

Diagnóstico clínico, bioquímico y molecular en pacientes con defecto del transportador de creatina. Opciones terapéuticas

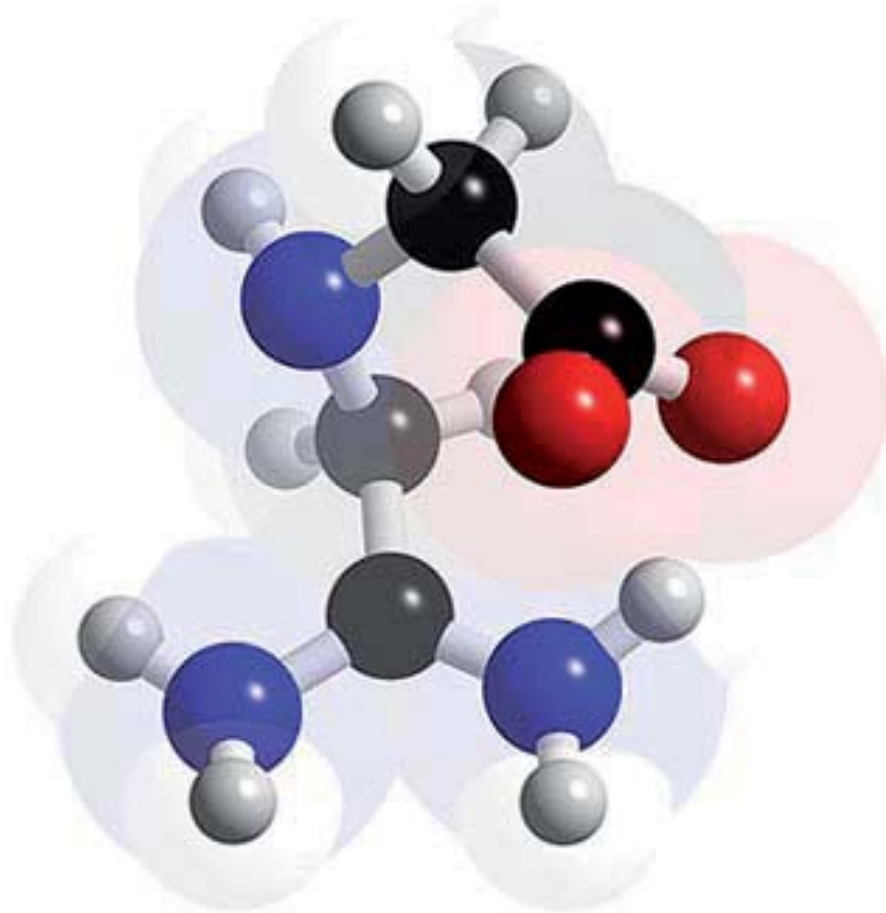
Carmen Fons Estupiñá

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.tesisenxarxa.net) 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. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (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.tesisenred.net) 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. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (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.tesisenxarxa.net) service 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 neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This 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.

**DIAGNÓSTICO CLÍNICO, BIOQUÍMICO Y
MOLECULAR EN PACIENTES CON
DEFECTO DEL TRANSPORTADOR DE
CREATINA. OPCIONES TERAPÉUTICAS**



CARMEN FONS ESTUPIÑÁ

Universitat de Barcelona

Facultat de Medicina

Departament d'Obstetricia i Ginecologia, Pediatria, Radiologia i Anatomía

**DIAGNÓSTICO CLÍNICO, BIOQUÍMICO
Y MOLECULAR EN PACIENTES CON
DEFECTO DEL TRANSPORTADOR DE
CREATINA. OPCIONES TERAPÉUTICAS**

Tesis presentada por

Carmen Fons Estupiñá

Para optar al grado de Doctora en Medicina y Cirugía

Barcelona, 2009

Directores de Tesis

Prof. Dr. Jaume Campistol Plana

Dr. Rafael Artuch Iriberry

Barcelona, Enero de 2010

Universitat de Barcelona

Facultat de Medicina

Departament d'Obstetricia i Ginecologia, Pediatria, Radiologia i Anatomia

**Diagnóstico clínico, bioquímico y molecular en pacientes con defecto del
transportador de creatina. Opciones terapéuticas.**

Memoria presentada por Carmen Fons Estupiñá para optar al Grado de Doctora en
Medicina por la Universidad de Barcelona.

