros no han observado ningún cambio [98, 112, 295].

Dada esta disparidad de resultados, decidimos evaluar el efecto de la administración de los precursores de Cr en fibroblastos de pacientes, en células HUVEC y HBMEC. Desafortunadamente, se obtuvieron resultados similares a los que ya habíamos obtenido previamente en fibroblastos [291], sin observar ningún incremento en la cantidad total de Cr intracelular tras la administración de glicina y arginina. Estos hechos nos condujeron a comprobar si realmente tenía lugar la entrada de ambos aminoácidos al interior de la célula. La captación de arginina y glicina se confirmó en los fibroblastos y también en las líneas celulares HUVEC y HBMEC, aunque en menor medida. Además, también se observó una captación más notable de glicina que de arginina en las tres líneas celulares (Fig. 23).

Estas diferencias podrían explicarse por la variedad existente de los transportadores de arginina y glicina con características cinéticas distintas.

Concretamente, la captación de L-arginina en fibroblastos humanos se da mayoritariamente mediante los sistemas (y^+) y (y^+L) [296-299]. En este tipo celular, el sistema (y^+) presenta una cinética de saturación (Michaelis-Menten) con una K_m de 0.02-1 mmol/L y una cinética no saturable a concentraciones superiores a 1 mmol/L [297-298]. Estos datos estarían de acuerdo con los resultados encontrados en nuestro trabajo, donde la captación de arginina tras la dosis de 10 mmol/L fue más notable en fibroblastos, probablemente debida a la cinética no saturable.

En el endotelio vascular, el transporte de arginina también se rige mayoritariamente por el sistema (y^+) ($K_m=100-200 \mu\text{mol/L}$) y (y^+L) ($K_m=1-40 \mu\text{mol/L}$) y en menor medida por el sistema (b^{o+}) ($K_m=3-4 \text{ mmol/L}$) [300-303]. De modo similar, en la BHE también

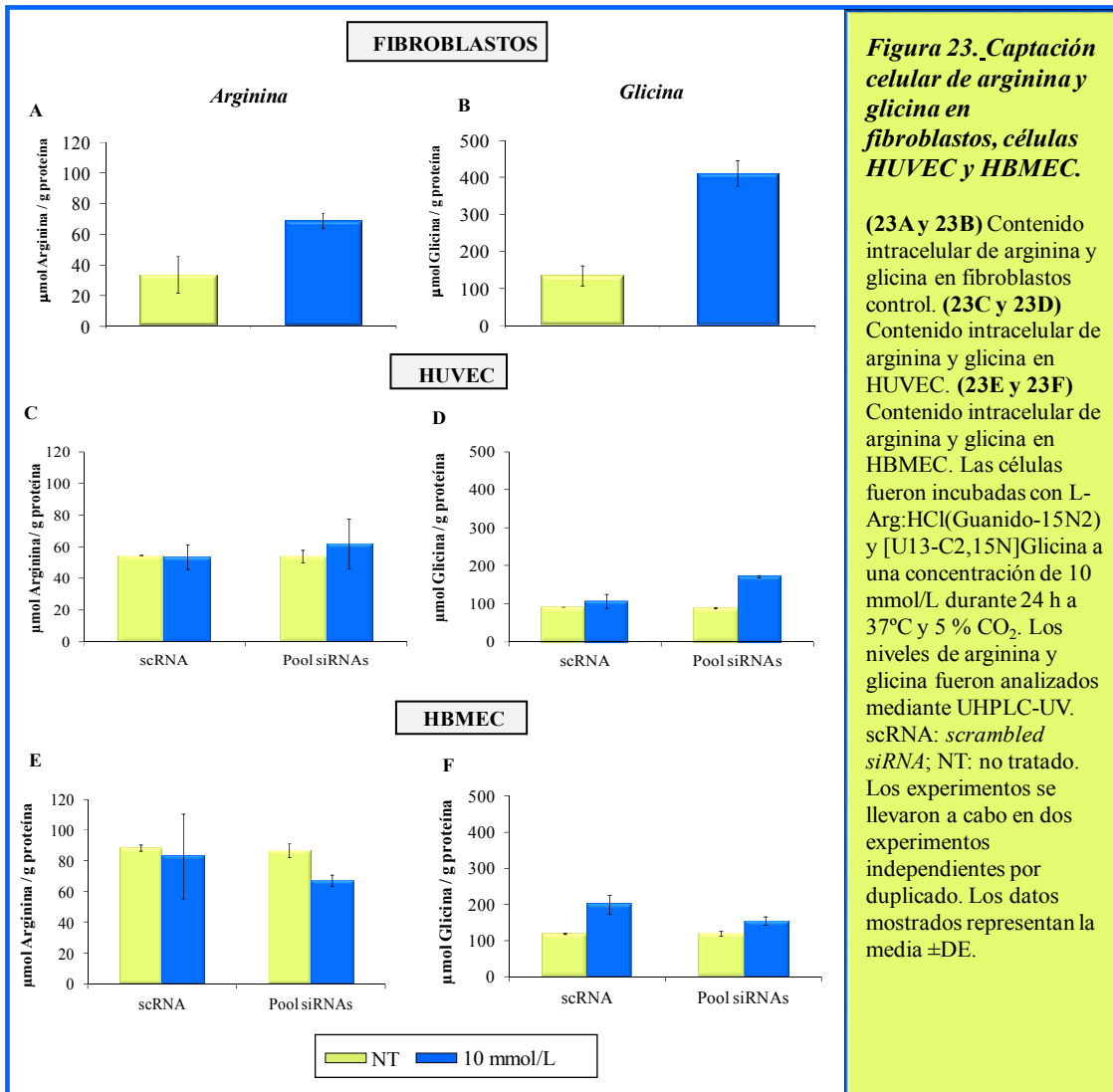


Figura 23. Captación celular de arginina y glicina en fibroblastos, células HUVEC y HBMEC.

(23A y 23B) Contenido intracelular de arginina y glicina en fibroblastos control. (23C y 23D) Contenido intracelular de arginina y glicina en HUVEC. (23E y 23F) Contenido intracelular de arginina y glicina en HBMEC. Las células fueron incubadas con L-Arg:HCl(Guanido-15N₂) y [U13-C₂,15N]Glicina a una concentración de 10 mmol/L durante 24 h a 37°C y 5 % CO₂. Los niveles de arginina y glicina fueron analizados mediante UHPLC-UV. scRNA: *scrambled siRNA*; NT: no tratado. Los experimentos se llevaron a cabo en dos experimentos independientes por duplicado. Los datos mostrados representan la media ±DE.

se encuentra el sistema (y^+) responsable del transporte de arginina, hallándose en la parte luminal y abluminal con una cinética de saturación con una $K_m=30-100 \mu\text{mol/L}$ [303-305]. Esta evidencia podría explicar la captación inapreciable de L-arginina en las células HUVEC y HBMEC, tras su administración a una concentración de 10 mmol/L.

Con respecto a la glicina, diversos estudios en fibroblastos humanos han demostrado un transporte de glicina mediante el sistema A con una K_m alrededor de 1 mmol/L [306], lo que estaría de acuerdo con la mayor entrada de glicina en fibroblastos observada en nuestro estudio.

En la BHE el transporte de glicina está asociado al sistema ASC [304] que se expresa en la membrana abluminal pero no en la parte luminal [305]. La captación de glicina desde la sangre al cerebro parece ser que sería debida a una difusión pasiva [307-308] y se ha sugerido que la glicina podría ser sintetizada *de novo* en el cerebro a partir de L-serina como precursor [309-310]. La glicina actúa como un neurotransmisor inhibitorio y tanto

su recaptación sináptica como su tráfico neuronal están mediados por transportadores específicos, GLYT1 y GLYT2 [311]. La glicina como neurotransmisor está especialmente regulada en cerebro, lo que explicaría la distribución especial de los transportadores de glicina en el endotelio capilar cerebral. Estos hechos permitirían una salida de glicina desde el cerebro hacia la sangre para evitar una acumulación de altas concentraciones cerebrales de glicina. Estos estudios apoyarían los hallazgos de nuestro trabajo, donde la captación de glicina por las células HUVEC y HBMEC era más baja.

Otro aspecto a tener en cuenta es la presencia de las enzimas involucradas en la síntesis de Cr (AGAT y GAMT). La enzima AGAT se expresa mayoritariamente en hígado, riñón y páncreas, mientras que la enzima GAMT ha sido encontrada en músculo esquelético, hígado, corazón y riñón [3]. En cerebro se ha descrito también la presencia de ambas enzimas aunque en baja proporción [31] y raramente se co-expresan en el mismo tipo celular [44]. La expresión de GAMT es baja en fibroblastos, tal y como se ha descrito previamente [312] y posiblemente también lo sea en células endoteliales, lo cual respondería a la ausencia de síntesis endógena de Cr, tal y como hemos encontrado en este trabajo tras la administración de arginina y glicina. A día de hoy existe una carencia de información sobre la expresión de dichas enzimas en estos tipos celulares, por lo que es difícil concluir esta hipótesis requiriendo de estudios adicionales.

Los resultados obtenidos por nosotros tras el tratamiento con precursores de Cr estarían en línea con algunos estudios descritos en pacientes con deficiencia de CRTR, en los que la administración de arginina y glicina no supuso cambios en el pico cerebral de Cr [98, 112, 295]. No obstante, existen discrepancias al respecto, ya que otros autores, sí, han observado un incremento de Cr cerebral en algunos pacientes tras la administración de precursores de Cr [110-111]. Sin embargo, a partir de nuestra experiencia, podemos deducir que esta estrategia terapéutica con precursores de Cr no es eficaz en la deficiencia de CRTR.

1.2. ESTUDIO DE BIOMARCADORES

La búsqueda de biomarcadores específicos para una enfermedad es uno de los retos con más trascendencia en el campo del diagnóstico bioquímico. Resulta muy interesante

poder encontrar un marcador cuya alteración sugiera o indique una patología específica siendo útil como herramienta para el diagnóstico y/o pronóstico de la misma, o incluso para la monitorización de la respuesta a tratamientos. Al mismo tiempo, los esfuerzos se aúnan en la búsqueda de biomarcadores que sean fáciles de identificar y detectar, que estén presentes en muestras biológicas fáciles de obtener y que puedan ser analizados mediante técnicas sensibles, robustas, sencillas y rápidas.

En las deficiencias cerebrales de Cr, los biomarcadores bioquímicos por excelencia son la Cr y GAA [101]. Estos metabolitos juegan un papel importante en la homeostasis energética de la célula formando parte del sistema Cr/creatina quinasa (CK)/fosfocreatina (PCr). Por ello, uno de los objetivos de esta tesis fue el de estudiar el papel de la CK y el sistema Cr/CK/CrP en su conjunto como biomarcadores de estas enfermedades. También se propuso estudiar el papel de la Cr en el grupo de las enfermedades mitocondriales, dada la función energética de la mitocondria y su interconexión con el sistema de Cr.

1.2.1 SISTEMA Cr/CK/CrP/ATP

La Cr es un compuesto que juega un papel importante en el metabolismo energético celular [51]. La Cr actúa como administrador de grupos fosfato de alta energía a través de la CK, la cual convierte la Cr en CrP. Como consecuencia, el sistema Cr/CK/CrP/ATP se comporta como una lanzadera desde sitios de producción de energía en la mitocondria a sitios de utilización de energía en el citoplasma [50]. Un estudio previo llevado a cabo por Mercimek-Mahmutoglu y col. [117] describió niveles bajos de CK en suero de un paciente con deficiencia de CRTR y en otro paciente con deficiencia de GAMT. Esta evidencia nos impulsó a evaluar el sistema energético en su conjunto (Cr/CrP/CK/ATP) en fibroblastos de pacientes con defectos de biosíntesis y de transporte de Cr. Con esta finalidad, pusimos a punto la metodología para el análisis simultáneo de ATP, ADP, AMP, CrP y Cr mediante HPLC-ESI-MS/MS basándonos en la metodología sugerida por Jiang y col. [313] con algunas modificaciones. De este modo, se consiguió obtener un método adecuado para el análisis de estos compuestos (Tabla 1).

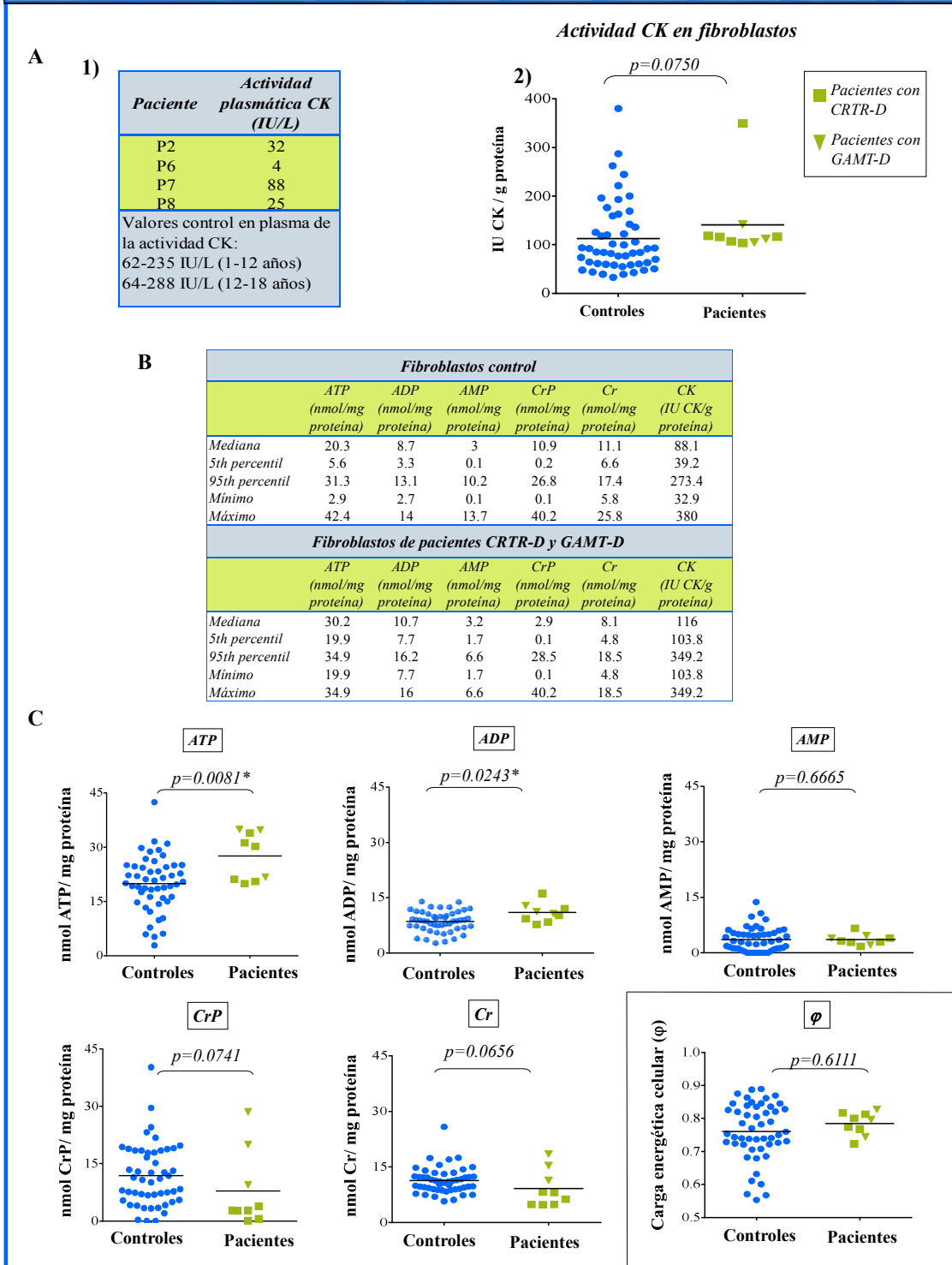
Tabla 1. Resultados de la validación del método para el análisis de ATP, ADP, AMP, CrP Y Cr mediante HPLC-ESI-MS/MS.

	<i>ATP</i>	<i>ADP</i>	<i>AMP</i>	<i>CrP</i>	<i>Cr</i>
Curva de calibración (n=6)					
<i>Media de la pendiente (rango; DE)</i>	0.042 (0.037-0.057; 0.008)	0.035 (0.018-0.048; 0.010)	0.039 (0.02-0.063; 0.018)	0.009 (0.0056-0.015; 0.004)	0.118 (0.088-0.139; 0.019)
<i>Media de la ordenada (rango; DE)</i>	0.019 (0.005-0.034; 0.012)	-0.009 (-0.037-(+0.031); 0.023)	0.038 (-0.005-(+0.108); 0.044)	0.017 (0.007-0.037; 0.011)	0.020 (-0.042- (+0.076); 0.044)
<i>Media coeficiente de regresión lineal, r² (rango;DE)</i>	0.9983 (0.9929-0.9999; 0.0026)	0.9972 (0.9919-0.9993; 0.0027)	0.9986 (0.9971-0.9997; 0.0009)	0.9973 (0.9931-0.9991; 0.0024)	0.9986 (0.9970- 0.9996;0.0009)
Intra-día, n=10					
<i>Imprecisión (% CV)</i>					
1 µg/mL	8.7	6.9	4.5	14.1	6.7
8 µg/mL	4.4	3.9	5.1	8.7	7.3
64 µg/mL	5.8	6.1	8	9.9	4.3
<i>Exactitud (% ER)</i>					
1 µg/mL	-11	0.7	-8.7	-28.7	-47.1
8 µg/mL	-6	-7.8	-10.8	-28.3	1.1
64 µg/mL	-1.1	7.6	6.4	3.8	3.7
Inter-día, n=10					
<i>Imprecisión (% CV)</i>					
1 µg/mL	14.9	9.9	7.7	14	11.1
8 µg/mL	7.4	8.4	9.7	10.2	8.4
64 µg/mL	3.2	6.6	8	5.4	7.9
<i>Exactitud (% ER)</i>					
1 µg/mL	-1.7	9.5	0.5	-27.4	-9.7
8 µg/mL	-2.4	0.6	9.3	8	4.4
64 µg/mL	-3.4	7.6	0.6	-1.1	4.4
Recuperación (%), n=3					
8 µg/mL	109.6	96.1	135.1	164	106.6
16 µg/mL	128.6	113.6	147	187.8	104.1
64 µg/mL	89.6	116.5	154.2	158.4	105.8
LD (µg/mL), n=3	0.25	0.25	0.25	0.5	0.024
LQ (µg/mL), n=3	0.5	0.5	0.5	1	0.05

Cr: creatina; CrP: creatinafosfato; CV: coeficiente de variación; DE: desviación estándar; ER: error relativo; LD: límite de detección; LQ: límite de cuantificación.

Nuestro estudio es el primero que ha analizado el sistema energético conjunto Cr/CrP/CK/ATP en fibroblastos de pacientes con CCDS, pero la actividad intracelular de CK no mostró diferencias significativas entre fibroblastos de controles y de pacientes (Fig. 24A y 24B). Sin embargo, sobre un total de 4 pacientes analizados, se observaron niveles bajos de CK en plasma en 2 pacientes con deficiencia de CRTR y en 1 paciente con deficiencia de GAMT (Fig. 24A y 24B). Estos resultados estarían de acuerdo con los descritos previamente [117].

Figura 24. Niveles de ATP, ADP, AMP, CrP, Cr y CK en pacientes con deficiencia de CRTR y GAMT.



(24A) Actividad CK en plasma (1) y fibroblastos (2) en pacientes y controles. (24B) Valores de referencia de ATP, ADP, AMP, CrP, Cr y CK en fibroblastos control y rango de valores en pacientes. (24C) Valores detallados de ATP, ADP, AMP, CrP, Cr y ϕ representados mediante diagrama de cajas (*box-and-whisker plots*) con la media. La carga de energía celular (ϕ) se calcula como: $([ATP]+1/2*[ADP])/([ATP]+[ADP]+[AMP])$.

Se consideraron diferencias significativas cuando $p < 0.05$ (*).

CK: creatina quinasa; Cr: creatina; CRTR-D: deficiencia del transportador de creatina; GAMT-D: deficiencia de adenosil-L-metionina:N-guanidinoacetato metiltransferasa; CrP: creatina fosfato.

Una posible explicación del hecho que CK sea normal en fibroblastos mientras está disminuida en plasma podría residir en los distintos requerimientos energéticos tisulares y en el tipo de isoforma tejido-dependiente. El método de cuantificación de la actividad CK que se utilizó en esta tesis estaba basado en la medida de la actividad total de las isoformas de la CK [314-315]. Se ha descrito que la concentración total de CK en suero está constituida en gran parte por la isoenzima CK-MM (expresada mayoritariamente en músculo esquelético y cardíaco), seguido por la isoenzima CK-MB (expresada en músculo cardíaco) en un bajo porcentaje (1-3%) y raramente la CK-BB (expresada en cerebro) [314, 316]. En base a esta evidencia, se podría pensar que la actividad CK reducida observada en suero en las CCDS podría ser el reflejo de una posible alteración mayoritariamente de la CKMM. Por el contrario, la CK en fibroblastos probablemente sea normal debido a unos requerimientos energéticos más bajos en este tejido.