Visto bueno de los directores:

Prof. Dr. Jaume Campistol Plana

Dr. Rafael Artuch Iriberry

AGRADECIMIENTOS

A los padres de los pacientes con defecto de transportador de creatina, por su colaboración incondicional y porque son un ejemplo a seguir.

A todos mis pacientes y sus padres porque por ellos vale la pena nuestro trabajo.

A Jaume Campistol por haberme dado la oportunidad de participar en este proyecto, por haber confiado en mí y por motivarme a finalizar este trabajo.

A Rafa por el apoyo que siempre he recibido de su parte, su ayuda ha sido fundamental para llevar a cabo este proyecto.

A las compañeras del IBC (Toni y Ángela), quería agradecerles su ayuda y las horas de trabajo que han dedicado a este estudio.

A Àngels, por sus consejos y por todo lo que me ha enseñado no solo a nivel profesional.

A Anna Vernet y a M^a Antonia Vilaseca por ser ejemplos a seguir en nuestra profesión.

A todos mis compañeros del Servicio de Neurología de Hospital Sant Joan de Déu, así como a Maite, Sonia y Marga, porque es fabuloso poder trabajar con gente como ellos.

A Loli, por prestarme su ayuda en todo momento, por su paciencia y su profesionalidad.

A las compañeras del CDIAP “APINAS” y del servicio de Pediatría y Dermatología del Hospital de Igualada por acogerme y cuidarme tanto durante este último año además de brindarme su amistad.

A los compañeros de la UCI-pediátrica y neonatal en especial a Iolanda y Eli por ser profesionales de excepción y porque es un placer trabajar con ellas.

A Agustín Legido, por transmitirme la pasión por la neurología y las continuas ganas de aprender, gracias por brindarme la oportunidad de realizar una estancia en St. Christopher’s de Filadelfia y tratarme como si fuera de la familia.

A mis amigos salmantinos con los que paso tan buenos ratos.

A Lourdes, Rosana, Gemma C, Magda, Gemma B, Gemma M, Carme P, Mireia, Sandra, Mónica, Laura, mis amigas, por todas las aventuras que hemos compartido y las que todavía nos esperan!!!!

A mis padres, las personas más importantes de mi vida, y las más buenas y menos egoístas que conozco, gracias por haberme enseñado a darle valor a las cosas pequeñas del día a día.

A Nacho por estar siempre a mi lado, por la energía que siempre me transmite y por lo afortunada que soy de haberle conocido y de poder compartir mi vida con una gran persona como él.

Al Ministerio de Sanidad por otorgarnos las becas FIS PI05/2080 y FIS PI05/1200 y al CIBERER por financiar los estudios que conforman esta Tesis.

*“Es justamente la posibilidad de realizar un sueño
lo que hace que la vida sea interesante”*

El alquimista, Paulo Coello

ÍNDICE

Introducción	1
1. Creatina: biosíntesis y transporte	5
2. Deficiencia cerebral de creatina	8
3. Expresión y función de AGAT, GAMT y CRTR en el cerebro de los mamíferos	10
4. Mecanismos patogénicos	13
5. Fenotipo clínico en los defectos cerebrales de creatina	15
6. Alteraciones bioquímicas en los defectos cerebrales de creatina	16
7. Neuroimagen en los defectos cerebrales de creatina	17
8. Protocolo de diagnóstico de los defectos de creatina cerebral	19
9. Tratamiento de los defectos de creatina cerebral	21
Justificación de la unidad temática e hipótesis de trabajo	23
1. Justificación de la unidad temática	27
2. Hipótesis de trabajo	29
Objetivos	31
1. Objetivo principal	35
2. Objetivos concretos	35
Material y métodos	37
1. Sujetos del estudio	41
1.1 Pacientes	41
1.2 Controles	41
1.3 Aspectos éticos	42

2. Material y métodos	42
2.1 Pruebas bioquímicas	42
2.1.1 Determinaciones bioquímicas en orina	42
2.1.2 Evaluación del efecto de la dieta en el valor de la ratio	
Cr/Crn en orina	43
2.1.3 Estudios en fibroblastos	43
2.1.4 Estudios de incorporación de CM y CEE en fibroblastos	43
2.2 Estudios neurofisiológicos	44
2.3 Tratamiento con L-arginina	45
2.3.1 Protocolo de tratamiento con L-arginina	45
2.3.2 Evaluación neurorradiológica	45
2.3.3 Evaluación cognitiva	46
2.3.4 Determinaciones bioquímicas	47
2.4 Tratamiento con creatina etil-ester	47
2.4.1 Análisis bioquímico de la pureza del producto	47
2.4.2 Protocolo de tratamiento con creatina etil-ester	48
2.4.3 Evaluación neurorradiológica	48
2.4.4 Evaluación cognitiva	48
2.4.5 Determinaciones bioquímicas	48
2.5 Análisis estadístico	49
Resultados	51
1. Deficiencia de transportador de creatina: prevalencia entre	
pacientes con retraso mental y dificultades en el cribado metabólico	55

2. Espectro de la epilepsia en la deficiencia del transportador de creatina	63
3. Suplementación con L-arginina en cuatro pacientes con defecto de transportador de creatina ligado al cromosoma X	71
4. Respuesta a los análogos de creatina en fibroblastos y en pacientes con defecto del transportador de creatina	81
Discusión conjunta	89
Conclusiones	99
Opciones de futuro	103
Bibliografía	107
Anexo	117

ABREVIATURAS

Deficiencia cerebral de creatina	DCC
Creatina	Cr
Guanidinoacetato	GA
Creatinina	Crn
Fosfocreatina	CrP
Creatina quinasa	CK
Adenosina trifosfato	ATP
Arginina:glicina amidinotransferasa	AGAT
Guanidinoacetato metiltransferasa	GAMT
Transportador de creatina	CRTR
Resonancia magnética con espectroscopía	RMS
Sistema nervioso central	SNC
Creatina monohidrato	CM
Creatina etil-éster	CEE
Barrera hemato-encefálica	BHE
Sistema nervioso central	SNC
Trastorno del espectro autista	TEA
Medio mínimo esencial	MEM

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

- 1. Creatina: biosíntesis y transporte**
- 2. Deficiencia cerebral de creatina**
- 3. Expresión y función de AGAT, GAMT y CRTR en el cerebro de los mamíferos**
- 4. Mecanismos patogénicos**
- 5. Fenotipo clínico en los defectos cerebrales de creatina**
- 6. Alteraciones bioquímicas en los defectos cerebrales de creatina**
- 7. Neuroimagen en los defectos cerebrales de creatina**
- 8. Protocolo de diagnóstico de los defectos de creatina cerebral**
- 9. Tratamiento de los defectos cerebrales de creatina**

1. Creatina: biosíntesis y transporte

El ácido α -metilguanidino acético fue identificado en el año 1835 por el químico francés Chevreul y se le denominó creatina (Cr) (**Figura 1**).

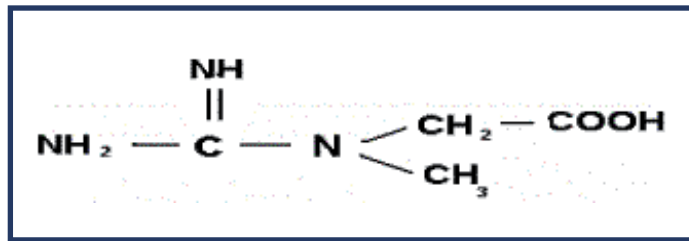


Figura 1. Estructura química de la creatina.

El sistema creatina/creatina-fosfato (Cr/CrP) juega un papel esencial en el almacenamiento y transmisión de fosfatos de alta energía (Walker, 1979; Wyss et al, 2000). Un 95 % de la Cr corporal se encuentra en el músculo esquelético mientras que el 5 % restante se distribuye entre el cerebro, hígado, riñones y testículos (Walker, 1979). El pool de Cr corporal proviene de los aportes nutricionales (aproximadamente un 50 %) y de la biosíntesis endógena (50%).

La biosíntesis endógena de Cr tiene lugar mayoritariamente en el hígado, el páncreas y el riñón, a través de dos reacciones enzimáticas (**Figura 2**): la primera de ellas, catalizada por la enzima arginina:glicina amidinotransferasa (AGAT; EC 2.1.4.1) sintetiza guanidinoacetato (GA) y ornitina a partir de la transferencia del grupo amidino de la L-arginina a la glicina, en una reacción reversible que constituye un paso limitante en la biosíntesis de Cr, siendo la expresión de la AGAT inhibida por la Cr; la segunda, catalizada por la enzima guanidinoacetato metiltransferasa (GAMT; EC 2.1.1.2) metila el GA a partir de S-adenosilmetionina, formando Cr y S-adenosilhomocisteína.