Los niveles de Cr y CrP eran bajos en los fibroblastos de pacientes comparado con los controles, tal y como se ha descrito previamente [82, 83] siendo más reducidos en los pacientes con deficiencia de CRTR que en los patients con deficiencia de GAMT (Fig. 24B y 24C). A pesar de los niveles reducidos de Cr y CrP, y de la actividad normal de CK en fibroblastos de los pacientes, el contenido de ATP y ADP estaba incrementado (Fig. 24B y 24C). Una posible explicación a esta situación podría ser la siguiente: el sustrato, Cr intracelular, se encuentra disminuida en la deficiencia de CRTR y GAMT, debido a los defectos en el transporte y síntesis de Cr respectivamente, de modo que su producto fosforilado (CrP) se encuentra limitado resultando en un bajo contenido en CrP. Como respuesta a esta disminución, los diferentes mecanismos celulares de producción de ATP se activarían con el fin de suministrar energía a la célula, lo que podría explicar los altos niveles de ATP y ADP observados en los fibroblastos de estos pacientes.

En conclusión, la actividad plasmática, pero no la actividad en fibroblastos, de CK podría ser un biomarcador de las CCDS. Además, el análisis individual del contenido de Cr/CrP/ATP en los fibroblastos podría ser útil para la evaluación de la respuesta celular a tratamientos.

1.2.2 CR COMO BIOMARCADOR EN LAS ENFERMEDADES MITOCONDRIALES

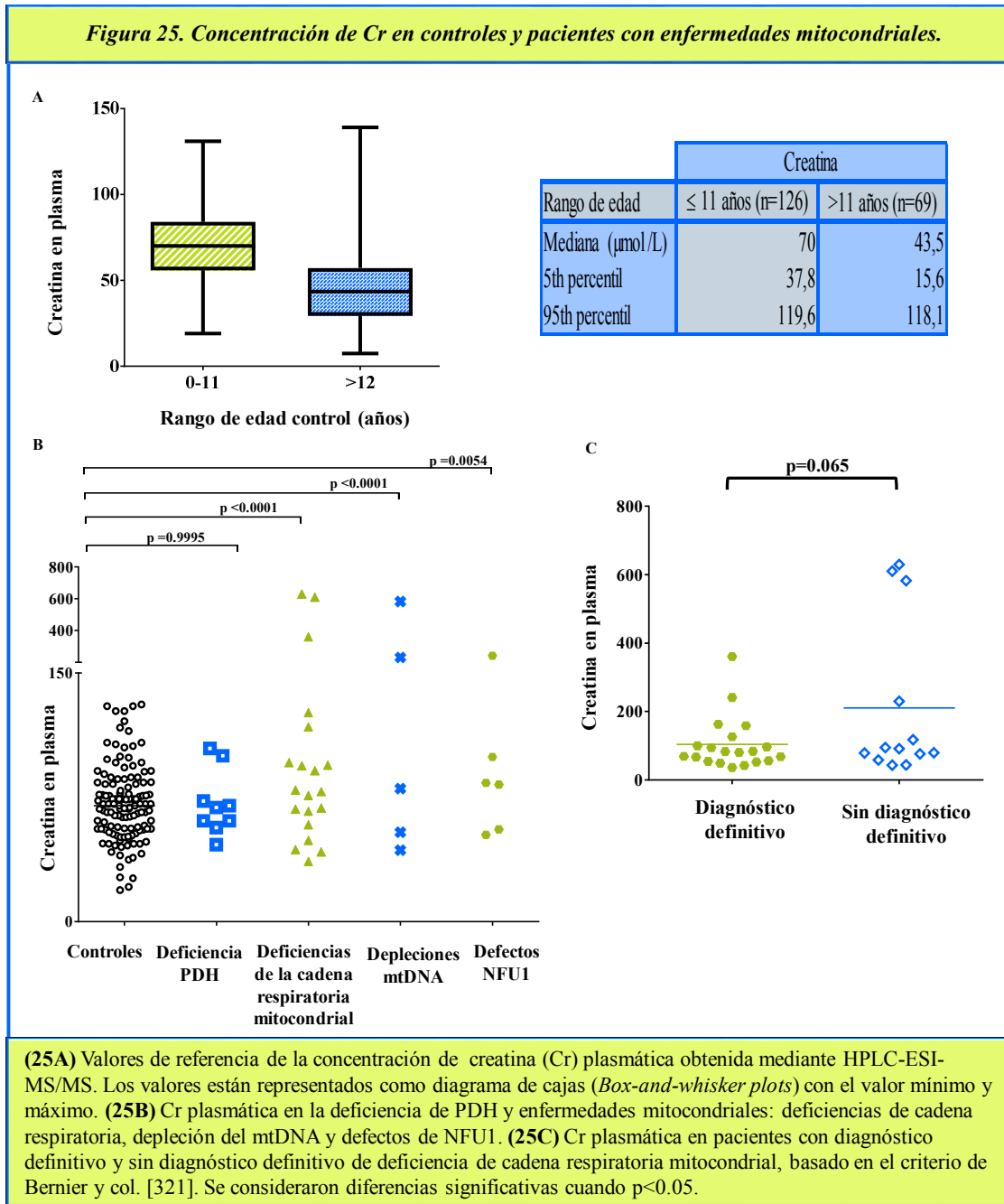
La Cr intracelular puede ser fosforilada a CrP mediante la acción de la enzima CK. Existen distintas CKs, cada una de ellas con una función específica. Las isoformas mitocondriales (MtCK) usan ATP para convertir Cr en CrP mientras que las isoformas citosólicas (cCK) usan CrP para convertir ADP en ATP en los lugares de demanda de energía, y para convertir el exceso de ATP en CrP para el almacenaje de energía [50-51]. Dada esta evidencia, es obvio que existe una interconexión clara entre la mitocondria y la Cr, desempeñando un papel importante en la homeostasis energética celular. Estudios previos describían una correlación entre la concentración de Cr plasmática y las enfermedades mitocondriales sugiriendo la Cr como un biomarcador útil para el diagnóstico de estas enfermedades [118-119]. Esta evidencia nos motivó a comprobar dichos resultados en plasma de 33 pacientes diagnosticados con alguna enfermedad mitocondrial [317-320] (Tabla 1, artículo 3) comparado con 196 sujetos sanos. Esta motivación surgió no sólo por el hecho de encontrar un biomarcador de enfermedad mitocondrial, sino por el hecho de conocer en qué medida una enfermedad del metabolismo energético mitocondrial pudiera ser causa de un falso positivo bioquímico de deficiencia de CRTR.

El análisis estadístico en el grupo control mostró que existían diferencias significativas ($p < 0.001$) en la concentración de Cr a la edad de los 11 años. Por ello, se establecieron dos grupos de edades control (Fig. 25A). Estos resultados estaban de acuerdo con otro estudio previo, en el cual se demostró que la Cr disminuía con la edad [282].

Este trabajo permitió analizar el papel de la Cr en los pacientes con enfermedades mitocondriales. De manera similar a los datos reportados por otros autores [118-119], la media de la concentración de Cr se encontró aumentada de manera significativa en el grupo de pacientes respecto a los controles. Sin embargo, cuando se analizó de forma individual, sólo 9 pacientes presentaban elevación de Cr (Fig. 25B). Estos hallazgos también se evidenciaron en los trabajos reportados previamente, en los que se observaron niveles de Cr elevados sólo en algunos pacientes [118-119].

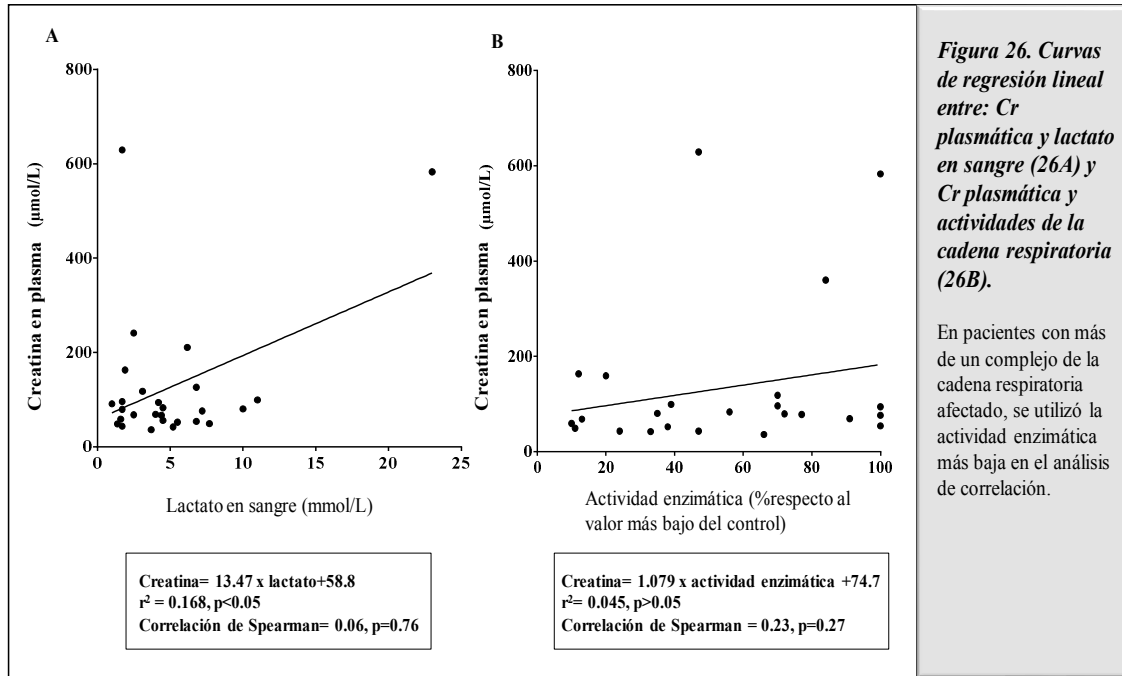
También es destacable el estudio de comparación que llevamos a cabo entre los pacientes con diagnóstico definitivo y sin diagnóstico definitivo de deficiencia de la cadena respiratoria mitocondrial, según el criterio sugerido por Bernier y col. [321] para

la clasificación de dichas patologías. En una evaluación general de los 22 pacientes con deficiencia de la cadena respiratoria se apreció una disminución de Cr en los pacientes con un diagnóstico definitivo de la enfermedad, respecto a los pacientes sin diagnóstico definitivo (Fig. 25C). No obstante, estas diferencias no fueron significativas, por lo que se deduce que la Cr no sería útil para la clasificación del tipo de enfermedad mitocondrial.



Además, también nos planteamos si existiría una correlación entre los niveles de Cr y los de lactato, así como con las actividades de la cadena respiratoria. Sin embargo, los

datos obtenidos no mostraron ninguna asociación entre ellos (Fig. 26). De igual modo tampoco parecía existir una asociación clara entre los niveles de Cr y un fenotipo clínico particular.



Con el propósito de conocer si la Cr podía considerarse como un posible biomarcador de las enfermedades mitocondriales, decidimos calcular su sensibilidad y especificidad en este contexto de patologías, ya que en los estudios anteriores no estaban recogidos estos dos conceptos [118-119]. El análisis de nuestros datos mostró que la Cr presentaba una baja sensibilidad (60%) y una especificidad aceptable (83%), con un alto porcentaje de falsos positivos (40%) y un bajo porcentaje de falsos negativos (17%) (Fig. 27). Estos resultados demostraron que la Cr tenía una capacidad diagnóstica baja en la detección de pacientes con enfermedades mitocondriales.

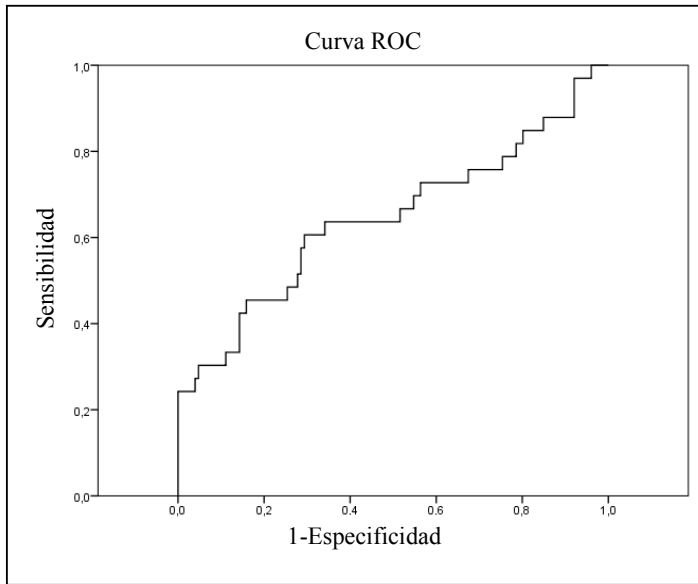


Figura 27. Capacidad diagnóstica de la Cr plasmática en la detección de pacientes con enfermedades mitocondriales.

La exactitud diagnóstica de la Cr está representada en el análisis de la curva ROC (*receiver-operating characteristic*). El área bajo la curva ROC para la Cr plasmática es de 0.064 (sensibilidad= 60%, especificidad= 83%, valor de corte $\geq 120 \mu\text{mol/L}$).

En definitiva, nuestro estudio ha permitido añadir información a la ya existente previamente [118-119] con algunas consideraciones particulares. La elevación de Cr sólo estaba presente en el 28% del total de pacientes con enfermedades mitocondriales. Como consecuencia, la Cr no es un biomarcador sensible de estas patologías pero sí podría ser considerado en cierta forma específico. Niveles elevados de Cr, junto con la alteración de otros biomarcadores, podrían reforzar la sospecha de una enfermedad mitocondrial.

De todas formas, es necesario tener en cuenta en el diagnóstico diferencial de la deficiencia de CRTR que algunos pacientes con deficiencias de la cadena respiratoria mitocondrial pueden tener elevaciones de Cr.

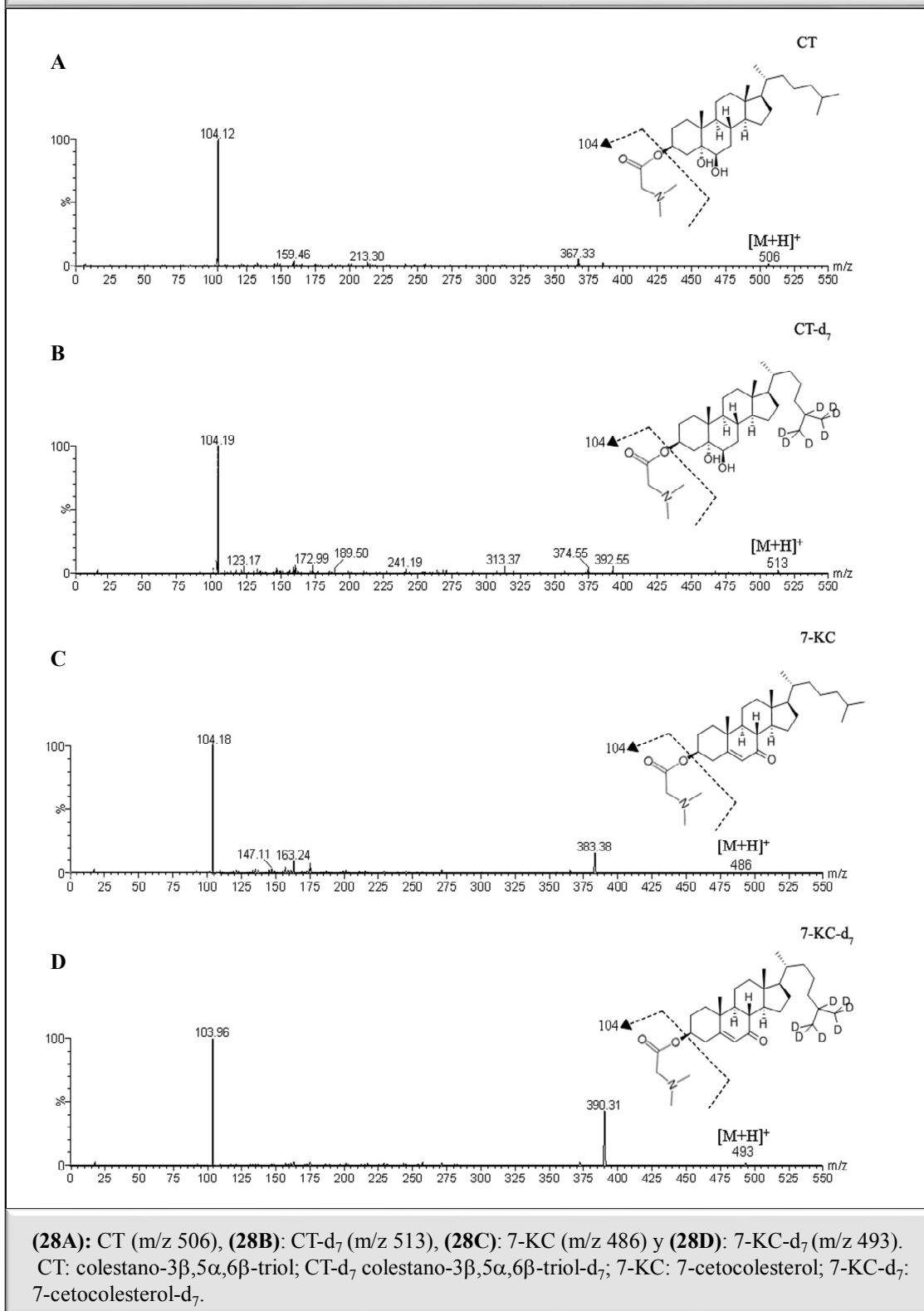
2. ENFERMEDAD DE NIEMANN-PICK TIPO C

2.1. Colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol (CT) y 7-cetocolesterol (7-KC) como biomarcadores para el diagnóstico bioquímico de la enfermedad de Niemann-Pick tipo C

En la enfermedad de Niemann-Pick tipo C (NPC) la técnica de diagnóstico bioquímico por excelencia es la tinción con filipina de los acúmulos intracelulares de colesterol libre. Ésta es una técnica citoquímica sensible y específica con la excepción de algunos casos de presentación adulta de la enfermedad, en los que puede haber tinciones dudosas e incluso semejantes a la obtenida en fibroblastos control, de modo que es necesario el estudio molecular para su confirmación diagnóstica. Esta técnica es invasiva ya que implica la obtención de una biopsia de piel, además de ser un proceso largo que requiere del cultivo de fibroblastos, lo que conlleva un retraso en el diagnóstico. Debido a estos problemas, en los últimos años se ha enfatizado la idea de buscar un biomarcador sensible y específico de la enfermedad de NPC cuyo análisis suponga un método fácil y rápido de desarrollar.

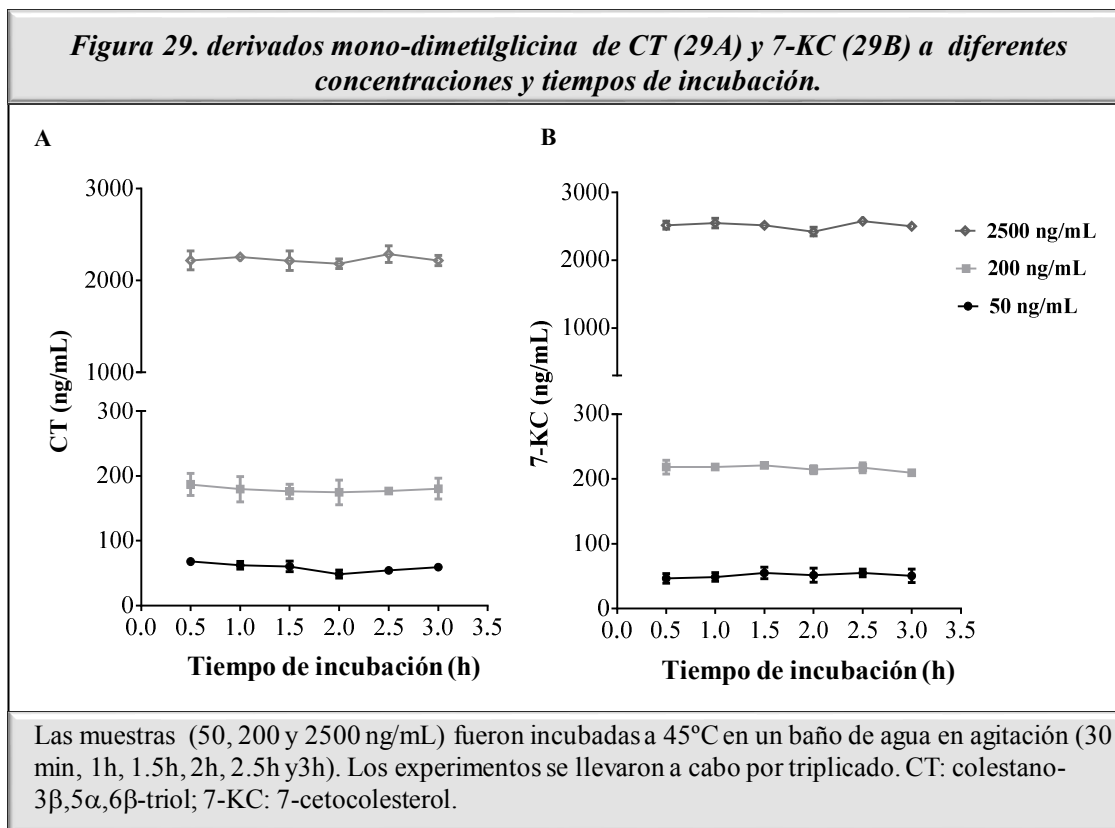
El grupo del Dr. Pentchev [193] demostró que en modelos animales de NPC, el estrés oxidativo celular daba lugar a la presencia de productos de oxidación del colesterol, en particular el colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol (CT) y 7-cetocolesterol (7-KC) [194-195]. Posteriormente, Porter y col. [195] observaron que estos dos oxisteroles, de manera más específica el CT, se encontraban incrementados significativamente en plasma de los pacientes NPC comparando con otras enfermedades lisosomales y con otras neurodegenerativas. Los datos sugerían que estos productos podrían ser buenos biomarcadores para el diagnóstico de la enfermedad de NPC [195, 203]. Dada esta evidencia, nos propusimos poner a punto la técnica para su análisis mediante HPLC-ESI-MS/MS con la finalidad de mejorar el diagnóstico de esta enfermedad. Basándonos en el método publicado previamente por Jiang y col. [203] conseguimos detectar e identificar el CT y 7-KC, con algunas modificaciones en el protocolo de preparación y extracción de la muestra, así como, en las condiciones para la separación cromatográfica y la detección por espectrometría de masas. Contrariamente a estos autores, nosotros detectamos mayoritariamente la forma mono- dimetilglicinato de CT en lugar de la forma bis-dimetilglicinato (Fig. 28). Posteriormente, Boenzi y col. [208] también observaron el derivado “bis” del CT, aunque ellos utilizaban ácido dimetilaminobutírico en lugar de la dimetilglicina como agente derivatizante.

Figura 28. Espectro ESI-MS/MS de los iones de los productos de CT, CT-d₇, 7-KC y 7-KC-d₇ a partir de los iones precursoros correspondientes.



En nuestros ensayos de optimización observamos que el derivado monodimetilglicinato, tanto del CT como del 7-KC, era estable en un rango de

concentraciones y a diferentes temperaturas (Fig. 29). Por ello, dedujimos que la forma monoderivatizada era adecuada para ser utilizada para el propósito de nuestro trabajo.



Una vez validado el método (Tabla 2), nos propusimos valorar estos oxisteroles en una cohorte de pacientes NPC diagnosticados en el territorio español [322-325] (Tabla suplementaria 1, Artículo 4). Los ensayos de validación con muestras de pacientes NPC mostraron que nuestro método discriminaba perfectamente entre sujetos sanos y pacientes. Además, el instrumento HPLC-MS/MS con ionización de electroespray (ESI) suele estar disponible en la mayoría de laboratorios, a diferencia de HPLC-MS/MS con ionización química a presión atmosférica (APCI) que es minoritario [214].

Tabla 2. Resultados de la validación del método para el análisis de CT y 7-KC mediante HPLC-ESI-MS/MS.

	CT	7-KC
Curva de calibración, n=5		
Media de la pendiente (rango; DE)	0.0080 (0.0074-0.0089; 0.0006)	0.0044 (0.0037-0.0049; 0.0005)
Media de la ordenada (rango; DE)	0.39 (0.29-0.44; 0.061)	0.10 (0.09-0.12; 0.013)
Media coeficiente de regresión lineal, r^2 (rango; DE)	0.9908 (0.9830-0.999; 0.006)	0.9926 (0.9817-0.9975; 0.0058)
Intra-día, n=10		
	Imprecisión (%CV) Exactitud (%ER)	Imprecisión (%CV) Exactitud (%ER)
12.5 ng/mL	5.5 3.8	5.5 0.3
100 ng/mL	3.6 1.7	4.4 3.7
800 ng/mL	2.4 8.9	3.9 4.4
Inter-día, n=10		
	Imprecisión (%CV) Exactitud (%ER)	Imprecisión (%CV) Exactitud (%ER)
12.5 ng/mL	5.8 1.5	5.8 4
100 ng/mL	5.8 5.3	7.9 6.4
800 ng/mL	2.9 0.5	7.7 5.4
Recuperación (%), n=3		
25 ng/mL	94.4	94
200 ng/mL	98.2	107
400 ng/mL	91.8	100.7
LD (ng/mL), n=3	1	1
LQ (ng/mL), n=3	3	3
CT: colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol; CV: coeficiente de variación; DE: desviación estándar; ER: error relativo; 7-KC: 7-cetocolesterol; LD: límite de detección; LQ: límite de cuantificación.		

Gracias a este trabajo, nuestro laboratorio fue pionero en España en implementar la metodología mediante HPLC-ESI-MS/MS para el análisis en plasma de CT y 7-KC. Analizando 107 muestras de plasmas de sujetos sanos de niños y adultos se consiguió establecer un rango control de concentraciones de CT y 7-KC (Fig. 30A). A diferencia de otros autores [195, 210-211], nuestro intervalo de normalidad incluía concentraciones más bajas de CT. En el caso de 7-KC se observaron diferencias significativas entre el grupo de edad pediátrica y el grupo de edad adulta siendo la concentración de 7-KC más baja en los niños que en los adultos (Fig. 30A).

Los resultados de nuestro estudio ayudaron a corroborar la evidencia descrita hasta la fecha [195, 203-213], detectándose niveles elevados de CT y 7-KC en nuestra cohorte

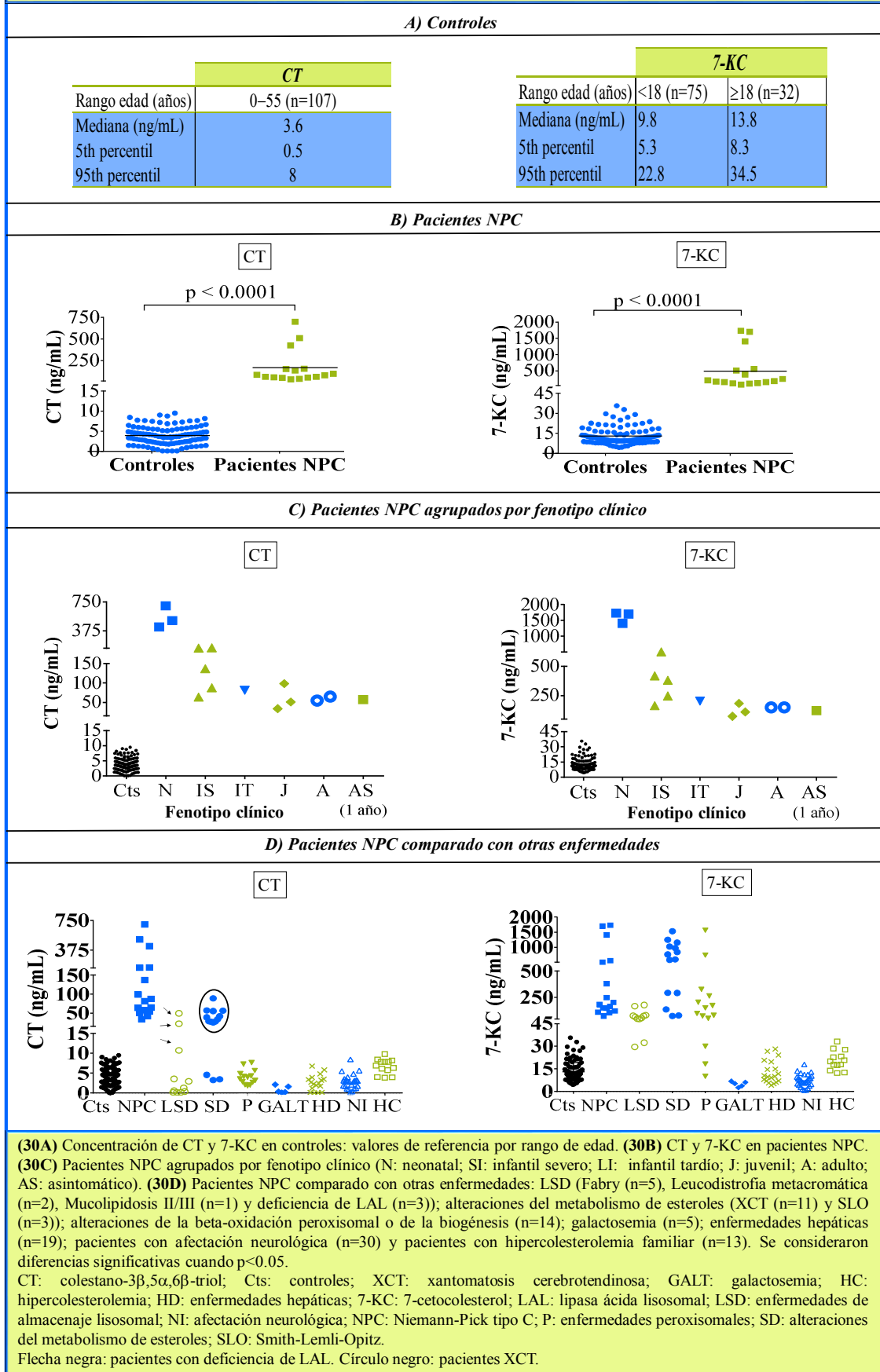
de pacientes NPC (Fig. 30B). Un hecho remarcable de nuestro estudio fue la ausencia de falsos negativos, a diferencia de otros autores que sí han observado niveles normales de CT en pacientes con mutaciones en *NPC1* y *NPC2* [209, 211].

En línea con otros autores [195, 204, 206-207, 209, 211, 213], nuestros datos también evidenciaron una correlación entre los niveles de ambos oxisteroles y el fenotipo clínico/severidad, siendo más elevados en la forma neonatal, intermedios en la forma infantil severa y más bajos en la forma infantil tardía, juvenil y adulta (Fig. 30C).

Nuestro estudio incluye dos pacientes con el fenotipo bioquímico variante los cuales presentaron también niveles elevados de CT y de 7-KC de un orden similar a los niveles hallados en el resto de pacientes que presentaban un fenotipo bioquímico clásico (Tabla suplementaria 1, Artículo 4). Estos datos estarían de acuerdo con los resultados presentados por Stampfer y col. [204] e indicaría que el ensayo tiene una buena sensibilidad en aquellos casos en los que el test de la filipina no es tan claro como en las formas clásicas. No obstante, un estudio reciente llevado a cabo por Romanello y col. [213] describe niveles normales o levemente elevados en pacientes con fenotipo bioquímico variante.

Por otro lado, nuestro estudio también incluye un paciente asintomático cuyos niveles de CT y 7-KC se hallaban elevados (Tabla suplementaria 1, Artículo 4) (Fig. 30C).

Figura 30. Concentración plasmática de CT y 7-KC en controles, pacientes NPC y otras enfermedades.



Después de la publicación del artículo 4, se han diagnosticado 2 nuevos pacientes NPC a través del análisis inicial de oxisteroles (Tabla 3). En ambos pacientes se observó un aumento de la concentración de CT y 7-KC comparado con el rango de referencia, aunque los niveles encontrados eran intermedios-bajos. Estos hallazgos se correlacionarían con el fenotipo clínico ya que uno de los pacientes (paciente 17) presentaba un fenotipo infantil precoz (y un fenotipo bioquímico variante) y el otro paciente (paciente 18) presentaba un fenotipo juvenil. Ambos pacientes fueron confirmados a posteriori con el estudio molecular del gen *NPC1*. Por otro lado, también se ha identificado otro paciente NPC en edad adulta (paciente 19), con fenotipo clínico neurológico sugestivo de la enfermedad y fenotipo bioquímico variante, en el cual los oxisteroles se encontraban moderadamente elevados. Sin embargo, hasta la fecha, sólo se ha encontrado una mutación en el gen *NPC1*, por lo que actualmente está en estudio mediante la secuenciación masiva del genoma.

También se encontraron niveles elevados de CT y 7-KC en otro paciente de 4 años (paciente 20) que presentaba hepatoesplenomegalia y cuya muestra nos fue remitida para el estudio de oxisteroles. El estudio genético confirmó que se trataba de un paciente NPB (Tabla 3).

Tabla 3. Fenotipo clínico, bioquímico y genotipo de nuevos pacientes NPC y NPB diagnosticados a través del análisis de oxisteroles.

Paciente	Edad al análisis de oxisteroles	Síntomas Clínicos	Diagnóstico	Fenotipo Clínico	Fenotipo Bioquímico	Mutación	Efecto en la proteína	CT (ng/mL)	7-KC (ng/mL)
P17	4 años	Retraso mental, ataxia, hipotonía, cataplejía	NPC	Infantil precoz	Variante	c.[352_353delAG] + [3265G>A]	p.[Gln119Valfs*8]+ [Glu1089Lys]	31	100
P18	17 años	Torpeza psicomotriz	NPC	Juvenil	ND	c.[2903A>G] + [3557G>A]	p.[Asn968Ser]+ [Arg1186His]	29	87
P19	62 años	Ataxia, oftalmoplejía vertical, desórdenes del movimiento	NPC	Adulto	Variante	c.[2324A>C]+[?]	p.[Gln775Pro]+[?]	19	40
P20	4 años	Hepatoesplenomegalia	NPB	ND	ND	c.[1252C>T] + [1826_1828delGCC]	p.[Arg418*]+ [p.Arg610del]	81	145

CT: colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol; KC: 7-cetocolesterol; ND: no disponible; NPB; Niemann-Pick tipo B; NPC: Niemann-Pick tipo C.

Toda esta información ha ayudado a conocer mejor cómo se comportan ambos oxiesteroles en las diferentes formas fenotípicas de NPC y su papel como biomarcadores en el diagnóstico bioquímico de la enfermedad.

2.2 Colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol (CT) y 7-cetocolesterol (7-KC) como biomarcadores para la monitorización de tratamientos en la enfermedad de Niemann-Pick tipo C

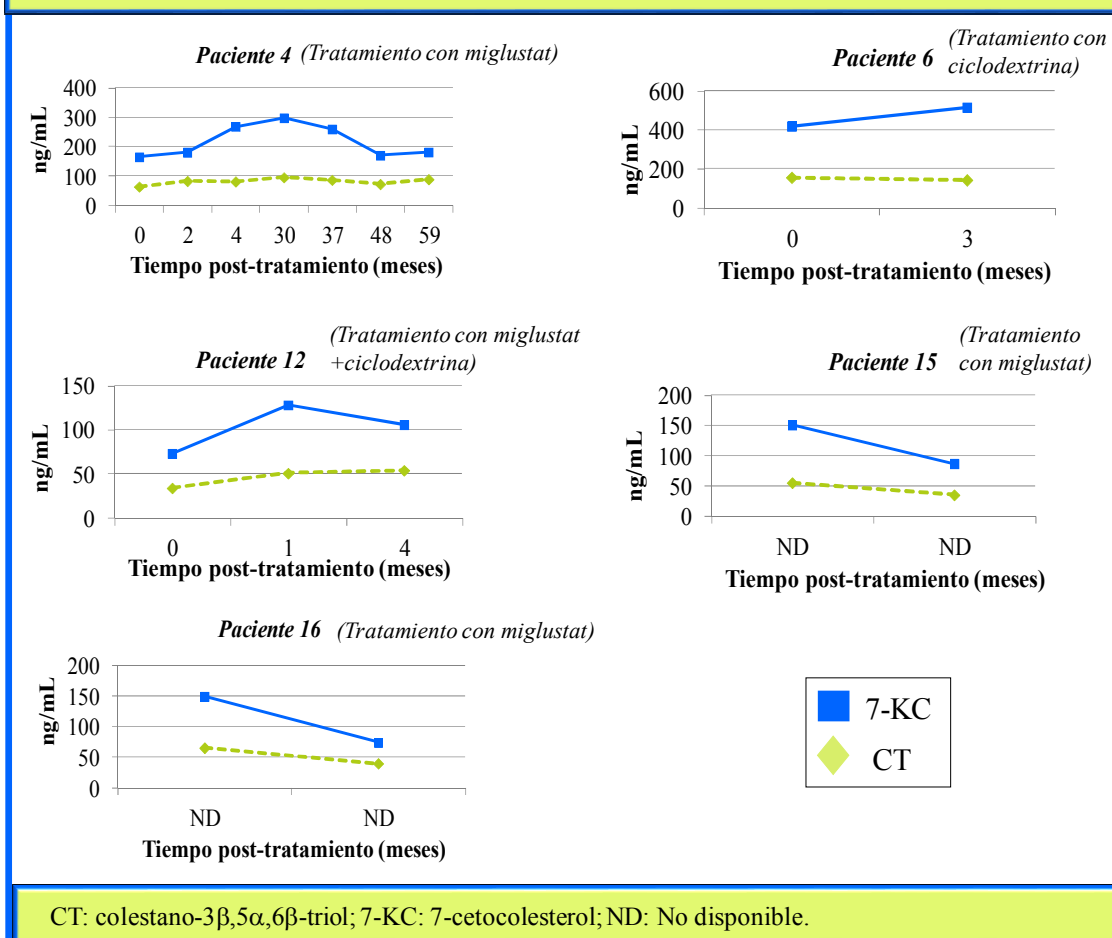
En el estudio reportado por Porter y col. [195] se observó que existía una correlación entre los niveles de CT y 7-KC y la respuesta al tratamiento con ciclodextrina en un modelo felino de la enfermedad de NPC, mostrando una reducción de los niveles de ambos oxiesteroles tras la terapia. Esta evidencia nos motivó a evaluar la concentración de CT y 7-KC en muestras post-tratamiento de pacientes NPC con el objetivo de conocer su papel como biomarcador para la monitorización de tratamientos.

Después de la publicación del artículo 4 se estudiaron 3 pacientes que estaban bajo tratamiento con miglustat, 1 paciente con ciclodextrina y 1 paciente con miglustat y ciclodextrina. La concentración de CT y 7-KC se analizó durante un periodo que fue variable en los diferentes pacientes, desde meses (paciente 6, 12, 15 y 16) hasta periodos más largos, como fue el caso del paciente 4 al que se le realizó un seguimiento durante 4 años. En general, no se observaron mejorías notables en los niveles de ambos oxiesteroles, permaneciendo en todos los casos por encima del rango de referencia (Figura 31).

Estudios recientes en 2 pacientes que recibían tratamiento con ciclodextrina han descrito una reducción de la concentración plasmática de CT [326]. Por ello, creemos que sería interesante realizar un seguimiento a largo plazo del paciente 6 y paciente 12 (que estaban bajo tratamiento con ciclodextrina), para valorar mejor su respuesta farmacológica. El hecho de no disponer de un número suficiente de muestras post-tratamiento de un mismo paciente hace que nuestro estudio sea limitado con resultados poco concluyentes.

Con respecto a la terapia con miglustat, no se ha descrito ningún estudio acerca de los niveles de CT y 7-KC en pacientes en tratamiento con este fármaco. Diversos estudios que evalúan los efectos de miglustat sobre los síntomas clínicos y sobre la fisiopatología de la enfermedad de NPC ponen en entredicho su efectividad [266-267].

Figura 31. Niveles plasmáticos de CT y 7-KC en pacientes NPC en tratamiento con miglustat o ciclodextrina.



La eficacia moderada de miglustat podría deberse a la parcialidad de su mecanismo de acción, ya que actúa reduciendo la producción de glicoesfingolípidos en los Ls, pero sin embargo, no actúa sobre el metabolismo del colesterol, de modo que persiste el acúmulo lisosomal de colesterol libre, lo que explicaría la leve mejoría clínica de estos pacientes [266, 267]. Esta evidencia estaría de acuerdo con el trabajo recogido en esta tesis, en el que se observó que la concentración de CT y 7-KC se mantenía elevada a lo largo del tiempo sin mejoría notable en los diferentes pacientes que recibieron tratamiento con miglustat (a corto y a largo plazo), probablemente debido a los niveles elevados del precursor de los oxisteroles, el colesterol intracelular. Estos resultados sugieren que CT y 7-KC no serían buenos biomarcadores para evaluar ni los efectos agudos ni crónicos del tratamiento con miglustat.

2.3 Colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol (CT) y 7-cetocolesterol (7-KC) en otras enfermedades

Enfermedades lisosomales

Aunque CT y 7-KC estaban claramente elevados en los pacientes NPC, nos propusimos evaluar ambos oxisteroles en diversos grupos de enfermedades con el objetivo de conocer la especificidad de estos marcadores. Una de las enfermedades lisosomales ensayadas fue la deficiencia de lipasa ácida lisosomal (LAL), caracterizada por una acumulación lisosomal de ésteres de colesterol y triglicéridos que es causada por la incapacidad de LAL para degradarlos. La baja disponibilidad celular de colesterol libre induce: una activación, por mediación de SREBP, de la HMG-CoA reductasa; una activación de la endocitosis del colesterol via los receptores LDL; un incremento de la síntesis de apolipoproteína B y un incremento en la producción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Como consecuencia de la activación de todas estas vías se produce un incremento de los niveles de colesterol libre, por ello, los pacientes con deficiencia de LAL presentan dislipidemia con hipercolesterolemia, altos niveles séricos de colesterol LDL, triglicéridos elevados y bajos niveles de colesterol HDL [327-328].

Un hecho interesante de nuestro estudio en los pacientes con deficiencia de LAL fue encontrar niveles elevados no sólo de 7-KC, sino también de CT, siendo éstos últimos similares a los hallados en las formas infantiles y adultas de la enfermedad de NPC (Fig. 30D). Estos resultados estarían de acuerdo con los descritos por Amraoui y col. [329] y recientemente por Boenzi y col. [211] quienes también han encontrado niveles altos de CT y 7-KC en plasma de pacientes con deficiencia de LAL. De manera similar, otros autores ya describieron anteriormente el acúmulo de productos de oxidación del colesterol incluyendo el 7-cetocolesterol éster, 5,6 α -epoxicolesterol éster y 5,6 β -epoxicolesterol en hígado, bazo y glándulas adrenales de pacientes con deficiencia de LAL [330-331]. El 5,6-epoxicolesterol (5,6-EC) es un producto de oxidación del colesterol que puede convertirse en CT mediante la acción enzimática de hidrolasas ácidas [199-200], lo que explicaría los niveles elevados de CT en estos pacientes. Sin embargo, aún quedaría por determinar cómo los ésteres de 5,6-EC se transesterificarían. De igual modo, tal y como se ha mencionado anteriormente, en la deficiencia de LAL la acumulación de ésteres de colesterol da lugar a una depleción de colesterol libre lo que activaría la biosíntesis endógena de colesterol mediante la activación de la HMG-CoA reductasa, por lo que este colesterol sintetizado *de novo* podría contribuir a la formación de oxisteroles [327-328].