El transporte intracelular de Cr (importante para la homeostasis de Cr en tejidos con alto requerimiento y/o biosíntesis restringida, como el músculo y el cerebro) se lleva a cabo mediante un transportador específico y saturable, el transportador de creatina (CRTR). Este transportador es un miembro de la superfamilia de transportadores de neurotransmisores, dependientes de Na^+/Cl^- . Una vez en estos tejidos, la Cr intracelular es fosforilada a fosfocreatina (CrP) y ésta a su vez defosforilada, mediante uno de los cinco isoenzimas de creatina kinasa (CK), constituyendo un sistema para la homeostasis de energía intracelular y permitiendo el almacenamiento de energía convertible en adenosina trifosfato (ATP) principalmente en tejidos con necesidades energéticas grandes o fluctuantes (Walliman et al, 1992). Posteriormente, la Cr y CrP se transforman espontáneamente en creatinina (Crn), con un recambio diario constante del 1.5% de la Cr total. Esta ciclación no-enzimática y reversible de Cr en Crn es dependiente del pH y la temperatura. Finalmente, la Crn se excreta en orina, siendo su eliminación diaria directamente proporcional a la Cr corporal total (Wyss et al, 2000). Para que se mantengan constantes las reservas corporales de Cr, los procesos que dan lugar a su biosíntesis, transporte y utilización se hallan regulados estrechamente.