En la enfermedad de Niemann Pick tipo A (NPA) y B (NPB) también se han descrito concentraciones elevadas de CT y 7-KC [206, 210-211, 213, 329]. Esta evidencia la pudimos corroborar recientemente en un paciente NPB tal y como hemos mencionado anteriormente (Tabla 3). En la enfermedad de NPA y NPB existe una deficiencia de esfingomielinasa lo que produce una acumulación intracelular de esfingomielina. Diversos estudios han demostrado que la esfingomielina inhibe la proteína NPC2, lo que indica que la esfingomielina participaría en la secreción del colesterol libre desde el lisosoma hacia el exterior [167-168]. Un estudio llevado a cabo por Lee y col. [332] demostró los efectos que producía el exceso de esfingomielina sobre el transporte celular de colesterol en fibroblastos de pacientes NPB, donde se evidenciaba un secuestro lisosomal y atrapamiento de esfingomielina y de colesterol libre intracelular. Además, se demostró un incremento en la biosíntesis de colesterol *de novo*. Dada esta evidencia, los altos niveles de oxiesteroles encontrados en los pacientes NPA y NPB podrían reflejar la acumulación de colesterol libre que se produce en esta enfermedad, de una manera similar a la enfermedad de NPC.

En el resto de enfermedades lisosomales estudiadas (Fabry, leucodistrofia metacromática y mucopolisacáridosis II/III), CT estaba dentro del rango de normalidad mientras que 7-KC se encontraba incrementado (Fig. 30D) tal y como se observó en otras enfermedades lisosomales como Gaucher, lipofuscinosis ceroides neuronal, mucopolisacáridosis tipo II o enfermedad de Pompe [195, 206]. Otros autores [207] también encontraron niveles normales de 7-KC en la enfermedad de Tay-Sachs, Krabbe, adrenoleucodistrofia, leucodistrofia metacromática, mucopolisacáridosis tipo IIIB y enfermedad de Wilson.

Todos estos hallazgos muestran que CT y 7-KC no sólo están elevados en la enfermedad de NPC, sino también en otras lipodosis lisosomales.

Enfermedades del metabolismo de los esteroides

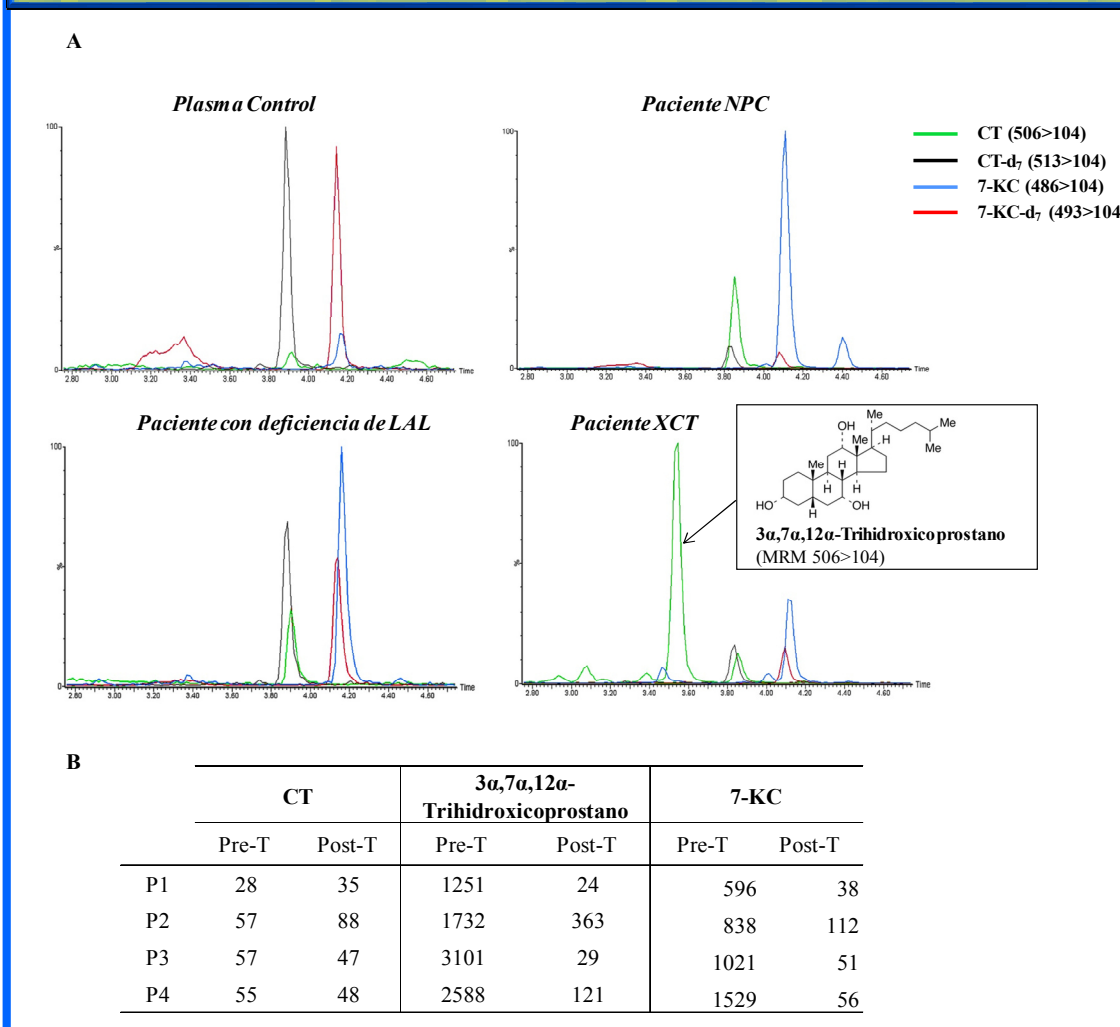
Otro hallazgo destacable de nuestro trabajo fue el nivel elevado de CT en la enfermedad de Xantomatosis cerebrotendinosa (XCT), hallazgo no descrito previamente (Fig. 30D). De acuerdo con estudios previos [333-335], también se observaron concentraciones altas de 7-KC. En la enfermedad de XCT existe una deficiencia de la 27-hidroxilasa

(CYP27A1), cuyo sustrato es el 7-KC. La causa de los niveles elevados de 7-KC sería a consecuencia del metabolismo reducido de esta enzima [336]. Además, parece ser que parte de la acumulación del 7-KC proviene también de la conversión del 7-dehidrocolesterol en 7-KC por mediación de la enzima 7- α -hidroxilasa (CYP7A1) [337]. En estos pacientes existe una activación de esta enzima en hígado [333, 338] produciendo una activación de la síntesis del colesterol con niveles elevados de 7-dehidrocolesterol [339]. Un estudio reciente de Björkhem y col. [335] describe una nueva vía de metabolización del 7-dehidrocolesterol a 7-KC en la que se forma un producto intermedio, colesterol-7,8-epóxido. Este compuesto también se halla incrementado en pacientes con XCT, y tras el tratamiento con ácidos biliares se produce una disminución, tanto del 7-dehidrocolesterol y 7-ketocolesterol, como del colesterol-7,8-epóxido [335].

Un hecho interesante de nuestro estudio fue la detección de un pico adicional en el cromatograma de los pacientes XCT (Fig. 32A). Este compuesto comparte la misma masa y la misma transición que el CT, aunque el tiempo de elución es distinto. En base a datos bibliográficos todo apuntaba que podría tratarse de otro triol, el 3 α , 7 α , 12 α trihidroxipropano (THC), producto de la vía metabólica del ácido cólico, el cual se encuentra incrementado en pacientes XCT [340-341].

Dadas estas premisas analizamos varios pacientes con y sin tratamiento con ácido quenodeoxicólico (CDCA). Observamos que tras el tratamiento los niveles de este pico disminuían considerablemente, mientras que los niveles de CT permanecían inalterados (Fig. 32B), lo que apoyaría nuestra hipótesis inicial de la posibilidad de que se tratara de THC. Recientemente hemos podido comprobar nuestra hipótesis gracias a la cesión de este compuesto sintetizado por el Prof. Björkhem (Karolinska, Suecia). Ello nos ha permitido identificar sin ambigüedades que en efecto nuestro compuesto era THC. Este perfil característico podría ser útil para distinguir los pacientes NPC de los pacientes XCT. Además, los resultados tras el tratamiento con CDCA sugieren que el THC podría ser un buen biomarcador para la monitorización del tratamiento en los pacientes XCT.

Figura 32. Cromatograma (MRM) de un plasma control, paciente NPC, XCT y deficiencia de LAL.



(32A) Cromatogramas MRM de iones extraídos de CT (506>104), CT-d₇ (513>104), 7-KC (486>104) y 7-KC-d₇ (493>104) en un control, paciente con deficiencia de LAL, paciente NPC y paciente XCT. El paciente XCT mostró un pico, con la misma transición que CT, que eluía a los 3.46 minutos (línea verde) y que es probable que sea 3α,7α,12α-trihidroxipropano. **(32 B)** Niveles de CT, 3α,7α,12α-trihidroxipropano y 7-KC antes y después del tratamiento con ácido quenodeoxicólico en pacientes XCT. Valores expresados como ng/mL.

CT: colestano-3β,5α,6β-triol; CT-d₇: colestano-3β,5α,6β-triol-d₇; 7-KC: 7-cetocolesterol; 7-KC-d₇: 7-cetocolesterol-d₇; T: tratamiento; XCT: xantomatosis cerebrotendinosa.

Por otro lado, en la enfermedad de Smith-Lemli-Opitz (SLO) también se hallaron elevaciones de 7-KC en todos los pacientes, tal y como ha sido descrito previamente [335, 342], aunque la concentración de CT era normal (Fig. 30D). En estos pacientes existen niveles incrementados de 7-dehidrocolesterol debido a la deficiencia de la 7-dehidrocolesterol reductasa (DHCR7) que es la responsable de catalizar la reducción de 7-dehidrocolesterol en colesterol [335, 337, 343-346]. De manera similar a la XCT, en

los pacientes SLO parte del 7-KC se generaría a partir del 7-dehidrocolesterol/colesterol-7,8-epóxido por acción de la enzima CYP7A1 [335, 337] cuya actividad es normal o baja en estos pacientes [347].

Enfermedades peroxisomales y otras enfermedades

En el resto de enfermedades estudiadas (trastornos de la biogénesis y β -oxidación peroxisomal, galactosemia, enfermedad hepática inespecífica incluyendo hepatoesplenomegalia y colestasis, hipercolesterolemia familiar y afectación neurológica) la concentración de 7-KC y CT se hallaba dentro del rango de referencia, a excepción de algunos pacientes con enfermedad peroxisomal que presentaban aumentos de 7-KC (Fig. 30D). De acuerdo con nuestros resultados, Boenzi y col. [211] han descrito recientemente niveles normales de CT y 7-KC en la hipercolesterolemia familiar.

Cabe destacar que en todos los casos de colestasis y enfermedades hepáticas neonatales analizadas los niveles de CT y 7-KC eran normales, al contrario de lo descrito por Polo y col. [348]. Probablemente estas diferencias estén estrechamente relacionadas con la etiología del cuadro clínico y bioquímico. Los casos reportados por estos autores [348] con elevación de CT y 7-KC tenían un diagnóstico claro de atresia biliar (a excepción de un paciente con colestasis al que se le encontró mutaciones en *NPC2*). Sin embargo, estos autores también encontraron niveles normales de CT y 7-KC en un paciente con colestasis neonatal transitoria, en línea con nuestros casos analizados en los que la colestasis y el cuadro hepático eran inespecíficos sin ningún diagnóstico definitivo de patología biliar o hepática, probablemente transitorios. Además, el estudio de Polo y col. [348] describía valores de CT más bajos en los pacientes con atresia biliar que en los pacientes NPC, por lo que sugieren la posibilidad de establecer diferentes niveles de concentración para distinguir ambos grupos de patologías. Estos autores también encontraron niveles elevados de ambos oxisteroles en algunos pacientes adultos con hiperbilirrubinemia. Otro trabajo en el que se estudiaba la especificidad de 7-KC también evidenció niveles elevados de 7-KC en un paciente con colestasis neonatal intrahepática causada por deficiencia de citrina [207]. Incluso en pacientes colestásicos con enfermedad hepática crónica y en la infección con el virus de la hepatitis C se han observado niveles elevados de 7-KC [349-350]. Las alteraciones del metabolismo biliar y las enfermedades hepáticas colestásicas podrían afectar a la homeostasis del colesterol

y al estrés oxidativo, de modo que contribuiría a la formación de oxisteroles, en particular de 7-KC. Toda esta evidencia implica la necesidad de evaluar con cautela aquellos resultados elevados de CT y 7-KC.

2.4. ¿Cómo se explicaría la salida de colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol (CT) y 7-cetocolesterol (7-KC) desde la célula a la circulación sanguínea?

El hecho de hallar estos oxisteroles en el plasma de pacientes de las diferentes enfermedades, probablemente sea debido al transporte de los oxisteroles vía los transportadores ABC, involucrados en el eflujo celular de oxisteroles, esteroides, fosfolípidos y esfingomielina al exterior de la célula hacia las partículas HDL y sus apolipoproteínas [351-353]. Estos transportadores han sido localizados en la membrana plasmática, peroxisoma, mitocondria, ER o cuerpos lamelares [354-357]; 7-KC ha sido descrito como sustrato de estos transportadores, en particular del transportador ABCG1 [358]. Recientemente, se ha demostrado que CT también es sustrato para ABCG1 [359]. Diversos trabajos han descrito que ABCG1 no sólo se encuentra en la membrana plasmática de la célula, sino también en los ETs, demostrando que ABCG1 desempeña una función importante en la modulación del tráfico intracelular de los esteroides [360-361]. Toda esta evidencia explicaría los niveles elevados de CT y 7-KC encontrados en plasma en las diferentes lipodosis estudiadas, deficiencia de LAL, NPB y XCT, y sobretodo de la enfermedad de NPC. En estas enfermedades, como en otras neurodegenerativas, existe un elevado estrés oxidativo [201-202, 362-363], lo que contribuiría a la formación de oxisteroles en el interior de la célula, que por mediación de ABCG1 saldrían al exterior de la misma. De este modo, ABCG1 actuaría como un agente detoxificador de oxisteroles eliminando CT y 7-KC de la célula.

2.5 Resumen del papel de colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol (CT) y 7-cetocolesterol (7-KC)

Con este trabajo hemos demostrado que CT y 7-KC son biomarcadores sensibles de la enfermedad de NPC. CT puede estar incrementado en otras enfermedades como la deficiencia de lipasa ácida lisosomal (LAL), XCT o NPA/NPB, mientras que 7-KC es más inespecífico. El método que hemos desarrollado mediante HPLC-ESI-MS/MS es un método rápido y sensible para el diagnóstico de las formas variantes de NPC, por ello, hemos incluido esta estrategia en la primera línea diagnóstica de la enfermedad de

NPC en nuestro laboratorio asistencial. Con ello, esperamos identificar nuevos pacientes, no sólo de la enfermedad NPC, sino también de otras enfermedades como XCT, deficiencia de LAL o NPA/NPB.

CONCLUSIONES



1. Los modelos validados de deficiencia de CRTR, barrera hematoencefálica, endotelio vascular, así como células iPS, podrían ser una buena herramienta para ensayar la eficacia de compuestos para dicha deficiencia.
2. El tratamiento con fosfocreatina-Mg-complex, creatina-benzil-éster y nanopartículas de oro unidas a creatina, no incrementa el contenido intracelular de creatina en ninguno de los modelos ensayados. Por lo tanto, son necesarios productos más estables y más lipofílicos que puedan atravesar las membranas celulares sin necesidad del transportador de Cr o CRTR.
3. El tratamiento con arginina y glicina no supone ninguna mejoría en la síntesis endógena de Cr, por lo que el tratamiento con precursores de Cr tampoco sería una buena estrategia terapéutica.
4. La actividad plasmática, pero no la actividad en fibroblastos, de creatina quinasa podría ser un biomarcador de las deficiencias cerebrales de creatina (CCDS).
5. El análisis del contenido de Cr/CrP/ATP en fibroblastos de pacientes con CCDS podría ser una herramienta útil para la valoración de la respuesta celular a tratamientos.
6. La Cr de forma aislada no sería un biomarcador sensible para las enfermedades mitocondriales, aunque unido a otros biomarcadores más específicos podría reforzar la idea de una enfermedad mitocondrial.
7. En el diagnóstico diferencial de la deficiencia de CRTR, es necesario tener en cuenta que algunos pacientes con deficiencias de la cadena respiratoria mitocondrial pueden tener elevaciones de Cr, lo que podría explicar los falsos positivos encontrados en la deficiencia de CRTR.
8. El análisis de oxiesteroles, colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol (CT) y 7-cetocolesterol (7-KC), mediante HPLC-ESI-MS/MS es una metodología rápida y sensible capaz de discriminar entre pacientes Niemann-Pick tipo C (NPC) y sujetos sanos. Además, el método desarrollado es adecuado para el diagnóstico de las formas variantes de la enfermedad.
9. Todos los pacientes NPC presentan niveles altos de CT y 7-KC, con ausencia de falsos negativos. CT puede estar incrementado en otras enfermedades como la deficiencia de lipasa ácida lisosomal (LAL), XCT o NPA/NPB, mientras que 7-KC es más inespecífico.
10. Existe una correlación entre los niveles de CT y 7-KC y el fenotipo clínico/severidad de la enfermedad de NPC.

11. CT y 7-KC no son buenos biomarcadores para la monitorización terapéutica de miglustat.

12. Hemos demostrado por primera vez en la literatura que esta misma metodología nos permite identificar los pacientes con xantomatosis cerebrotendinosa (XCT) mediante la detección del triol 3α , 7α , 12α trihidroxicoprostano. Dicho triol, es un biomarcador adecuado tanto para la monitorización del tratamiento como para el diagnóstico de los pacientes con XCT.

13. Hemos incluido el análisis de CT y 7-KC en la primera línea diagnóstica de la enfermedad de NPC en nuestro laboratorio asistencial. Con ello, esperamos identificar nuevos pacientes, no sólo de la enfermedad NPC, sino también de otras enfermedades como XCT, deficiencia de LAL o NPA/NPB.

BIBLIOGRAFÍA



- [1] Chevreul 1835, cited in Rose WC. The metabolism of creatine and creatinine. *Annu. Rev. Biochem.* 1933;2:187-190.
- [2] Liebig J. Kreatin und Kreatinin, Bestandtheile des Harns der Menschen. *J. Prakt. Chem.* 1847;40:288-292.
- [3] Von Figura K, Hanefeld F, Isbrandt D, Stöckler-Ipsiroglu S. Guanidinoacetate methyltransferase deficiency. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D (Eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill Company, United States, 2001;pp:1897-1908.
- [4] Hoogwerf BJ, Laine DC, Greene E. Urine C-peptide and creatinine (Jaffe method) excretion in healthy young adults on varied diets: sustained effects of varied carbohydrate, protein, and meat content. *Am. J. Clin. Nutr.* 1986;43(3):350-360.
- [5] Nash SR, Giros B, Kingsmore SF, Rochelle JM, Suter ST, Gregor P, Seldin MF et al. Cloning, pharmacological characterization, and genomic localization of the human creatine transporter. *Receptors Channels.* 1994;2(2):165-174.
- [6] Chen NH, Reith ME, Quick MW. Synaptic uptake and beyond: the sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family SLC6. *Pflugers Arch.* 2004;447(5):519-531.
- [7] Sora I, Richman J, Santoro G, Wei H, Wang Y, Vanderah T, Horvath R, et al. The cloning and expression of a human creatine transporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994;204(1):419-427.
- [8] Sandoval N, Bauer D, Brenner V, Coy JF, Drescher B, Kioschis P, Korn B, et al. The genomic organization of a human creatine transporter (CRTR) gene located in Xq28. *Genomics.* 1996;35(2):383-385.
- [9] Iyer GS, Krahe R, Goodwin LA, Doggett NA, Siciliano MJ, Funanage VL, Proujansky R. Identification of a testis-expressed creatine transporter gene at 16p11.2 and confirmation of the X-linked locus to Xq28. *Genomics.* 1996;34(1):143-146.
- [10] Eichler EE, Lu F, Shen Y, Antonacci R, Jurecic V, Doggett NA, Moyzis RK, et al. Duplication of a gene-rich cluster between 16p11.1 and Xq28: a novel pericentromeric-directed mechanism for paralogous genome evolution. *Hum. Mol. Genet.* 1996;5(7):899-912.
- [11] Höglund PJ, Adzic D, Scicluna SJ, Lindblom J, Fredriksson R. The repertoire of solute carriers of family 6: identification of new human and rodent genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005;336(1):175-189.
- [12] Ndika JD, Lusink V, Beaubrun C, Kanhai W, Martinez-Munoz C, Jakobs C, Salomons GS. Cloning and characterization of the promoter regions from the parent and paralogous creatine transporter genes. *Gene.* 2014;533(2):488-493.
- [13] Ndika JD, Martinez-Munoz C, Anand N, van Dooren SJ, Kanhai W, Smith DE, Jakobs C, et al. Post-transcriptional regulation of the creatine transporter gene: functional relevance of alternative splicing. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014;1840(6):2070-2079.
- [14] Bayou N, M'rad R, Belhaj A, Daoud H, Zemni R, Briault S, Helayem MB, et al. The creatine transporter gene paralogous at 16p11.2 is expressed in human brain. *Comp. Funct. Genomics.* 2008;609684.
- [15] European Molecular biology Laboratory. The european bioinformatics Institute. www.ebi.ac.uk/gxa/gene/ENSG00000214617. Accessed December 2015.
- [16] Guimbal C, Kilimann MW. A Na⁺-dependent creatine transporter in rabbit brain, muscle, heart, and kidney. cDNA cloning and functional expression. *J. Biol. Chem.* 1993;268(12):8418-8421.

- [17] Walker JB. Creatine: biosynthesis, regulation, and function. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 1979;50:177-242.
- [18] Dai W, Vinnakota S, Qian X, Kunze DL, Sarkar HK. Molecular characterization of the human CRT-1 creatine transporter expressed in *Xenopus* oocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1999;361(1):75-84.
- [19] Snow RJ, Murphy RM. Creatine and the creatine transporter: a review. *Mol. Cell. Biochem.* 2001;224(1-2):169-181.
- [20] Daly MM, Seifter S. Uptake of creatine by cultured cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 1980;203(1):317-324.
- [21] Syllm-Rapoport I, Daniel A, Starck H, Götze W, Hartwig A, Gross J, Rapoport S. Creatine in red cells: transport and erythropoietic dynamics. *Acta Biol. Med. Ger.* 1981;40(4-5):653-659.
- [22] Loike JD, Somes M, Silverstein SC. Creatine uptake, metabolism, and efflux in human monocytes and macrophages. *Am. J. Physiol.* 1986;251(1Pt 1):C128-135.
- [23] de Souza CF, Kalloniatis M, Christie DL, Polkinghorne PJ, McGhee CN, Acosta ML. Creatine transporter immunolocalization in aged human and detached retinas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2012;53(4):1936-1945.
- [24] Abplanalp J, Laczko E, Philp NJ, Neidhardt J, Zuercher J, Braun P, Schorderet DF, et al. The cataract and glucosuria associated monocarboxylate transporter MCT12 is a new creatine transporter. *Hum. Mol. Genet.* 2013;22(16):3218-3226.
- [25] Li H, Thali RF, Smolak C, Gong F, Alzamora R, Wallimann T, Scholz R, et al. Regulation of the creatine transporter by AMP-activated protein kinase in kidney epithelial cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2010;299(1):F167-177.
- [26] Peral MJ, García-Delgado M, Calonge ML, Durán JM, De La Horra MC, Wallimann T, Speer O, et al. Human, rat and chicken small intestinal Na⁺-Cl⁻-creatine transporter: functional, molecular characterization and localization. *J. Physiol.* 2002;545(Pt 1):133-144.
- [27] Halestrap AP, Meredith D. The *SLC16* gene family—from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch.* 2004;447(5):619-628.
- [28] Kloeckener-Gruissem B, Vandekerckhove K, Nürnberg G, Neidhardt J, Zeitz C, Nürnberg P, Schipper I, et al. Mutation of solute carrier *SLC16A12* associates with a syndrome combining juvenile cataract with microcornea and renal glucosuria. *Am. J. Hum. Genet.* 2008;82(3):772-779.
- [29] Castorino JJ, Gallagher-Colombo SM, Levin AV, Fitzgerald PG, Polishook J, Kloeckener-Gruissem B, Ostertag E, et al. Juvenile cataract-associated mutation of solute carrier *SLC16A12* impairs trafficking of the protein to the plasma membrane. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011;52(9):6774-6784.
- [30] van de Kamp JM, Mancini GM, Salomons GS. X-linked creatine transporter deficiency: clinical aspects and pathophysiology. *J. Inher. Metab. Dis.* 2014;37(5):715-733.
- [31] Braissant O, Henry H, Loup M, Eilers B, Bachmann C. Endogenous synthesis and transport of creatine in the rat brain: an in situ hybridization study. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2001;86(1-2):193-201.
- [32] Mak CS, Waldvogel HJ, Dodd JR, Gilbert RT, Lowe MT, Birch NP, Faull RL, et al. Immunohistochemical localisation of the creatine transporter in the rat brain. *Neuroscience.* 2009;163(2):571-585.
- [33] Lowe MT, Faull RL, Christie DL, Waldvogel HJ. Distribution of the creatine transporter throughout the human brain reveals a spectrum of creatine transporter immunoreactivity. *J. Comp. Neurol.* 2014;523(5):699-725

- [34] Ohtsuki S, Tachikawa M, Takanaga H, Shimizu H, Watanabe M, Hosoya K, Terasaki T. The blood-brain barrier creatine transporter is a major pathway for supplying creatine to the brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2002;22(11):1327-1335.
- [35] Tachikawa M, Hosoya K, Ohtsuki S, Terasaki T. A novel relationship between creatine transport at the blood-brain and blood-retinal barriers, creatine biosynthesis, and its use for brain and retinal energy homeostasis. *Subcell. Biochem.* 2007;46:83-98.
- [36] Tachikawa M, Hosoya K. Transport characteristics of guanidino compounds at the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier: relevance to neural disorders. *Fluids Barriers CNS.* 2011;8(1):13.
- [37] Braissant O. Creatine and guanidinoacetate transport at blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2012;35(4):655-664.
- [38] Perasso L, Cupello A, Lunardi GL, Principato C, Gandolfo C, Balestrino M. Kinetics of creatine in blood and brain after intraperitoneal injection in the rat. *Brain Res.* 2003;974(1-2):37-42.
- [39] Defalco AJ, Davies RK. The synthesis of creatine by the brain of the intact rat. *J. Neurochem.* 1961;7:308-312.
- [40] Dringen R, Verleysdonk S, Hamprecht B, Willker W, Leibfritz D, Brand A. Metabolism of glycine in primary astroglial cells: synthesis of creatine, serine, and glutathione. *J. Neurochem.* 1998;70(2):835-840.
- [41] Braissant O, Cagnon L, Monnet-Tschudi F, Speer O, Wallimann T, Honegger P, Henry H. Ammonium alters creatine transport and synthesis in a 3D culture of developing brain cells, resulting in secondary cerebral creatine deficiency. *Eur. J. Neurosci.* 2008;27(7):1673-1685.
- [42] Braissant O, Henry H. AGAT, GAMT and SLC6A8 distribution in the central nervous system, in relation to creatine deficiency syndromes: a review. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2008;31(2):230-9.
- [43] Carducci C, Carducci C, Santagata S, Adriano E, Artiola C, Thellung S, Gatta E, et al. In vitro study of uptake and synthesis of creatine and its precursors by cerebellar granule cells and astrocytes suggests some hypotheses on the physiopathology of the inherited disorders of creatine metabolism. *BMC Neurosci.* 2012;13:41.
- [44] Braissant O, Béard E, Torrent C, Henry H. Dissociation of AGAT, GAMT and SLC6A8 in CNS: relevance to creatine deficiency syndromes. *Neurobiol. Dis.* 2010;37(2):423-33.
- [45] Tachikawa M, Kasai Y, Yokoyama R, Fujinawa J, Ganapathy V, Terasaki T, Hosoya K. The blood-brain barrier transport and cerebral distribution of guanidinoacetate in rats: involvement of creatine and taurine transporters. *J. Neurochem.* 2009;111(2):499-509.
- [46] van de Kamp JM, Jakobs C, Gibson KM, Salomons GS. New insights into creatine transporter deficiency: the importance of recycling creatine in the brain. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2013;36(1):155-6.
- [47] Almeida LS, Salomons GS, Hogenboom F, Jakobs C, Schoffemeer AN. Exocytotic release of creatine in rat brain. *Synapse.* 2006;60:118-23.
- [48] Dodd JR, Birch NP, Waldvogel HJ, Christie DL. Functional and immunocytochemical characterization of the creatine transporter in rat hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 2010;115(3):684-93.
- [49] Peral MJ, Vázquez-Carretero MD, Ilundain AA. Na⁺/Cl⁻/creatine transporter activity and expression in rat brain synaptosomes. *Neuroscience.* 2010;165(1):53-60.
- [50] Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and

- fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem. J.* 1992;281 (Pt1) 21-40.
- [51] Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol. Rev.* 2000;80(3): 1107-1213.
- [52] Schlattner U, Tokarska-Schlattner M, Wallimann T. Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006;1762(2):164-180.
- [53] Timohhina N, Guzun R, Tepp K, Monge C, Varikmaa M, Vija H, Sikk P, et al. Direct measurement of energy fluxes from mitochondria into cytoplasm in permeabilized cardiac cells in situ: some evidence for Mitochondrial Interactosome. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2009;41(3):259-275.
- [54] Béard E, Braissant O. Synthesis and transport of creatine in the CNS: importance for cerebral functions. *J. Neurochem.* 2010;115(2):297-313.
- [55] Wallimann T, Tokarska-Schlattner M, Schlattner U. The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. *Amino Acids.* 2011;40(5):1271-96.
- [56] Kley RA, Tarnopolsky MA, Vorgerd M. Creatine for treating muscle disorders. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2013;6:CD004760.
- [57] Alves CR, Santiago BM, Lima FR, Otaduy MC, Calich AL, Tritto AC, de Sá Pinto AL, et al. Creatine supplementation in fibromyalgia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Care Res.* 2013;65(9):1449-1459.
- [58] Beal MF. Neuroprotective effects of creatine. *Amino Acids.* 2011;40(5):1305-1313.
- [59] Stöckler S, Holzbach U, Hanefeld F, Marquardt I, Helms G, Requart M, Hänicke W, et al. Creatine deficiency in the brain: a new, treatable inborn error of metabolism. *Pediatr. Res.* 1994;36(3):409-413.
- [60] Stöckler S, Isbrandt D, Hanefeld F, Schmidt B, von Figura K. Guanidinoacetate methyltransferase deficiency: the first inborn error of creatine metabolism in man. *Am. J. Hum. Genet.* 1996;58(5):914-922.
- [61] Mercimek-Mahmutoglu S, Stöckler-Ipsiroglu S, Salmons GS. Creatine Deficiency Syndromes. In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Stephens K, ed. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2016.
- [62] Mercimek-Mahmutoglu S, Ndika J, Kanhai W, de Villemeur TB, Cheillan D, Christensen E, Dorison N, et al. Thirteen new patients with guanidinoacetate methyltransferase deficiency and functional characterization of nineteen novel missense variants in the *GAMT* gene. *Hum. Mutat.* 2014;35(4):462-469.
- [63] Isbrandt D, von Figura K. Cloning and sequence analysis of human guanidinoacetate N-methyltransferase cDNA. *Biochim. Biophys. Acta.* 1995;1264(3):265-267.
- [64] Jenne DE, Olsen AS, Zimmer M. The human guanidinoacetate methyltransferase (*GAMT*) gene maps to a syntenic region on 19p13.3, homologous to band C of mouse chromosome 10, but *GAMT* is not mutated in jittery mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997;238(3):723-727.
- [65] Chae YJ, Chung CE, Kim BJ, Lee MH, Lee H. The gene encoding guanidinoacetate methyltransferase (*GAMT*) maps to human chromosome 19 at band p13.3 and to mouse chromosome 10. *Genomics.* 1998;49(1):162-164.
- [66] Leuzzi V, Mastrangelo M, Battini R, Cioni G. Inborn errors of creatine metabolism and epilepsy. *Epilepsia.* 2013;54(2):217-227.
- [67] Mikati AG, Abu Gheida I, Shamseddine A, Mikati MA, Karam PE. Epileptic and electroencephalographic manifestations of guanidinoacetate-methyltransferase deficiency. *Epileptic Disord.* 2013;15(4):407-416.

- [68] Mercimek-Mahmutoglu S, Stoeckler-Ipsiroglu S, Adami A, Appleton R, Araújo HC, Duran M, Ensenauer R, et al. GAMT deficiency: features, treatment, and outcome in an inborn error of creatine synthesis. *Neurology*. 2006;67(3):480-484.
- [69] O'Rourke DJ, Ryan S, Salomons G, Jakobs C, Monavari A, King MD. Guanidinoacetate methyltransferase (GAMT) deficiency: late onset of movement disorder and preserved expressive language. *Dev. Med. Child. Neurol.* 2009;51(5):404-407.
- [70] Dhar SU, Scaglia F, Li FY, Smith L, Barshop BA, Eng CM, Haas RH, et al. Expanded clinical and molecular spectrum of guanidinoacetate methyltransferase (GAMT) deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 2009;96(1):38-43.
- [71] Hinnell C, Samuel M, Alkufri F, Ashkan K, Rahman Y, Turner C, Dalton RN, et al. Creatine deficiency syndromes: diagnostic pearls and pitfalls. *Can. J. Neurol. Sci.* 2011;38(5):765-767.
- [72] Mori A. Biochemistry and neurotoxicology of guanidino compounds. History and recent advances. *Pavlov. J. Biol. Sci.* 1987;22(3):85-94.
- [73] D'Hooge R, Pei YQ, Marescau B, De Deyn PP. Convulsive action and toxicity of uremic guanidino compounds: behavioral assessment and relation to brain concentration in adult mice. *J. Neurol. Sci.* 1992;112(1-2):96-105.
- [74] De Deyn PP, Marescau B, Macdonald RL. Guanidino compounds that are increased in hyperargininemia inhibit GABA and glycine responses on mouse neurons in cell culture. *Epilepsy Res.* 1991;8(2):134-141.
- [75] Isbrandt D, Schmidt A, Neu A, Röper J, Steinfeld R, Ullrich K. Generation of a knockout mouse model for guanidino-acetate methyltransferase (GAMT) deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2000;23(Supl 1):212-212.
- [76] Neu A, Neuhoff H, Trube G, Fehr S, Ullrich K, Roeper J, Isbrandt D. Activation of GABA_A receptors by guanidinoacetate: a novel pathophysiological mechanism. *Neurobiol. Dis.* 2002;11(2),pp.298-307.
- [77] Mori A, Kohno M, Masumizu T, Noda Y, Packer L. Guanidino compounds generate reactive oxygen species. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1996;40(1):135-143.
- [78] Item CB, Mercimek-Mahmutoglu S, Battini R, Edlinger-Horvat C, Stromberger C, Bodamer O, Mühl A, et al. Characterization of seven novel mutations in seven patients with GAMT deficiency. *Hum. Mutat.* 2004;23(5):524.
- [79] Bianchi MC, Tosetti M, Fornai F, Alessandri' MG, Cipriani P, De Vito G, Canapicchi R. Reversible brain creatine deficiency in two sisters with normal blood creatine level. *Ann. Neurol.* 2000;47(4):511-513.
- [80] Item CB, Stöckler-Ipsiroglu S, Stromberger C, Mühl A, Alessandri MG, Bianchi MC, Tosetti M, et al. Arginine:glycine amidinotransferase deficiency: the third inborn error of creatine metabolism in humans. *Am. J. Hum. Genet.* 2001;69(5):1127-1133.
- [81] McGuire DM, Gross MD, Elde RP, van Pilsum JF. Localization of L-arginine-glycine amidinotransferase protein in rat tissues by immunofluorescence microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 1986;34(4):429-435.
- [82] Salomons GS, van Dooren SJ, Verhoeven NM, Cecil KM, Ball WS, Degrauw TJ, Jakobs C. X-linked creatine-transporter gene (*SLC6A8*) defect: a new creatine-deficiency syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 2001;68(6):1497-1500.
- [83] van de Kamp JM, Betsalel OT, Mercimek-Mahmutoglu S, Abulhoul L, Grünewald S, Anselm I, Azzouz H, et al. Phenotype and genotype in 101 males with X-linked creatine transporter deficiency. *J. Med. Genet.* 2013;50(7):463-472.

- [84] Institute of Medical Genetics in Cardiff. The Human Gene Mutation Database. <http://www.hgmd.org>. Accessed May 2016.
- [85] Betsalel OT, Pop A, Rosenberg EH, Fernandez-Ojeda M; Creatine Transporter Research, Group, Jakobs C, et al. Detection of variants in *SLC6A8* and functional analysis of unclassified missense variants. *Mol. Genet. Metab.* 2012;105(4):596-601.
- [86] Puusepp H, Kall K, Salomons GS, Talvik I, Männamaa M, Rein R, Jakobs C, et al. The screening of *SLC6A8* deficiency among Estonian families with X-linked mental retardation. *J. Inher. Metab. Dis.* 2010;33 Suppl 3:S5-11.
- [87] Mancardi MM, Caruso U, Schiaffino MC, Baglietto MG, Rossi A, Battaglia FM, Salomons GS, et al. Severe epilepsy in X-linked creatine transporter defect (CRTR-D). *Epilepsia.* 2007;48(6):1211-1213.
- [88] Anselm IA, Alkuraya FS, Salomons GS, Jakobs C, Fulton AB, Mazumdar M, Rivkin M, et al. X-linked creatine transporter defect: a report on two unrelated boys with a severe clinical phenotype. *J. Inher. Metab. Dis.* 2006;29(1):214-219.
- [89] Osaka H, Takagi A, Tsuyusaki Y, Wada T, Iai M, Yamashita S, Shimbo H, et al. Contiguous deletion of *SLC6A8* and *BAP31* in a patient with severe dystonia and sensorineural deafness. *Mol. Genet. Metab.* 2012;106(1):43-47.
- [90] Cacciagli P, Sutera-Sardo J, Borges-Correia A, Roux JC, Dorboz I, Desvignes JP, Badens C, et al. Mutations in *BCAP31* cause a severe X-linked phenotype with deafness, dystonia, and central hypomyelination and disorganize the Golgi apparatus. *Am. J. Hum. Genet.* 2013;93(3):579-586.
- [91] van de Kamp JM, Errami A, Howidi M, Anselm I, Winter S, Phalin-Roque J, Osaka H, et al. Genotype-phenotype correlation of contiguous gene deletions of *SLC6A8*, *BCAP31* and *ABCD1*. *Clin. Genet.* 2015;87(2):141-147.
- [92] Mancini GM, Catsman-Berrevoets CE, de Coo IF, Aarsen FK, Kamphoven JH, Huijmans JG, Duran M, et al. Two novel mutations in *SLC6A8* cause creatine transporter defect and distinctive X-linked mental retardation in two unrelated Dutch families. *Am. J. Med. Genet A.* 2005;132A(3):288-295.
- [93] Anselm IA, Coulter DL, Darras BT. Cardiac manifestations in a child with a novel mutation in creatine transporter gene *SLC6A8*. *Neurology.* 2008;70(18):1642-1644.
- [94] DeGrauw TJ, Cecil KM, Byars AW, Salomons GS, Ball WS, Jakobs C. The clinical syndrome of creatine transporter deficiency. *Mol. Cell. Biochem.* 2003;244(1-2):45-48.
- [95] Rosenberg EH, Almeida LS, Kleefstra T, deGrauw RS, Yntema HG, Bahi N, Moraine C, et al. High prevalence of *SLC6A8* deficiency in X-linked mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* 2004;75(1):97-105.
- [96] van de Kamp JM, Mancini GM, Pouwels PJ, Betsalel OT, van Dooren SJ, de Koning I, Steenweg ME, et al. Clinical features and X-inactivation in females heterozygous for creatine transporter defect. *Clin. Genet.* 2011;79(3):264-272.
- [97] Mercimek-Mahmutoglu S, Connolly MB, Poskitt KJ, Horvath GA, Lowry N, Salomons GS, Casey B, et al. Treatment of intractable epilepsy in a female with *SLC6A8* deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 2010;101(4):409-412.
- [98] Valayannopoulos V, Boddaert N, Chabli A, Barbier V, Desguerre I, Philippe A, Afenjar A, et al. Treatment by oral creatine, L-arginine and L-glycine in six severely affected patients with creatine transporter defect. *J. Inher. Metab. Dis.* 2012;35(1):151-157.
- [99] Cheillan D, Joncquel-Chevalier Curt M, Briand G, Salomons GS, Mention-Mulliez K, Dobbelaere D, Cuisset JM, et al. Screening for primary creatine deficiencies in French patients with unexplained neurological symptoms. *Orphanet J. Rare Dis.* 2012;7:96.