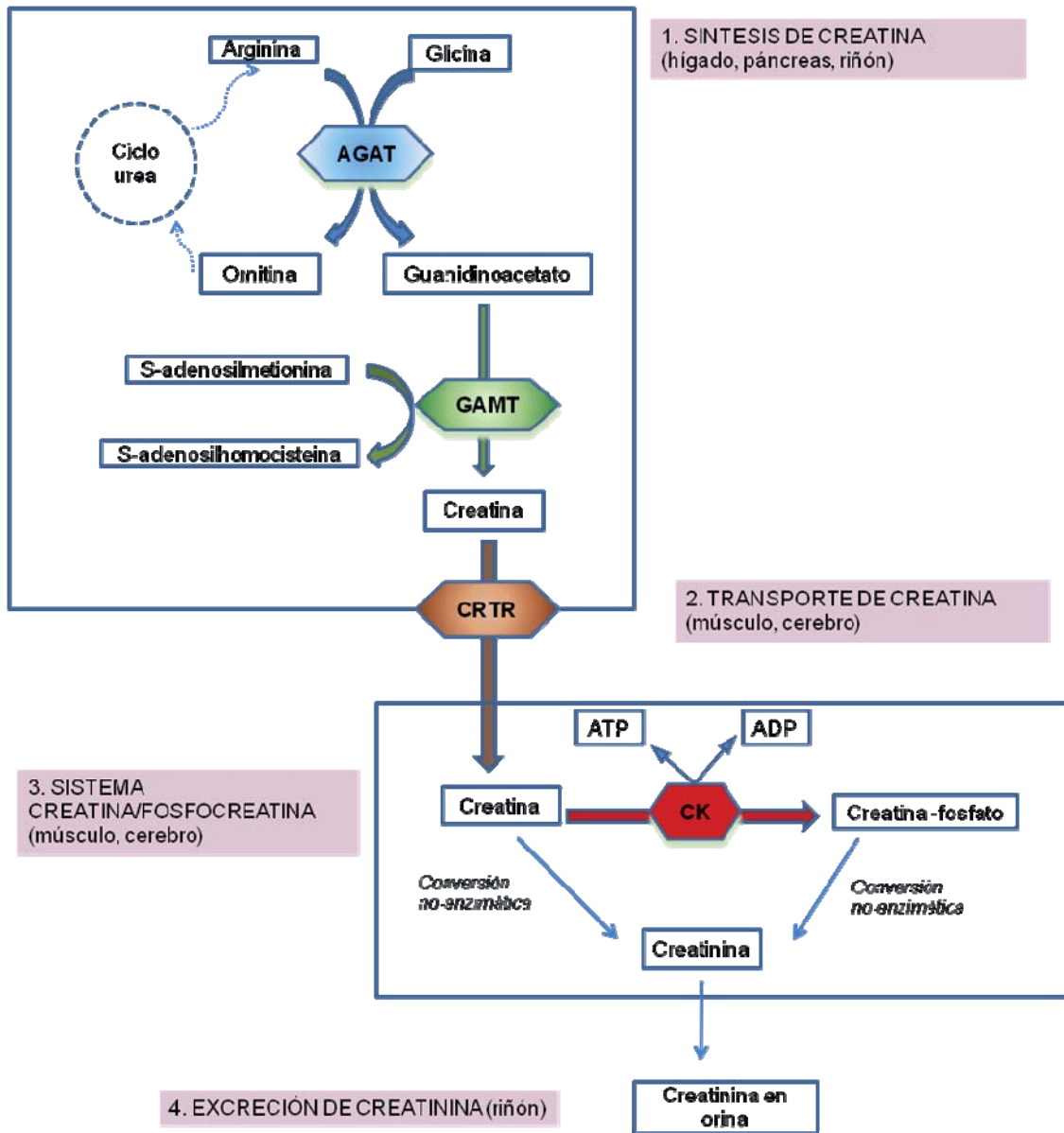


Figura 2. Vía metabólica de la creatina/creatina-fosfato.

2. Deficiencia cerebral de creatina

Los síndromes de deficiencia cerebral de creatina (DCC) o trastornos primarios del metabolismo de la Cr son un grupo de tres enfermedades en las que existe un defecto en los enzimas que intervienen en la síntesis de Cr (deficiencia de GAMT o de AGAT) o del transportador de Cr (deficiencia del CRTR).

El primer trastorno metabólico de la biosíntesis de Cr identificado fue el déficit de GAMT (OMIM 601240) (Stöckler et al, 1994) en un paciente con retraso grave del desarrollo psicomotor, epilepsia refractaria y trastorno del movimiento. La resonancia magnética con espectroscopia de protones (RMS) mostró la ausencia del pico de Cr cerebral y una concentración elevada de GA, lo que les llevó a analizar la Cr y sus precursores en líquidos biológicos, obteniendo resultados compatibles con los encontrados en la RMS. La deficiencia de GAMT se confirmó posteriormente en 1996 (Stöckler et al, 1996), y el paciente fue tratado con creatina monohidrato (CM), respondiendo con un aumento significativo de la Cr cerebral y una notable mejoría de la sintomatología neurológica.

Unos años después, en 2001 se describió el defecto de CRTR (OMIM 300036) (Salomons et al, 2001) y la deficiencia de AGAT (OMIM 602360) (Item et al, 2001). La RMS, en ambas deficiencias, se caracterizaba también por presentar una ausencia o disminución importante de Cr y CrP en el cerebro.

Esta técnica no invasiva ha sido la que ha permitido identificar los primeros pacientes. Los estudios enzimáticos han contribuido a poder confirmar el defecto de la actividad enzimática correspondiente (GAMT y AGAT) o del CRTR. Además, la identificación de los genes responsables de cada uno de los defectos, ha facilitado el diagnóstico

definitivo de los diferentes síndromes de DCC. Los dos defectos de la síntesis de Cr se heredan de forma autosómica recesiva, mientras que el defecto del CRTR muestra una herencia ligada al cromosoma X.

El gen que codifica para GAMT se localiza en el cromosoma 19p13.3 (Stöckler et al, 1996), el que codifica para AGAT en el cromosoma 15q11.2 (Item et al, 2001) y el que codifica para el CRTR (gen *SLC6A8*), se localiza en el cromosoma Xq28 (Salomons et al, 2001). En todos los casos se han identificado diversas mutaciones y polimorfismos (Carducci et al, 2000; Dhar et al, 2009; Almeida et al, 2007; Item et al, 2004; Battini et al, 2002; Rosenberg et al, 2004; Rosenberg et al, 2007). Hasta el momento se han descrito alrededor de 37 pacientes con deficiencia de GAMT (Almeida et al, 2004, Item et al, 2004; Caldeira-Araújo et al, 2005, Sempere et al, 2009), tres pacientes con deficiencia de AGAT (Item et al, 2001; Battini et al, 2002) y aproximadamente 150 pacientes con deficiencia del CRTR (Salomons et al, 2001; Salomons et al, 2003; Rosenberg et al, 2004; Kleefstra et al, 2005; Póo et al, 2006; Puusepp et al, 2009; Campistol et al, 2007; Sempere et al, 2009). En varios estudios de prevalencia del déficit de CRTR en grupos de varones con retraso mental se han encontrado mutaciones en un 2.1 % (Rosenberg et al, 2004) y 2.3% de los caos (Mercimek-Mahmutoglu et al, 2009).

3. Expresión y función de AGAT, GAMT y CRTR en el cerebro de los mamíferos

Aunque la mayor parte de síntesis endógena de Cr tiene lugar en el riñón, páncreas e hígado, otros tejidos, entre ellos el cerebro expresan AGAT, GAMT y CRTR, tanto durante el desarrollo embrionario como durante la vida postnatal.

Durante la embriogénesis, el sistema nervioso central (SNC) en desarrollo, es más dependiente de la Cr sintetizada periféricamente que de la propia síntesis. En cambio, existen evidencias de que el SNC adulto presenta una capacidad limitada para obtener Cr de los tejidos en los que se sintetiza endógenamente debido a la ausencia de CRTR en los astrocitos que configuran la barrera hemato-encefálica (BHE), lo que limita la capacidad del cerebro de importar Cr desde la periferia, sugiriendo además que el cerebro podría ser dependiente de su propia síntesis endógena. Estudios de hibridación *in situ* no-radioisotópicos en cerebros de ratas adultas indican que AGAT y GAMT se expresan de forma mínima en las neuronas y la glía, mientras que el CRTR se expresa en neuronas y oligodendrocitos pero no en astrocitos (**Figura 3**).

Este hallazgo demuestra que todas las células del SNC son capaces de sintetizar Cr a partir de arginina y glicina (Braissant et al, 2001). Además, la ausencia de expresión de CRTR en astrocitos y particularmente en aquellos que contactan con las células del endotelio capilar de la BHE, refuerza la idea de que bajo condiciones normales, la Cr utilizada por el SNC es sintetizada predominantemente por el SNC. La expresión de CRTR en neuronas y oligodendrocitos indica que el tráfico de Cr es posible en aquellas áreas de mayor consumo de Cr.

Estos hallazgos son contradictorios con los observados en el caso del déficit de CRTR, en el cual a pesar de la expresión normal de AGAT y GAMT en el SNC, persiste un déficit de Cr.

Una hipótesis posible para explicar el déficit de Cr cerebral cuando existe una deficiencia del CRTR se basa en el hecho que en la sustancia gris cortical, los enzimas AGAT y GAMT se expresan de forma disociada. Por tanto, sólo unas pocas células (menos de un 20 %) son capaces de co-exresar ambos genes y realizar una síntesis autónoma de Cr. Esto sugiere que para llevar a cabo la síntesis de Cr en el SNC, al menos una cantidad significativa, el GA se debe transportar desde las células que expresan AGAT hacia las células que expresan GAMT en las cuales se sintetiza la Cr, y este transporte probablemente se lleva a cabo mediante el CRTR (Braissant et al, 2007, Braissant et al, 2008, Braissant et al, 2009).

Esto explicaría el déficit de Cr observado en pacientes con déficit de CRTR. Otros investigadores (Perasso et al, 2003), han estudiado la capacidad de la Cr administrada de forma parenteral (intraperitoneal) de atravesar la BHE y acumularse en el cerebro. Los resultados del estudio demuestran que la Cr sérica se transporta al cerebro pero de forma mínima.

Esto es debido, probablemente a la dificultad que tiene la Cr para atravesar la BHE por la ausencia de CRTR en los podocitos de los astrocitos que rodean los capilares que conforman la BHE. Otro estudio similar, concluyó que el transporte de Cr se satura por la creatina endógena plasmática y por ello la administración de 20 g de Cr oral al día durante 4 semanas producía solo un aumento del 9 % de la Cr cerebral total (Dechent et al, 1999).

En el 2002, Ohtsuki y colaboradores demostraron que existe una expresión del CRTR en los capilares cerebrales y en las neuronas en un modelo *in vivo* e *in vitro* de BHE y además que el transporte de Cr desde el torrente sanguíneo al cerebro es a través de la BHE, en contra de gradiente de concentración y que el CRTR actúa como regulador de la concentración de Cr en el cerebro.

Este estudio es coherente con el hecho de que los pacientes con déficit de los enzimas de la síntesis de Cr (AGAT y GAMT) presentan una mejoría clínica y neurorradiológica, con un aumento de la concentración de Cr cerebral tras el tratamiento con CM oral. Por tanto, existe un transporte de Cr a través de la BHE, al menos en condiciones en que la síntesis cerebral se encuentra disminuida o alterada.