- [100] Vandekerckhove K, Lange AP, Herzog D, Schipper I. Juvenile cataract associated with microcornea and glucosuria: a new syndrome. *Klin. Monbl. Augenheilkd.* 2007;224(4):344-346.
- [101] Verhoeven NM, Salomons GS, Jakobs C. Laboratory diagnosis of defects of creatine biosynthesis and transport. *Clin. Chim. Acta.* 2005;361:1-9.
- [102] Arias A, Corbella M, Fons C, Sempere A, García-Villoria J, Ormazabal A, Poo P, et al. Creatine transporter deficiency: prevalence among patients with mental retardation and pitfalls in metabolite screening. *Clin. Biochem.* 2007;40(16-17):1328-1331.
- [103] Arias-Dimas A, Vilaseca MA, Artuch R, Ribes A, Campistol J. Diagnosis and treatment of brain creatine deficiency syndromes. *Rev. Neurol.* 2006;43(5):302-308.
- [104] Campistol J, Arias-Dimas A, Poo P, Pineda M, Hoffman M, Vilaseca MA, Artuch R, et al. Cerebral creatine transporter deficiency: an infradiagnosed neurometabolic disease. *Rev. Neurol.* 2007;44(6):343-347.
- [105] Balsom PD, Söderlund K, Ekblom B. Creatine in humans with special reference to creatine supplementation. *Sports Med.* 1994;18(4):268-280.
- [106] Schulze A, Ebinger F, Rating D, Mayatepek E. Improving treatment of guanidinoacetate methyltransferase deficiency: reduction of guanidinoacetic acid in body fluids by arginine restriction and ornithine supplementation. *Mol. Genet. Metab.* 2001;74(4):413-419.
- [107] Schulze A, Bachert P, Schlemmer H, Harting I, Polster T, Salomons GS, Verhoeven NM, et al. Lack of creatine in muscle and brain in an adult with GAMT deficiency. *Ann. Neurol.* 2003;53(2):248-251.
- [108] Schulze A, Hoffmann GF, Bachert P, Kirsch S, Salomons GS, Verhoeven NM, Mayatepek E, et al. Presymptomatic treatment of neonatal guanidinoacetate methyltransferase deficiency. *Neurology.* 2006;67(4):719-721.
- [109] Leuzzi V, Alessandri MG, Casarano M, Battini R, Cioni G. Arginine and glycine stimulate creatine synthesis in creatine transporter 1-deficient lymphoblasts. *Anal. Biochem.* 2008;375(1):153-155.
- [110] Chilosi A, Leuzzi V, Battini R, Tosetti M, Ferretti G, Comparini A, Casarano M, et al. Treatment with L-arginine improves neuropsychological disorders in a child with creatine transporter defect. *Neurocase.* 2008;14(2):151-161.
- [111] Chilosi A, Casarano M, Comparini A, Battaglia FM, Mancardi MM, Schiaffino C, Tosetti M, et al. Neuropsychological profile and clinical effects of arginine treatment in children with creatine transport deficiency. *Orphanet J. Rare Dis.* 2012;7:43.
- [112] Fons C, Sempere A, Arias A, López-Salas A, Poo P, Pineda M, Mas M, et al. Arginine supplementation in four patients with X-linked creatine transporter defect. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2008;31(6):724-728.
- [113] Lunardi G, Parodi A, Perasso L, Pohvozcheva AV, Scarrone S, Adriano E, Florio T, et al. The creatine transporter mediates the uptake of creatine by brain tissue, but not the uptake of two creatine-derived compounds. *Neuroscience.* 2006;142:991-997.
- [114] Kurosawa Y, Degrauw TJ, Lindquist DM, Blanco VM, Pyne-Geithman GJ, Daikoku T, Chambers JB, et al. Cyclocreatine treatment improves cognition in mice with creatine transporter deficiency. *J. Clin. Invest.* 2012;122(8):2837-2846.
- [115] Trotier-Faurion A, Dézard S, Taran F, Valayannopoulos V, de Lonlay P, Mabondzo A. Synthesis and biological evaluation of new creatine Fatty esters revealed dodecyl creatine ester as a promising drug candidate for the treatment of the creatine transporter deficiency. *J. Med. Chem.* 2013;56(12):5173-5181.
- [116] Garbati P, Adriano E, Salis A, Ravera S, Damonte G, Millo E, Balestrino M. Effects of amide creatine derivatives in brain hippocampal slices, and their possible usefulness for curing creatine transporter deficiency. *Neurochem. Res.* 2014;39(1):37-45.

- [117] Mercimek-Mahmutoglu S, Al-Thihli K, Roland E. Is low serum creatine kinase a nonspecific screening marker for creatine deficiency syndromes? *Mol. Genet. Metab.* 2012;106(2):251-2.
- [118] Shaham O, Slate NG, Goldberger O, Xu Q, Ramanathan A, Souza AL, Clish CB, et al. A plasma signature of human mitochondrial disease revealed through metabolic profiling of spent media from cultured muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2010;107(4):1571-1575.
- [119] Boenzi S, Martinelli D, Carozzo R, Piemonte F, DiCiommo V, Rizzo C, Bertini E, et al. Plasma creatine is elevated in mitochondrial disorders: a new biomarker for the diagnosis. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2011;34:S49-S286.
- [120] Niemann A. Ein unbekanntes Krankheitsbild. *Jahrbuch für Kinderheilkunde.* Berlín. N F. 1914;79:1-10.
- [121] Pick L. Der Morbus Gaucher und die ihm ähnlichen Krankheiten (die lipoidzellige Splenohepatomegalie Typus Niemann und die diabetische Lipoidzellenhypoplasie der Milz). *Ergebnisse der Inneren Medizin und Kinderheilkunde.* Berlín. 1926;29:519-627.
- [122] Crocker AC. The cerebral defect in Tay-Sachs disease and Niemann-Pick disease. *J Neurochem.* 1961;7:69-80.
- [123] Brady RO, Kanfer JN, Mock MB, Fredrickson DS. The metabolism of sphingomyelin. II. Evidence of an enzymatic deficiency in Niemann-Pick disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1966;55(2):366-369.
- [124] Pentchev PG, Boothe AD, Kruth HS, Weintraub H, Stivers J, Brady RO. A genetic storage disorder in BALB/C mice with a metabolic block in esterification of exogenous cholesterol. *J. Biol. Chem.* 1984;259(9):5784-5791.
- [125] Vanier MT. Biochemical studies in Niemann-Pick disease. I. Major sphingolipids of liver and spleen. *Biochim. Biophys. Acta.* 1983;750(1):178-184.
- [126] Rodriguez-Lafrasse C, Rousson R, Valla S, Antignac P, Louisot P, Vanier MT. Modulation of protein kinase C by endogenous sphingosine: inhibition of phorbol dibutyrate binding in Niemann-Pick C fibroblasts. *Biochem. J.* 1997;325 (Pt 3):787-791.
- [127] Vanier MT. Lipid changes in Niemann-Pick disease type C brain: personal experience and review of the literature. *Neurochem. Res.* 1999;24(4):481-489.
- [128] Vanier MT. Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J. Rare Dis.* 2010;5:16.
- [129] Patterson MC, Hendriksz CJ, Walterfang M, Sedel F, Vanier MT, Wijburg F. NP-C Guidelines Working Group. Recommendations for the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C: an update. *Mol. Genet. Metab.* 2012;106(3):330-344.
- [130] Carstea ED, Morris JA, Coleman KG, Loftus SK, Zhang D, Cummings C, Gu J, et al. Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science.* 1997;277(5323):228-31.
- [131] Higgins ME, Davies JP, Chen FW, Ioannou YA. Niemann-Pick C1 is a late endosome-resident protein that transiently associates with lysosomes and the trans-Golgi network. *Mol. Genet. Metab.* 1999;68(1):1-13.
- [132] Kwon HJ, Abi-Mosleh L, Wang ML, Deisenhofer J, Goldstein JL, Brown MS, Infante RE. Structure of N-terminal domain of NPC1 reveals distinct subdomains for binding and transfer of cholesterol. *Cell.* 2009;137(7):1213-1224.
- [133] Deffieu MS, Pfeffer SR. Niemann-Pick type C 1 function requires luminal domain residues that mediate cholesterol-dependent NPC2 binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2011;108(47):18932-18936.
- [134] Poirier S, Mayer G, Murphy SR, Garver WS, Chang TY, Schu P, Seidah NG. The cytosolic adaptor AP-1A is essential for the trafficking and function of Niemann-Pick type C proteins. *Traffic.* 2013;14(4):458-469.

- [135] Naureckiene S, Sleat DE, Lackland H, Fensom A, Vanier MT, Wattiaux R, Jadot M, Lobel P. Identification of *HE1* as the second gene of Niemann-Pick C disease. *Science*. 2000;290(5500):2298-2301.
- [136] Ko DC, Binkley J, Sidow A, Scott MP. The integrity of a cholesterol-binding pocket in Niemann-Pick C2 protein is necessary to control lysosome cholesterol levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2003;100(5):2518-2525.
- [137] Vanier MT, Millat G. Structure and function of the NPC2 protein. *Biochim. Biophys. Acta*. 2004;1685(1-3):14-21.
- [138] Wang ML, Motamed M, Infante RE, Abi-Mosleh L, Kwon HJ, Brown MS, Goldstein JL. Identification of surface residues on Niemann-Pick C2 essential for hydrophobic handoff of cholesterol to NPC1 in lysosomes. *Cell. Metab*. 2010;12(2):166-173.
- [139] Cheruku SR, Xu Z, Dutia R, Lobel P, Storch J. Mechanism of cholesterol transfer from the Niemann-Pick type C2 protein to model membranes supports a role in lysosomal cholesterol transport. *J. Biol. Chem*. 2006;281(42):31594-31604.
- [140] Xu Z, Farver W, Kodukula S, Storch J. Regulation of sterol transport between membranes and NPC2. *Biochemistry*. 2008;47(42):11134-11143.
- [141] Abdul-Hammed M, Breiden B, Adebayo MA, Babalola JO, Schwarzmann G, Sandhoff K. Role of endosomal membrane lipids and NPC2 in cholesterol transfer and membrane fusion. *J. Lipid Res*. 2010;51(7):1747-1760.
- [142] McCauliff LA, Xu Z, Storch J. Sterol transfer between cyclodextrin and membranes: similar but not identical mechanism to NPC2-mediated cholesterol transfer. *Biochemistry*. 2011;50(34):7341-7349.
- [143] McCauliff LA, Xu Z, Li R, Kodukula S, Ko DC, Scott MP, Kahn PC, Storch J. Multiple Surface Regions on the Niemann-Pick C2 Protein Facilitate Intracellular Cholesterol Transport. *J. Biol. Chem*. 2015;290(45):27321-27331.
- [144] Kobayashi T, Beuchat MH, Chevallier J, Makino A, Mayran N, Escola JM, Lebrand C, Cosson P, Kobayashi T, Gruenberg J. Separation and characterization of late endosomal membrane domains. *J. Biol. Chem*. 2002;277(35):32157-64.
- [145] Lange Y. Disposition of intracellular cholesterol in human fibroblasts. *J. Lipid Res*. 1991;32(2):329-339.
- [146] Wüstner D, Solanko LM, Lund FW. Cholesterol trafficking and distribution between cellular membranes. In: Levita I, Barrantes FJ (Eds.). *Cholesterol regulation of ion channels and receptors*. John Wiley and Sons, Inc., United States, 2012.
- [147] Ikonen E. Mechanisms for cellular cholesterol transport: defects and human disease. *Physiol. Rev*. 2006;86(4):1237-1261.
- [148] Mesmin B, Maxfield FR. Intracellular sterol dynamics. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1791(7):636-645.
- [149] Mallard F, Tang BL, Galli T, Tenza D, Saint-Pol A, Yue X, Antony C, et al. Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform. *J. Cell. Biol*. 2002;156(4):653-664.
- [150] Urano Y, Watanabe H, Murphy SR, Shibuya Y, Geng Y, Peden AA, Chang CC et al. Transport of LDL-derived cholesterol from the NPC1 compartment to the ER involves the trans-Golgi network and the SNARE protein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2008; 105(43):16513-16518.
- [151] Xiong Q, Rikihisa Y. Subversion of NPC1 pathway of cholesterol transport by *Anaplasma phagocytophilum*. *Cell. Microbiol*. 2012;14(4):560-576.

- [152] Narita K, Choudhury A, Dobrenis K, Sharma DK, Holicky EL, Marks DL, Walkley SU, et al. Protein transduction of Rab9 in Niemann-Pick C cells reduces cholesterol storage. *FASEB J.* 2005;19(11):1558–1560.
- [153] Linder MD, Uronen RL, Hölttä-Vuori M, van der Sluijs P, Peränen J, Ikonen E. Rab8-dependent recycling promotes endosomal cholesterol removal in normal and sphingolipidosis cells. *Mol. Biol. Cell.* 2007;18(1):47–56.
- [154] Kaptzan T, West SA, Holicky EL, Wheatley CL, Marks DL, Wang T, Peake KB et al. Development of a Rab9 transgenic mouse and its ability to increase the lifespan of a murine model of Niemann-Pick type C disease. *Am. J. Pathol.* 2009;174(1):14–20.
- [155] Du X, Kumar J, Ferguson C, Schulz TA, Ong YS, Hong W, Prinz WA, et al. A role for oxysterol-binding protein-related protein 5 in endosomal cholesterol trafficking. *J. Cell. Biol.* 2011;192(1):121–135.
- [156] Andrews NW, Chakrabarti S. There's more to life than neurotransmission: the regulation of exocytosis by synaptotagmin VII. *Trends Cell. Biol.* 2005;15(11):626-631.
- [157] Jeynov B, Lay D, Schmidt F, Tahirovic S, Just WW. Phosphoinositide synthesis and degradation in isolated rat liver peroxisomes. *FEBS Lett.* 2006;580(25):5917-5924.
- [158] Chu BB, Liao YC, Qi W, Xie C, Du X, Wang J, Yang H, et al. Cholesterol transport through lysosome-peroxisome membrane contacts. *Cell.* 2015;161(2):291-306.
- [159] Vance JE. Dysregulation of cholesterol balance in the brain: contribution to neurodegenerative diseases. *Dis. Model Mech.* 2012;5(6):746-755.
- [160] Aqul A, Liu B, Ramirez CM, Pieper AA, Estill SJ, Burns DK, Liu B, et al. Unesterified cholesterol accumulation in late endosomes/lysosomes causes neurodegeneration and is prevented by driving cholesterol export from this compartment. *J. Neurosci.* 2011;31(25):9404-9413.
- [161] Vanier MT. Complex lipid trafficking in Niemann-Pick disease type C. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2015;38(1):187-199.
- [162] Babalola JO, Wendeler M, Breiden B, Arenz C, Schwarzmann G, Locatelli-Hoops S, Sandhoff K. Development of an assay for the intermembrane transfer of cholesterol by Niemann-Pick C2 protein. *Biol. Chem.* 2007;388(6):617-626.
- [163] Storch J, Xu Z. Niemann-Pick C2 (NPC2) and intracellular cholesterol trafficking. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009;1791(7):671-678.
- [164] Chevallier J, Chamoun Z, Jiang G, Prestwich G, Sakai N, Matile S, Parton RG, et al. Lysobisphosphatidic acid controls endosomal cholesterol levels. *J. Biol. Chem.* 2008;283(41):27871-27880.
- [165] Vanier MT, Rodriguez-Lafrasse C, Rousson R, Gazzah N, Juge MC, Pentchev PG, Revol A, et al. Type C Niemann-Pick disease: spectrum of phenotypic variation in disruption of intracellular LDL-derived cholesterol processing. *Biochim. Biophys. Acta.* 1991;1096(4):328-337.
- [166] Devlin C, Pipalia NH, Liao X, Schuchman EH, Maxfield FR, Tabas I. Improvement in lipid and protein trafficking in Niemann-Pick C1 cells by correction of a secondary enzyme defect. *Traffic.* 2010;11(5):601-615.
- [167] Gallala HD, Breiden B, Sandhoff K. Regulation of the NPC2 protein-mediated cholesterol trafficking by membrane lipids. *J. Neurochem.* 2011;116(5):702-707.
- [168] Oninla VO, Breiden B, Babalola JO, Sandhoff K. Acid sphingomyelinase activity is regulated by membrane lipids and facilitates cholesterol transfer by NPC2. *J Lipid Res.* 2014;55(12):2606-2619.

- [169] Walkley SU, Vanier MT. Secondary lipid accumulation in lysosomal disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009;1793(4):726-736.
- [170] Puri V, Watanabe R, Dominguez M, Sun X, Wheatley CL, Marks DL, Pagano RE. Cholesterol modulates membrane traffic along the endocytic pathway in sphingolipid-storage diseases. *Nat. Cell. Biol.* 1999;1(6):386-388.
- [171] Salvioli R, Scarpa S, Ciaffoni F, Tatti M, Ramoni C, Vanier MT, Vaccaro AM. Glucosylceramidase mass and subcellular localization are modulated by cholesterol in Niemann-Pick disease type C. *J. Biol. Chem.* 2004;279(17):17674-17680.
- [172] Liu Y, Wu YP, Wada R, Neufeld EB, Mullin KA, Howard AC, Pentchev PG, et al. Alleviation of neuronal ganglioside storage does not improve the clinical course of the Niemann-Pick C disease mouse. *Hum. Mol. Genet.* 2000;9(7):1087-1092.
- [173] Li H, Turley SD, Liu B, Repa JJ, Dietschy JM. GM2/GD2 and GM3 gangliosides have no effect on cellular cholesterol pools or turnover in normal or NPC1 mice. *J. Lipid Res.* 2008;49(8):1816-1828.
- [174] Gondré-Lewis M, McGlynn R, Walkley SU. Cholesterol accumulation in neurons with NPC1 dysfunction is ganglioside-dependent. *Current Biology.* 2003;13(15):1324-1329.
- [175] Zhou S, Davidson C, McGlynn R, Stephney G, Dobrenis K, Vanier MT, Walkley SU. Endosomal/lysosomal processing of gangliosides affects neuronal cholesterol sequestration in Niemann-Pick disease type C. *Am. J. Pathol.* 2011;179(2):890-902.
- [176] Griffiths G. On phagosome individuality and membrane signalling networks. *Trends Cell. Biol.* 2004;14(7):343-351.
- [177] Merrill AH Jr, Wang E, Mullins RE, Jamison WC, Nimkar S, Liotta DC. Quantitation of free sphingosine in liver by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 1988;171(2):373-381.
- [178] Kobayashi T, Mitsuo K, Goto I. Free sphingoid bases in normal murine tissues. *Eur J Biochem.* 1988;172(3):747-752.
- [179] Walter M, Chen FW, Tamari F, Wang R, Ioannou YA. Endosomal lipid accumulation in NPC1 leads to inhibition of PKC, hypophosphorylation of vimentin and Rab9 entrapment. *Biol. Cell.* 2009;101(3):141-152.
- [180] Lloyd-Evans E, Morgan AJ, He X, Smith DA, Elliot-Smith E, Sillence DJ, Churchill GC, et al. Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nat. Med.* 2008;14(11):1247-1255.
- [181] Lieberman AP, Puertollano R, Raben N, Slaughter S, Walkley SU, Ballabio A. Autophagy in lysosomal storage disorders. *Autophagy.* 2012;8(5):719-730.
- [182] Elrick MJ, Lieberman AP. Autophagic dysfunction in a lysosomal storage disorder due to impaired proteolysis. *Autophagy.* 2013;9(2):234-235.
- [183] Sarkar S, Carroll B, Baganim Y, Maetzel D, Ng AH, Cassady JP, Cohen MA, et al. Impaired autophagy in the lipid-storage disorder Niemann-Pick type C1 disease. *Cell. Rep.* 2013;5(5):1302-1315.
- [184] Maetzel D, Sarkar S, Wang H, Abi-Mosleh L, Xu P, Cheng AW, Gao Q, et al. Genetic and chemical correction of cholesterol accumulation and impaired autophagy in hepatic and neural cells derived from Niemann-Pick Type C patient-specific iPS cells. *Stem Cell Reports.* 2014;2(6):866-880.
- [185] Wijburg FA, Sedel F, Pineda M, Hendriksz CJ, Fahey M, Walterfang M, Patterson MC, et al. Development of a suspicion index to aid diagnosis of Niemann-Pick disease type C. *Neurology.* 2012;78(20):1560-1567.

- [186] Wraith JE, Sedel F, Pineda M, Wijburg FA, Hendriksz CJ, Fahey M, Walterfang M, et al. Niemann-Pick type C Suspicion Index tool: analyses by age and association of manifestations. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2014;37(1):93-101.
- [187] Ries M, Schaefer E, Lührs T, Mani L, Kuhn J, Vanier MT, Krummenauer F, et al. Critical assessment of chitotriosidase analysis in the rational laboratory diagnosis of children with Gaucher disease and Niemann-Pick disease type A/B and C. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2006;29(5):647-652.
- [188] Vanier MT, Millat G. Niemann-Pick disease type C. *Clin. Genet.* 2003;64(4):269-281.
- [189] Garver WS, Jelinek D, Meaney FJ, Flynn J, Pettit KM, Shepherd G, Heidenreich RA, et al. The National Niemann-Pick Type C1 Disease Database: correlation of lipid profiles, mutations, and biochemical phenotypes. *J. Lipid Res.* 2010;51(2):406-415.
- [190] Pámpols T, Pineda M, Ferrer M, Fernández E. Type C Niemann-Pick disease in 2 siblings. Biochemical bases of its diagnosis. *An. Esp. Pediatr.* 1986;24(4):250-256.
- [191] Bjorkhem I, Diczfalusy U. Oxysterols: Friends, Foes, or Just Fellow Passengers?. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(5):734-742.
- [192] Sabuncuoğlu S, Öztaş Y. Oxysterols and Their Metabolic Roles Beyond Cholesterol: A Reappraisal. *Acta Medica.* 2014;3:75-79.
- [193] Tint GS, Pentchev P, Xu G, Batta AK, Shefer S, Salen G, Honda A. Cholesterol and oxygenated cholesterol concentrations are markedly elevated in peripheral tissue but not in brain from mice with the Niemann-Pick type C phenotype. *J. Inherit. Metab. Dis.* 1998;21(8):853-863.
- [194] Zhang JR, Coleman T, Langmade SJ, Scherrer DE, Lane L, Lanier MH, Feng C, et al. Niemann-Pick C1 protects against atherosclerosis in mice via regulation of macrophage intracellular cholesterol trafficking. *J. Clin. Invest.* 2008;118(6):2281-2290.
- [195] Porter FD, Scherrer DE, Lanier MH, Langmade SJ, Molugu V, Gale SE, Olzeski D, et al. Cholesterol oxidation products are sensitive and specific blood-based biomarkers for Niemann-Pick C1 disease. *Sci. Transl. Med.* 2010;2(56):56ra81.
- [196] Frolov A, Zielinski SE, Crowley JR, Dudley-Rucker N, Schaffer JE, Ory DS. NPC1 and NPC2 regulate cellular cholesterol homeostasis through generation of low density lipoprotein cholesterol-derived oxysterols. *J Biol Chem.* 2003;278(28):25517-25.
- [197] Choi HY, Karten B, Chan T, Vance JE, Greer WL, Heidenreich RA, Garver WS, et al. Impaired ABCA1-dependent lipid efflux and hypoalphalipoproteinemia in human Niemann-Pick type C disease. *J. Biol. Chem.* 2003;278(35):32569-32577.
- [198] Murphy RC, Johnson KM. Cholesterol, reactive oxygen species, and the formation of biologically active mediators. *J. Biol. Chem.* 2008;283(23):15521-5.
- [199] Sevanian A, McLeod LL. Catalytic properties and inhibition of hepatic cholesterol-epoxide hydrolase. *J. Biol. Chem.* 1986;261(1):54-59.
- [200] Silvente-Poirot S, Poirot M. Cholesterol epoxide hydrolase and cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2012;12(6):696-703.
- [201] Reddy JV, Ganley IG, Pfeffer SR. Clues to neuro-degeneration in Niemann-Pick type C disease from global gene expression profiling. *PLoS One.* 2006;1:e19.
- [202] Zampieri S, Mellon SH, Butters TD, Nevyjel M, Covey DF, Bembi B, Dardis A. Oxidative stress in NPC1 deficient cells: protective effect of allopregnanolone. *J. Cell. Mol. Med.* 2009;13(9B):3786-3796.
- [203] Jiang X, Sidhu R, Porter FD, Yanjanin NM, Speak AO, te Vruchte DT, Platt FM, et al. A sensitive and specific LC-MS/MS method for rapid diagnosis of Niemann-Pick C1 disease from human plasma. *J. Lipid Res.* 2011;52(7):1435-1445.

- [204] Stampfer M, Theiss S, Amraoui Y, Jiang X, Keller S, Ory DS, Mengel E, et al. Niemann-Pick disease type C clinical database: cognitive and coordination deficits are early disease indicators. *Orphanet J. Rare Dis.* 2013;8:35.
- [205] Bauer P, Balding DJ, Klunemann HH, Linden DE, Ory DS, Pineda M, Priller J, et al. Genetic screening for Niemann-Pick disease type C in adults with neurological and psychiatric symptoms: findings from the ZOOM study. *Hum. Mol. Genet.* 2013;22 (21):4349–4356.
- [206] Lin N, Zhang H, Qiu W, Ye J, Han L, Wang Y, Gu X. Determination of 7-ketocholesterol in plasma by LC-MS for rapid diagnosis of acid SMase deficient Niemann-Pick disease. *J. Lipid Res.* 2014;55(2):338-343.
- [207] Zhang H, Wang Y, Lin N, Yang R, Qiu W, Han L, Ye J, et al. Diagnosis of Niemann-Pick disease type C with 7-ketocholesterol screening followed by *NPCI/NPC2* gene mutation confirmation in Chinese patients. *Orphanet J. Rare Dis.* 2014;9:82.
- [208] Boenzi S, Deodato F, Taurisano R, Martinelli D, Verrigni D, Carozzo R, Bertini E, et al. A new simple and rapid LC-ESI-MS/MS method for quantification of plasma oxysterols as dimethylaminobutyrate esters. Its successful use for the diagnosis of Niemann-Pick type C disease. *Clin. Chim. Acta.* 2014;437:93-100.
- [209] Reunert J, Kannenberg F, Fobker M, Marquardt T. Improved diagnostics of Niemann-Pick disease type C by the analysis of plasma oxysterols. *Mol. Gen. Met.* 2015;114(2), S98.
- [210] Klinke G, Rohrbach M, Giugliani R, Burda P, Baumgartner MR, Tran C, Gautschi M, et al. LC-MS/MS based assay and reference intervals in children and adolescents for oxysterols elevated in Niemann-Pick diseases. *Clin Biochem.* 2015;48(9):596-602.
- [211] Boenzi S, Deodato F, Taurisano R, Goffredo BM, Rizzo C, Dionisi-Vici C. Evaluation of plasma cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol and 7-ketocholesterol in inherited disorders related to cholesterol metabolism. *J. Lipid Res.* 2016;57(3):361-367.
- [212] Pataj Z, Liebisch G, Schmitz G, Matysik S. Quantification of oxysterols in human plasma and red blood cells by liquid chromatography-high-resolution tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2016;1439:82-8.
- [213] Romanello M, Zampieri S, Bortolotti N, Deroma L, Sechi A, Fiumara A, Parini R, et al. Comprehensive evaluation of plasma 7-ketocholesterol and cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol in an Italian cohort of patients affected by Niemann-Pick disease due to *NPCI* and *SMPD1* mutations. *Clin. Chim. Acta.* 2016;455:39-45.
- [214] Kudo K, Emmons GT, Casserly EW, Via DP, Smith LC, St Pyrek J, Schroepfer GJ Jr. Inhibitors of sterol synthesis. Chromatography of acetate derivatives of oxygenated sterols. *J. Lipid. Res.* 1989;30(7):1097-1111.
- [215] Teng JI, Smith LL. High-performance liquid chromatographic analysis of human erythrocyte oxysterols as delta 4-3-ketone derivatives. *J. Chromatogr. A.* 1995;691(1-2):247-254.
- [216] Dzeletovic S, Breuer O, Lund E, Diczfalussy U. Determination of cholesterol oxidation products in human plasma by isotope dilution-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 1995;225(1):73-80.
- [217] Schroepfer GJ Jr. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol. Rev.* 2000;80(1):361-554.
- [218] Zhang Z, Li D, Blanchard DE, Lear SR, Erickson SK, Spencer TA. Key regulatory oxysterols in liver: analysis as Δ 4-3-ketone derivatives by HPLC and response to physiological perturbations. *J. Lipid Res.* 2001;42(4):649-658.

- [219] Griffiths WJ, Wang Y, Alvelius G, Liu S, Bodin K, Sjövall J. Analysis of oxysterols by electrospray tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2006; 17(3):341-362.
- [220] Honda A, Yamashita K, Miyazaki H, Shirai M, Ikegami T, Xu G, Numazawa M, et al. Highly sensitive analysis of sterol profiles in human serum by LC-ESI-MS/MS. *J. Lipid Res.* 2008;49(9):2063-2073.
- [221] Matysik S, Schmitz G. Application of gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry to the determination of sterol components in biological samples in consideration of the ionization mode. *Biochimie.* 2013;95(3):489-495.
- [222] Griffiths WJ, Crick PJ, Wang Y. Methods for oxysterol analysis: past, present and future. *Biochem. Pharmacol.* 2013;86(1):3-14.
- [223] Cluzeau CV, Watkins-Chow DE, Fu R, Borate B, Yanjanin N, Dail MK, Davidson CD, et al. Microarray expression analysis and identification of serum biomarkers for Niemann-Pick disease, type C1. *Hum. Mol. Genet.* 2012;21(16):3632-3646.
- [224] Alvelius G, Hjalmarsen O, Griffiths WJ, Björkhem I, Sjövall J. Identification of unusual 7-oxygenated bile acid sulfates in a patient with Niemann-Pick disease, type C. *J. Lipid Res.* 2001;42(10):1571-1577.
- [225] Maekawa M, Misawa Y, Sotoura A, Yamaguchi H, Togawa M, Ohno K, Nittono H, et al. LC/ESI-MS/MS analysis of urinary 3 β -sulfooxy-7 β -N-acetylglucosaminyl-5-cholesten-24-ic acid and its amides: new biomarkers for the detection of Niemann-Pick type C disease. *Steroids.* 2013;78(10):967-972.
- [226] Mazzacuva F, Mills PB, Mills K, Nicoli R, Taylor-Te Vruchte D, Maekawa M, Porter FD, et al. A rapid and simple method for the diagnosis of Niemann Pick C and other disorders affecting cholanoid metabolism from blood spots. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2015;38(Suppl 1):S1–S34.
- [227] Jiang X, Sidhu R, Mydock-McGrane L, Hsu FF, Covey DF, Scherrer DE, Earley B, et al. Development of a bile acid-based newborn screen for Niemann-Pick disease type C. *Sci. Transl. Med.* 2016;8(337):337ra63.
- [228] Mazzacuva F, Mills P, Mills K, Camuzeaux S, Gissen P, Nicoli ER, Wassif C, et al. Identification of novel bile acids as biomarkers for the early diagnosis of Niemann-Pick C disease. *FEBS Lett.* 2016.
- [229] Fan M, Sidhu R, Fujiwara H, Tortelli B, Zhang J, Davidson C, Walkley SU, et al. Identification of Niemann-Pick C1 disease biomarkers through sphingolipid profiling. *J. Lipid Res.* 2013;54(10):2800-2814.
- [230] Ashe KM, Bangari D, Li L, Cabrera-Salazar MA, Bercury SD, Nietupski JB, Cooper CG, et al. Iminosugar-based inhibitors of glucosylceramide synthase increase brain glycosphingolipids and survival in a mouse model of Sandhoff disease. *PLoS One.* 2011;6(6):e21758.
- [231] Nietupski JB, Pacheco JJ, Chuang WL, Maratea K, Li L, Foley J, Ashe KM, et al. Iminosugar-based inhibitors of glucosylceramide synthase prolong survival but paradoxically increase brain glucosylceramide levels in Niemann-Pick C mice. *Mol. Genet. Metab.* 2012;105(4):621-628.
- [232] Walden CM, Sandhoff R, Chuang CC, Yildiz Y, Butters TD, Dwek RA, Platt FM, et al. Accumulation of glucosylceramide in murine testis, caused by inhibition of beta-glucosidase 2: implications for spermatogenesis. *J. Biol. Chem.* 2007;282(45):32655-32664.
- [233] Chen FW, Li C, Ioannou YA. Cyclodextrin induces calcium-dependent lysosomal exocytosis. *PLoS One.* 2010;5(11):e15054.

- [234] Welford RW, Garzotti M, Marques Lourenço C, Mengel E, Marquardt T, Reunert J, Amraoui Y, et al. Plasma lysosphingomyelin demonstrates great potential as a diagnostic biomarker for Niemann-Pick disease type C in a retrospective study. *PLoS One*. 2014;9(12):e114669.
- [235] Giese AK, Mascher H, Grittner U, Eichler S, Kramp G, Lukas J, te Vruchte D, et al. A novel, highly sensitive and specific biomarker for Niemann-Pick type C1 disease. *Orphanet J. Rare Dis*. 2015;10:78.
- [236] te Vruchte D, Speak AO, Wallom KL, Al Eisa N, Smith DA, Hendriksz CJ, Simmons L, et al. Relative acidic compartment volume as a lysosomal storage disorder-associated biomarker. *J. Clin. Invest*. 2014;124(3):1320–1328.
- [237] Millat G, Marçais C, Rafi MA, Yamamoto T, Morris JA, Pentchev PG, Ohno K, et al. Niemann-Pick C1 disease: the I1061T substitution is a frequent mutant allele in patients of Western European descent and correlates with a classic juvenile phenotype. *Am. J. Hum Genet*. 1999;65(5):1321-1329.
- [238] Ribeiro I, Marcão A, Amaral O, Sá Miranda MC, Vanier MT, Millat G. Niemann-Pick type C disease: *NPC1* mutations associated with severe and mild cellular cholesterol trafficking alterations. *Hum. Genet*. 2001;109(1):24-32.
- [239] Fernandez-Valero EM, Ballart A, Iturriaga C, Lluch M, Macias J, Vanier MT, Pineda M, et al. Identification of 25 new mutations in 40 unrelated Spanish Niemann-Pick type C patients: genotype-phenotype correlations. *Clin. Genet*. 2005;68(3):245-254.
- [240] Fancello T, Dardis A, Rosano C, Tarugi P, Tappino B, Zampieri S, Pinotti E, et al. Molecular analysis of *NPC1* and *NPC2* gene in 34 Niemann-Pick C Italian patients: identification and structural modeling of novel mutations. *Neurogenetics*. 2009;10(3):229-239.
- [241] Macias-Vidal J, Rodríguez-Pascau L, Sánchez-Ollé G, Lluch M, Vilageliu L, Grinberg D, Coll MJ, et al. Molecular analysis of 30 Niemann-Pick type C patients from Spain. *Clin. Genet*. 2011;80(1):39-49.
- [242] Greer WL, Dobson MJ, Girouard GS, Byers DM, Riddell DC, Neumann PE. Mutations in *NPC1* highlight a conserved NPC1-specific cysteine-rich domain. *Am. J. Hum. Genet*. 1999;65(5):1252-1260.
- [243] Millat G, Marçais C, Tomasetto C, Chikh K, Fensom AH, Harzer K, Wenger DA, et al. Niemann-Pick C1 disease: correlations between *NPC1* mutations, levels of NPC1 protein, and phenotypes emphasize the functional significance of the putative sterol-sensing domain and of the cysteine-rich luminal loop. *Am. J. Hum Genet*. 2001;68(6):1373-1385.
- [244] Greer WL, Riddell DC, Gillan TL, Girouard GS, Sparrow SM, Byers DM, Dobson MJ, et al. The Nova Scotia (type D) form of Niemann-Pick disease is caused by a G3097-->T transversion in *NPC1*. *Am. J. Hum. Genet*. 1998;63(1):52-54.
- [245] Millat G, Chikh K, Naureckiene S, Sleat DE, Fensom AH, Higaki K, Elleder M, et al. Niemann-Pick disease type C: spectrum of *HE1* mutations and genotype/phenotype correlations in the NPC2 group. *Am. J. Hum. Genet*. 2001;69(5):1013-1021.
- [246] Chikh K, Rodriguez C, Vey S, Vanier MT, Millat G. Niemann-Pick type C disease: subcellular location and functional characterization of NPC2 proteins with naturally occurring missense mutations. *Hum. Mutat*. 2005;26(1):20-28.
- [247] Verot L, Chikh K, Freydière E, Honoré R, Vanier MT, Millat G. Niemann-Pick C disease: functional characterization of three *NPC2* mutations and clinical and molecular update on patients with NPC2. *Clin. Genet*. 2007;71(4):320-330.
- [248] Pineda M, Perez-Poyato MdS. Current and future therapies for Niemann-Pick C disease. *Expert Opinion on Orphan Drugs*. 2013;1(11):915-923.

- [249] Borbon IA, Hillman Z, Duran E Jr, Kiela PR, Frautschy SA, Erickson RP. Lack of efficacy of curcumin on neurodegeneration in the mouse model of Niemann-Pick C1. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2012;101(1):125-131.
- [250] Fu R, Yanjanin NM, Bianconi S, Pavan WJ, Porter FD. Oxidative stress in niemann-pick disease, type C. *Mol. Genet. Metab.* 2010;101(2-3):214-218.
- [251] Yévenes LF, Klein A, Castro JF, Marín T, Leal N, Leighton F, Alvarez AR, et al. Lysosomal vitamin E accumulation in niemann-pick type C disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012;1822(2):150-160.
- [252] Fu R, Wassif CA, Yanjanin NM, Watkins-Chow DE, Baxter LL, Incao A, Liscum L, et al. Efficacy of N-acetylcysteine in phenotypic suppression of mouse models of Niemann-Pick disease, type C1. *Hum. Mol. Genet.* 2013;22(17):3508-3523.
- [253] Munkacsí AB, Chen FW, Brinkman MA, Higaki K, Gutiérrez GD, Chaudhari J, Layer JV, et al. An "Exacerbate-reverse" strategy in yeast identifies histone deacetylase inhibition as a correction for cholesterol and sphingolipid transport defects in human Niemann-Pick type C disease. *J. Biol. Chem.* 2011;286(27):23842-23851.
- [254] Pipalia NH, Cosner CC, Huang A, Chatterjee A, Bourbon P, Farley N, Helquist P, et al. Histone deacetylase inhibitor treatment dramatically reduces cholesterol accumulation in Niemann-Pick type C1 mutant human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011;108(14):5620-5625.
- [255] Alam MS, Getz M, Haldar K. Chronic administration of an HDAC inhibitor treats both neurological and systemic Niemann-Pick type C disease in a mouse model. *Sci. Transl. Med.* 2016;8(326):326ra23.
- [256] Bonney DK, O'Meara A, Shabani A, Imrie J, Bigger BW, Jones S, Wraith JE, et al. Successful allogeneic bone marrow transplant for Niemann-Pick disease type C2 is likely to be associated with a severe 'graft versus substrate' effect. *J. Inher. Metab. Dis.* 2010;33 Suppl 3:S171-3.
- [257] Patterson MC, Di Bisceglie AM, Higgins JJ, Abel RB, Schiffmann R, Parker CC, Argoff CE, et al. The effect of cholesterol-lowering agents on hepatic and plasma cholesterol in Niemann-Pick disease type C. *Neurology.* 1993;43(1):61-64.
- [258] Sylvain M, Arnold DL, Scriver CR, Schreiber R, Shevell MI. Magnetic resonance spectroscopy in Niemann-Pick disease type C: correlation with diagnosis and clinical response to cholestyramine and lovastatin. *Pediatr. Neurol.* 1994;10(3):228-232.
- [259] Rosenbaum AI, Rujoi M, Huang AY, Du H, Grabowski GA, Maxfield FR. Chemical screen to reduce sterol accumulation in Niemann-Pick C disease cells identifies novel lysosomal acid lipase inhibitors. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1791(12):1155-1165.
- [260] Griffin LD, Gong W, Verot L, Mellon SH. Niemann-Pick type C disease involves disrupted neurosteroidogenesis and responds to allopregnanolone. *Nat. Med.* 2004;10(7):704-711.
- [261] Lachmann RH, te Vruchte D, Lloyd-Evans E, Reinkensmeier G, Sillence DJ, Fernandez-Guillen L, Dwek RA, et al. Treatment with miglustat reverses the lipid-trafficking defect in Niemann-Pick disease type C. *Neurobiol. Dis.* 2004;16(3):654-658.
- [262] Megha, London E. Ceramide selectively displaces cholesterol from ordered lipid domains (rafts): implications for lipid raft structure and function. *J. Biol. Chem.* 2004;279(11):9997-10004.
- [263] Ribas GS, Pires R, Coelho JC, Rodrigues D, Mescka CP, Vanzin CS, Biancini GB, et al. Oxidative stress in Niemann-Pick type C patients: a protective role of N-butyl-deoxyojirimycin therapy. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2012;30(6):439-444.

- [264] Mattsson N, Zetterberg H, Bianconi S, Yanjanin NM, Fu R, Månsson JE, Porter FD, et al. Gamma-secretase-dependent amyloid-beta is increased in Niemann-Pick type C: a cross-sectional study. *Neurology*. 2011;76(4):366-372.
- [265] Mattsson N, Zetterberg H, Bianconi S, Yanjanin NM, Fu R, Månsson JE, Porter FD, et al. Miglustat treatment may reduce cerebrospinal fluid levels of the axonal degeneration marker Tau in Niemann-Pick Type C. *JIMD Rep*. 2012;3:45-52.
- [266] Lyseng-Williamson KA. Miglustat: a review of its use in Niemann-Pick disease Type C. *Drugs*. 2014;74(1):61-74.
- [267] Ottinger EA, Kao ML, Carrillo-Carrasco N, Yanjanin N, Shankar RK, Janssen M, Brewster M, et al. Collaborative Development of 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin for the Treatment of Niemann-Pick Type C1 Disease. *Curr. Top Med. Chem*. 2014;14(3): 330–339.
- [268] Ong ASH, Niki E, Packer L (Eds). *Nutrition, Lipids, Health, and Disease*. AOCS Press. United States. Chapter 25. 1995;230-240.
- [269] Kilsdonk EP, Yancey PG, Stoudt GW, Bangerter FW, Johnson WJ, Phillips MC, Rothblat GH. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J. Biol. Chem*. 1995;270(29):17250-17256.
- [270] Liu SM, Cogy A, Kockx M, Dean RT, Gaus K, Jessup W, Kritharides L. Cyclodextrins differentially mobilize free and esterified cholesterol from primary human foam cell macrophages. *J. Lipid Res*. 2003;44(6):1156-1166.
- [271] Davidson CD, Ali NF, Micsenyi MC, Stephney G, Renault S, Dobrenis K, Ory DS, et al. Chronic cyclodextrin treatment of murine Niemann-Pick C disease ameliorates neuronal cholesterol and glycosphingolipid storage and disease progression. *PLoS One*. 2009;4(9):e6951.
- [272] Liu B, Turley SD, Burns DK, Miller AM, Repa JJ, Dietschy JM. Reversal of defective lysosomal transport in NPC disease ameliorates liver dysfunction and neurodegeneration in the *NPC1*^{-/-} mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009;106(7):2377-2382.
- [273] Liu B, Ramirez CM, Miller AM, Repa JJ, Turley SD, Dietschy JM. Cyclodextrin overcomes the transport defect in nearly every organ of NPC1 mice leading to excretion of sequestered cholesterol as bile acid. *J. Lipid Res*. 2010;51(5):933-944.
- [274] Ramirez CM, Liu B, Taylor AM, Repa JJ, Burns DK, Weinberg AG, Turley SD, et al. Weekly cyclodextrin administration normalizes cholesterol metabolism in nearly every organ of the Niemann-Pick type C1 mouse and markedly prolongs life. *Pediatr. Res*. 2010;68(4):309-315.
- [275] Ramirez CM, Liu B, Aqul A, Taylor AM, Repa JJ, Turley SD, Dietschy JM. Quantitative role of LAL, NPC2, and NPC1 in lysosomal cholesterol processing defined by genetic and pharmacological manipulations. *J. Lipid Res*. 2011;52(4):688-698.
- [276] Ward S, O'Donnell P, Fernandez S, Vite CH. 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin raises hearing threshold in normal cats and in cats with Niemann-Pick type C disease. *Pediatr. Res*. 2010;68(1):52-56.
- [277] Soga M, Ishitsuka Y, Hamasaki M, Yoneda K, Furuya H, Matsuo M, Ihn H, et al. HPGCD Outperforms HPBCD as A Potential Treatment for Niemann-Pick Disease Type C During disease Modeling with iPS Cells. *Stem Cells*. 2015;33(4):1075-1088.
- [278] Vance JE, Karten B. Niemann-Pick C disease and mobilization of lysosomal cholesterol by cyclodextrin. *J. Lipid Res*. 2014;55(8):1609-1621.
- [279] Vite C, Mauldin E, Ward S, Stein V, Prociuk M, Haskins ME, Strattan R et al. Intrathecal cyclodextrin therapy of feline Niemann-Pick Type C disease. *Mol. Gen. Metab*. 2011;102(2):S44.