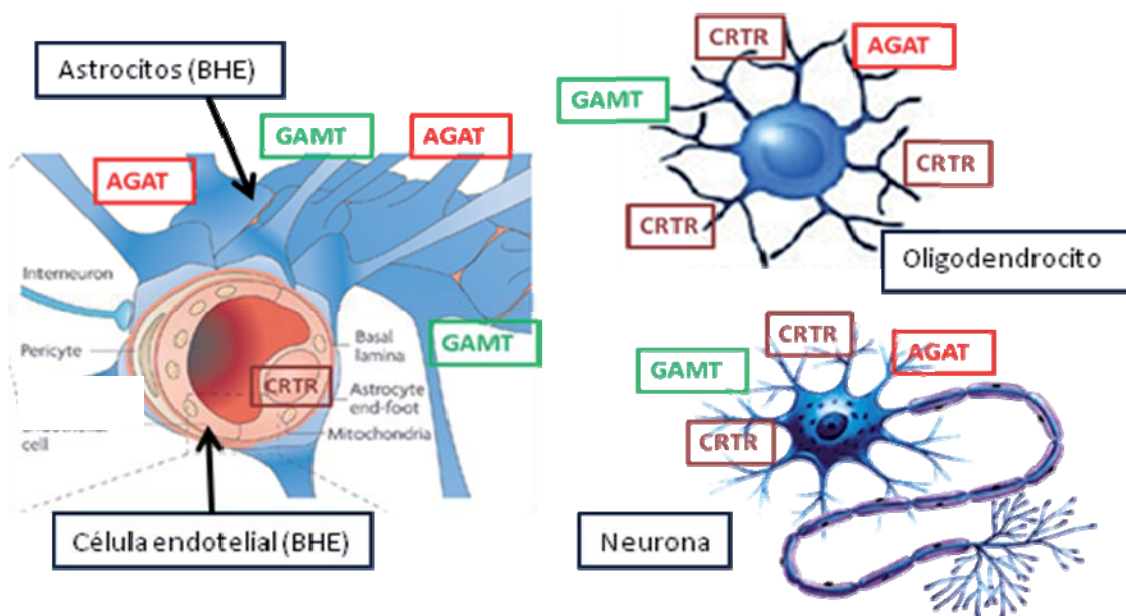


Figura 3. Expresión de los enzimas AGAT y GAMT y del CRTR en las diferentes células del sistema nervioso central.

4. Mecanismos patogénicos

Los mecanismos fisiopatológicos de la DCC tienen un indudable interés, tanto para el diseño de posibles estrategias terapéuticas, como para el conocimiento básico del metabolismo de la Cr y del efecto que causa la depleción de Cr en los distintos órganos, principalmente en el cerebro.

La Cr juega un papel esencial en el funcionalismo cerebral, tal como traduce su deficiencia en forma de encefalopatía caracterizada por retraso mental, trastornos del lenguaje, autismo, epilepsia y trastornos del movimiento.

Inicialmente se consideraba al GA como el principal neurotóxico cerebral en los DCC. La presencia de síntomas clínicos tanto en el defecto de CRTR como en el déficit de AGAT, en los que existen unos valores normales de GA hizo pensar que probablemente la deficiencia de Cr está implicada en mecanismos que causan disfunción neurológica especialmente en fases precoces del neurodesarrollo.

Por otro lado, los trastornos del movimiento y la epilepsia refractaria, característicos del déficit de GAMT, estarían probablemente relacionados con el acumulo de GA (D'Hooge et al, 1992).

Se ha demostrado que los derivados guanidino, entre ellos la Cr, pueden afectar a la neurotransmisión GABAérgica actuando como agonistas parciales de los receptores GABA_A, interfiriendo en su función inhibitoria (De Deyn et al, 2001; Neu et al, 2002).

Recientemente se ha propuesto un modelo de acción de la Cr cerebral (**Figura 4**). Según este modelo, la Cr se libera por las neuronas del SNC de forma similar a los neurotransmisores clásicos, por un mecanismo de exocitosis. Se ha observado *in vitro* que la Cr actúa como co-transmisor y que modula el funcionamiento de receptores

postsinápticos de algunos neurotransmisores como es el caso del GABA. Una vez liberada al espacio sináptico, la Cr se recapta mediante el CRTR hacia el interior de las neuronas y células gliales (Almeida et al, 2006).