- [280] Matsuo M, Togawa M, Hirabaru K, Mochinaga S, Narita A, Adachi M, Egashira M, et al. Effects of cyclodextrin in two patients with Niemann-Pick Type C disease. *Mol. Genet. Metab.* 2013;108(1):76-81.
- [281] U.S. National Institutes of Health. Clinical Trials.gov. (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02534844>. Accessed May 2016).
- [282] Arias A, Ormazabal A, Moreno J, González B, Vilaseca MA, García-Villoria J, Pàmols T, et al. Methods for the diagnosis of creatine deficiency syndromes: a comparative study. *J. Neurosci. Methods.* 2006;156(1-2):305-309.
- [283] Póo-Argüelles P, Arias A, Vilaseca MA, Ribes A, Artuch R, Sans-Fito A, Moreno A, et al. X-Linked creatine transporter deficiency in two patients with severe mental retardation and autism. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2006;29(1):220-223.
- [284] Sempere A, Fons C, Arias A, Rodríguez-Pombo P, Colomer R, Merinero B, Alcaide P, et al. Creatine transporter deficiency in two adult patients with static encephalopathy. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2009;32 Suppl 1:S91-96.
- [285] Newmeyer A, Cecil KM, Schapiro M, Clark JF, Degrauw TJ. Incidence of brain creatine transporter deficiency in males with developmental delay referred for brain magnetic resonance imaging. *J. Dev. Behav. Pediatr.* 2005;26(4):276-282.
- [286] Lion-François L, Cheillan D, Pitelet G, Acquaviva-Bourdain C, Bussy G, Cotton F, Guibaud L, et al. High frequency of creatine deficiency syndromes in patients with unexplained mental retardation. *Neurology.* 2006;67(9):1713-1714.
- [287] Clark AJ, Rosenberg EH, Almeida LS, Wood TC, Jakobs C, Stevenson RE, Schwartz CE, et al. X-linked creatine transporter (*SLC6A8*) mutations in about 1% of males with mental retardation of unknown etiology. *Hum. Genet.* 2006;119(6):604-610.
- [288] Sempere A, Fons C, Arias A, Rodríguez-Pombo P, Merinero B, Alcaide P, Capdevila A, et al. Cerebral creatine deficiency: first Spanish patients harbouring mutations in *GAMT* gene. *Med. Clin. (Barc).* 2009;133(19):745-749.
- [289] Spillane M, Schoch R, Cooke M, Harvey T, Greenwood M, Kreider R, Willoughby DS. The effects of creatine ethyl ester supplementation combined with heavy resistance training on body composition, muscle performance, and serum and muscle creatine levels. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* 2009;6:6.
- [290] Fons C, Arias A, Sempere A, Póo P, Pineda M, Mas A, López-Sala A, et al. Response to creatine analogs in fibroblasts and patients with creatine transporter deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 2010; 99(3):296-299.
- [291] Arias A. Estudios bioquímicos en las deficiencias cerebrales de creatina. [MAppSci tesis]. Barcelona, España: Universidad Autónoma de Barcelona, 2009.
- [292] Fons MC. Diagnóstico clínico, bioquímico y molecular en pacientes con defecto del transportador de creatina. Opciones terapéuticas [MAppSci tesis]. Barcelona, España: Universidad de Barcelona, 2010 (<http://hdl.handle.net/10803/2501>).
- [293] Alcaide P. Definiendo la etiopatogénesis del síndrome de deficiencia de creatina cerebral. [MAppSci tesis]. Madrid, España: Universidad Autónoma de Madrid, 2011 (<http://hdl.handle.net/10486/6353>).
- [294] López-Viota J, Mandal S, Delgado AV, Toca-Herrera JL, Möller M, Zanuttin F, Balestrino M, et al. Electrophoretic characterization of gold nanoparticles functionalized with human serum albumin (HSA) and creatine. *J. Colloid. Interface Sci.* 2009;332(1):215-223.
- [295] van de Kamp JM, Pouwels PJ, Aarsen FK, ten Hoopen LW, Knol DL, de Klerk JB, de Coo IF, et al. Long-term follow-up and treatment in nine boys with X-linked creatine transporter defect. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2012;35(1):141-149.

- [296] Devés R, Boyd CA. Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. *Physiol. Rev.* 1998;78(2):487-545.
- [297] Groth U, Rosenberg LE. Transport of dibasic amino acids, cystine, and tryptophan by cultured human fibroblasts: absence of a defect in cystinuria and Hartnup disease. *J. Clin. Invest.* 1972;51(8):2130-2142.
- [298] White MF, Gazzola GC, Christensen HN. Cationic amino acid transport into cultured animal cells. I. Influx into cultured human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 1982;257(8):4443-4449.
- [299] Dall'Asta V, Bussolati O, Sala R, Rotoli BM, Sebastio G, Sperandeo MP, Andria G, et al. Arginine transport through system y^L in cultured human fibroblasts: normal phenotype of cells from LPI subjects. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2000;279(6):C1829-1837.
- [300] Sala R, Rotolo BM, Colla E, Visigalli R, Parolari A, Bussolati O, Gazzola GC et al. Two-way arginine transport in human endothelial cells: TNF- α stimulation is restricted to system y⁺. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2002;282:C134-143.
- [301] Arancibia Y, Sobrevia L. Transport of L-arginine mediated by system y^L in human fetal endothelial cells. *J. Physiol.* 1999;517.P,47P.
- [302] Bussolati O, Sala R, Astorri A, Rotoli BM, Dall'Asta V, Gazzola GC. Characterization of amino acid transport in human endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 1993;265(4 Pt 1):C1006-1014.
- [303] Mann GE, Yudilevich DL, Sobrevia L. Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiol. Rev.* 2003;83(1):183-252.
- [304] O'Kane RL, Viña JR, Simpson I, Zaragoza R, Mokashi A, Hawkins RA. Cationic amino acid transport across the blood-brain barrier is mediated exclusively by system y⁺. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2006;291(2):E412-419.
- [305] Hawkins RA, O'Kane RL, Simpson IA, Viña JR. Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids. *J. Nutr.* 2006; 136(1 Suppl):218S-26S.
- [306] Kelly JC, Otto EF, Hillman RE. Glycine transport by human diploid fibroblasts-absence of a defect in cells from patients with nonketotic hyperglycinemia. *Pediatr. Res.* 1979;13(2):127-130.
- [307] Zlokovic BV, Begley DJ, Chain DG. Blood-brain barrier permeability to dipeptides and their constituent amino acids. *Brain Res.* 1983;271(1):65-71.
- [308] Hosoya K, Yamamoto A, Akanuma S, Tachikawa M. Lipophilicity and transporter influence on blood-retinal barrier permeability: a comparison with blood-brain barrier permeability. *Pharm. Res.* 2010;27(12):2715-2724.
- [309] Furuya S, Watanabe M. Novel neuroglial and gliogial relationships mediated by L-serine metabolism. *Arch. Histol. Cytol.* 2003;66(2):109-121.
- [310] Yang JH, Wada A, Yoshida K, Miyoshi Y, Sayano T, Esaki K, Kinoshita MO, et al. Brain-specific *Phgdh* deletion reveals a pivotal role for L-serine biosynthesis in controlling the level of D-serine, an N-methyl-D-aspartate receptor co-agonist, in adult brain. *J. Biol. Chem.* 2010;285(53):41380-41390.
- [311] Aragón C, López-Corcuera B. Structure, function and regulation of glycine neurotransmitters. *Eur. J. Pharmacol.* 2003;479(1-3):249-262.
- [312] The human protein atlas. (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000130005-GAMT/tissue>. Accessed May 2016).
- [313] Jiang Y, Sun C, Ding X, Yuan D, Chen K, Gao B, Chen Y, et al. Simultaneous determination of adenine nucleotides, creatine phosphate and creatine in rat liver by high performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2012;66:258-263.

- [314] Hørdler M, Elser RC, Gerhardt W, Mathieu M, and Sampson EJ. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC): Scientific Division, Committee on Enzymes. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 7. IFCC method for creatine kinase (ATP: creatine (N-phosphotransferase, EC 2.7.3.2). IFCC Recommendation. *J. Automat. Chem.* 1990;12(1):22-40.
- [315] Szasz G, Gruber W. Creatine kinase in serum: 4. Differences in substrate affinity among the isoenzymes. *Clin. Chem.* 1978;24(2):245-249.
- [316] Lang H, Würzburg U. Creatine Kinase, an enzyme of many forms. *Clin. Chem.* 1982;28(7):1439-1447.
- [317] Vilaseca MA, Briones P, Ribes A, Carreras E, Llacer A, Querol J. Fatal hepatic failure with lactic acidemia, Fanconi syndrome and defective activity of succinate:cytochrome c reductase. *J. Inherit. Metab. Dis.* 1991;14(3):285-288.
- [318] Ramos-Arroyo MA, Hualde J, Ayeche A, De Meirleir L, Seneca S, Nadal N, Briones P. Clinical and biochemical spectrum of mitochondrial complex III deficiency caused by mutations in the *BCS1L* gene. *Clin. Genet.* 2009; 75(6):585-587.
- [319] Ugalde C, Triepels RH, Coenen MJ, Van den Heuvel LP, Smeets R, Uusimaa J, Briones P, et al. Impaired complex I assembly in a Leigh syndrome patient with a novel missense mutation in the *ND6* gene. *Ann. Neurol.* 2003;54(5):665-669.
- [320] Navarro-Sastre A, Tort F, Stehling O, Uzarska MA, Arranz JA, Del Toro M, Labayru MT, et al. A fatal mitochondrial disease is associated with defective NFU1 function in the maturation of a subset of mitochondrial Fe-S proteins. *Am. J. Hum. Genet.* 2011;89(5):656-667.
- [321] Bernier FP, Boneh A, Dennett X, Chow CW, Cleary MA, Thorburn DR. Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children. *Neurology.* 2002;59(9):1406-1411.
- [322] Macías J. Molecular aspects of both lysosomal transport diseases: cystinosis and Niemann-Pick disease type C [MAppSci thesis]. Barcelona, Spain: University of Barcelona, 2012:82pp.
- [323] Macías-Vidal J, Rodríguez-Pascau L, Sánchez-Ollé G, Lluch M, Vilageliu L, Grinberg D, Coll MJ, et al. Molecular analysis of 30 Niemann-Pick type C patients from Spain. *Clin. Genet.* 2011;80(1):39-49.
- [324] Macías-Vidal J, Gort L, Lluch M, Pineda M, Coll MJ. Nonsense-mediated mRNA decay process in nine alleles of Niemann-Pick type C patients from Spain. *Mol. Genet. Metab.* 2009;97(1):60-64.
- [325] Fernandez-Valero EM, Ballart A, Iturriaga C, Lluch M, Macías J, Vanier MT, Pineda M, et al. Identification of 25 new mutations in 40 unrelated Spanish Niemann-Pick type C patients: genotype-phenotype correlations. *Clin. Genet.* 2005;68(3):245-254.
- [326] Tortelli B, Fujiwara H, Bagel JH, Zhang J, Sidhu R, Jiang X, Yanjanin NM, et al. Cholesterol homeostatic responses provide biomarkers for monitoring treatment for the neurodegenerative disease Niemann-Pick C1 (NPC1). *Hum. Mol. Genet.* 2014;23(22):6022-6033.
- [327] Ginsberg HN, Le NA, Short MP, Ramakrishnan R, Desnick RJ. Suppression of apolipoprotein B production during treatment of cholesteryl ester storage disease with lovastatin. Implications for regulation of apolipoprotein B synthesis. *J. Clin. Invest.* 1987;80(6):1692-1697.
- [328] Fouchier SW, Defesche JC. Lysosomal acid lipase A and the hypercholesterolaemic phenotype. *Curr. Opin. Lipidol.* 2013; 24(4):332-338.
- [329] Amraoui Y, Mengel E, Hennermann JB. Oxysterols in Niemann-Pick type C: limitations of sensitivity and specificity. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2014;37(suppl):S150, abstract.

- [330] Assmann G, Fredrickson DS, Sloan HR, Fales HM, Highet RJ. Accumulation of oxygenated sterol esters in Wolman's disease. *J. Lipid Res.* 1975;16(1):28-38.
- [331] Fitoussi G, Nègre-Salvayre A, Pieraggi MT, Salvayre R. New pathogenetic hypothesis for Wolman disease: possible role of oxidized low-density lipoproteins in adrenal necrosis and calcification. *Biochem. J.* 1994;301(Pt 1):267-273.
- [332] Lee CY, Ruel I, Denis M, Genest J, Kiss RS. Cholesterol trapping in Niemann-Pick disease type B fibroblasts can be relieved by expressing the phosphotyrosine binding domain of GULP. *J. Clin. Lipidol.* 2013;7(2):153-164.
- [333] Björkhem I. Assay of unesterified 7-oxocholesterol in human serum by isotope dilution-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 1986;154(2):497-501.
- [334] Burnett JR, Moses EA, Croft KD, Brown AJ, Grainger K, Vasikaran SD, Leitersdorf E, et al. Clinical and biochemical features, molecular diagnosis and long-term management of a case of cerebrotendinous xanthomatosis. *Clin. Chim. Acta.* 2001;306(1-2):63-69.
- [335] Björkhem I, Diczfalusy U, Lövgren-Sandblom A, Starck L, Jonsson M, Tallman K, Schirmer H, et al. On the formation of 7-ketocholesterol from 7-dehydrocholesterol in patients with CTX and SLO. *J. Lipid. Res.* 2014;55(6):1165-1172.
- [336] Jessup W, Brown AJ. Novel routes for metabolism of 7-ketocholesterol. *Rejuvenation Res.* 2005;8(1):9-12.
- [337] Shinkyo R, Xu L, Tallman KA, Cheng Q, Porter NA, Guengerich FP. Conversion of 7-dehydrocholesterol to 7-ketocholesterol is catalyzed by human cytochrome P450 7A1 and occurs by direct oxidation without an epoxide intermediate. *J. Biol. Chem.* 2011;286(38):33021-33028.
- [338] Honda A, Salen G, Matsuzaki Y, Batta AK, Xu G, Leitersdorf E, Tint GS, et al. Side chain hydroxylations in bile acid biosynthesis catalyzed by CYP3A are markedly up-regulated in *Cyp27^{-/-}* mice but not in cerebrotendinous xanthomatosis. *J. Biol. Chem.* 2001;276(37):34579-34585.
- [339] de Sain-van der Velden MG, Verrips A, Prinsen BH, de Barse M, Berger R, Visser G. Elevated cholesterol precursors other than cholestanol can also be a hallmark for CTX. *J. Inher. Metab. Dis.* 2008; 31 Suppl 2:S387-393.
- [340] Björkhem I, Oftebro H, Skrede S, Pedersen JI. Assay of intermediates in bile acid biosynthesis using isotope dilution-mass spectrometry: hepatic levels in the normal state and in cerebrotendinous xanthomatosis. *J. Lipid Res.* 1981;22(2):191-200.
- [341] Honda A, Salen G, Matsuzaki Y, Batta AK, Xu G, Leitersdorf E, Tint GS, et al. Differences in hepatic levels of intermediates in bile acid biosynthesis between *Cyp27^(-/-)* mice and CTX. *J. Lipid Res.* 2001;42(2):291-300.
- [342] Liu W, Xu L, Lamberson CR, Merckens LS, Steiner RD, Elias ER, Haas D, et al. Assays of plasma dehydrocholesteryl esters and oxysterols from Smith-Lemli-Opitz syndrome patients. *J. Lipid Res.* 2013;54(1):244-253.
- [343] Irons M, Elias ER, Salen G, Tint GS, Batta AK. Defective cholesterol biosynthesis in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Lancet.* 1993;341(8857):1414.
- [344] Tint GS, Irons M, Elias ER, Batta AK, Frieden R, Chen TS, Salen G. Defective cholesterol biosynthesis associated with the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *N. Engl. J. Med.* 1994;330(2):107-113.
- [345] Kelley RI, Hennekam RC. The Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J. Med. Genet.* 2000;37(5):321-335.
- [346] Porter FD, Herman GE. Malformation syndromes caused by disorders of cholesterol synthesis. *J. Lipid Res.* 2011;52(1):6-34.

- [347] Honda A, Salen G, Shefer S, Batta AK, Honda M, Xu G, Tint GS, et al. Bile acid synthesis in the Smith-Lemli-Opitz syndrome: effects of dehydrocholesterols on cholesterol 7 α -hydroxylase and 27-hydroxylase activities in rat liver. *J. Lipid Res.* 1999;40(8):1520-8.
- [348] Polo G, Burlina A, Furlan F, Kolamunnage T, Cananzi M, Giordano L, Zaninotto M, et al. High level of oxysterols in neonatal cholestasis: a pitfall in analysis of biochemical markers for Niemann-Pick type C disease. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2016;54(7):1221-1229.
- [349] Corradini SG, Micheletta F, Natoli S, Iappelli M, Di Angelantonio E, De Marco R, Elisei W, et al. High preoperative recipient plasma 7 β -hydroxycholesterol is associated with initial poor graft function after liver transplantation. *Liver Transpl.* 2005;11(12):1494-1504.
- [350] Arciello M, Petta S, Leoni V, Iannucci G, Labbadia G, Cammà C, Craxi A, et al. Inverse correlation between plasma oxysterol and LDL-cholesterol levels in hepatitis C virus-infected patients. *Dig. Liver Dis.* 2012;44(3):245-250.
- [351] Oram JF, Heinecke JW. ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiol. Rev.* 2005;85(4):1343-1372.
- [352] Xu M, Zhou H, Tan KC, Guo R, Shiu SW, Wong Y. ABCG1 mediated oxidized LDL-derived oxysterol efflux from macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009;390(4):1349-1354.
- [353] Tarling EJ, Edwards PA. Dancing with the sterols: critical roles for ABCG1, ABCA1, miRNAs, and nuclear and cell surface receptors in controlling cellular sterol homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012;1821(3):386-395.
- [354] Kamijo K, Taketani S, Yokota S, Osumi T, Hashimoto T. The 70-kDa peroxisomal membrane protein is a member of the Mdr (P-glycoprotein)-related ATP-binding protein superfamily. *J. Biol. Chem.* 1990;265(8):4534-4540.
- [355] Lill R, Kispal G. Mitochondrial ABC transporters. *Res. Microbiol.* 2001;152(3-4):331-340.
- [356] Yamano G, Funahashi H, Kawanami O, Zhao LX, Ban N, Uchida Y, Morohoshi T, et al. ABCA3 is a lamellar body membrane protein in human lung alveolar type II cells. *FEBS Lett.* 2001;508(2):221-225.
- [357] Graf GA, Li WP, Gerard RD, Gelissen I, White A, Cohen JC, Hobbs HH. Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface. *J. Clin. Invest.* 2002;110(5):659-669.
- [358] Terasaka N, Wang N, Yvan-Charvet L, Tall AR. High-density lipoprotein protects macrophages from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by promoting efflux of 7-ketocholesterol via ABCG1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2007;104(38):15093-15098.
- [359] Engel T, Fobker M, Buchmann J, Kannenberg F, Rust S, Nofer JR, Schürmann A, et al. 3 β ,5 α ,6 β -Cholestanetriol and 25-hydroxycholesterol accumulate in ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1)-deficiency. *Atherosclerosis.* 2014;235(1):122-129.
- [360] Tarling EJ and Edwards PA. ATP binding cassette transporter G1 (ABCG1) is an intracellular sterol transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2011;108(49):19719-19724.
- [361] Neufeld EB, O'Brien K, Walts AD, Stonik JA, Demosky SJ, Malide D, Combs CA, Remaley AT. Cellular Localization and Trafficking of the Human ABCG1 Transporter. *Biology (Basel).* 2014;3(4):781-800.
- [362] Kinoshita M, Kawamura M, Fujita M, Hirota D, Suda T, Taki M, Kusano J, et al. Enhanced susceptibility of LDL to oxidative modification in a CTX patient: role of chenodeoxycholic acid in xanthoma formation. *J. Atheroscler. Thromb.* 2004;11(3):167-172.

- [363] Gonzalez-Cuyar LF, Hunter B, Harris PL, Perry G, Smith MA, Castellani RJ. Cerebrotendinous xanthomatosis: case report with evidence of oxidative stress. *Redox Rep.* 2007;12(3):119-124.