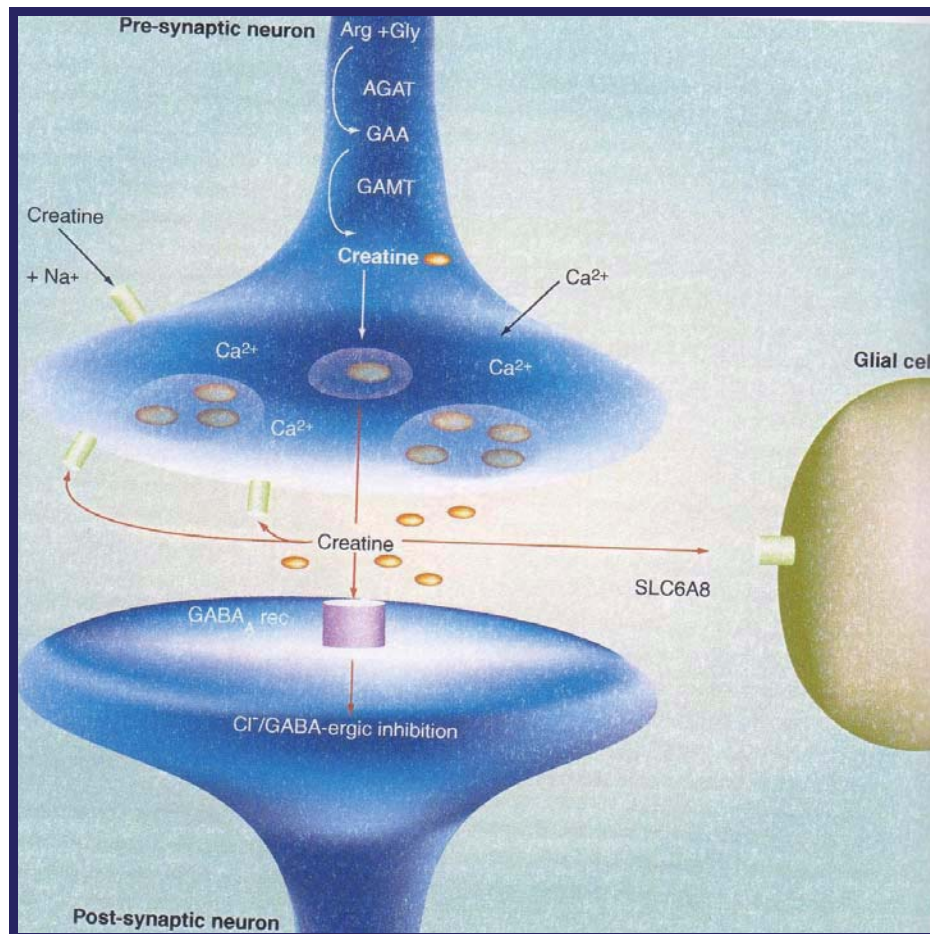


Figura 4. Propuesta de modelo de acción de la creatina a nivel cerebral. Tras ser sintetizada por los enzimas AGAT Y GAMT, la Cr es liberada por un mecanismo de exocitosis y Ca⁺⁺ dependiente al espacio sináptico, y desde aquí interactúa con el receptor GABA_A de la neurona postsináptica. Posteriormente la Cr es recaptada desde el espacio sináptico por el CRTR de las neuronas o de las células gliales (Almeida et al, 2006).

5. Fenotipo clínico en los defectos cerebrales de creatina

Los pacientes afectados de DCC se caracterizan por un retraso del desarrollo evidente a partir de los 6-12 meses de vida, que se manifiesta posteriormente como retraso mental, dificultades de lenguaje expresivo y receptivo, epilepsia y trastorno del espectro autista (TEA) (Schulze, 2003; Leuzzi et al, 2002; Stromberger et al, 2003) (**Tabla 1**). Aunque existe una amplia variabilidad en cuanto a la gravedad de los síntomas clínicos en los diferentes defectos, se han descrito algunos síntomas característicos en cada uno de ellos. Los pacientes con deficiencia de GAMT, en los que se detectan concentraciones elevadas de GA en líquidos biológicos y en tejidos, además presentan epilepsia refractaria al tratamiento con antiepilépticos y trastornos graves del movimiento (Schulze, 2003). Los tres pacientes descritos con deficiencia de AGAT presentan manifestaciones clínicas más leves, que se limitan a un retardo mental moderado con trastorno del lenguaje. En el caso de la deficiencia de CRTR, las manifestaciones clínicas de este defecto incluyen: retardo mental, epilepsia, TEA y un retardo del lenguaje grave, tanto de expresión como comprensión (deGraw et al, 2003). Se ha descrito que un 50 % de mujeres portadoras (heterocigotas) de la mutación en el gen *SLC6A8* (localizado en el cromosoma X), presentan síntomas leves como trastornos de aprendizaje de diferentes grados, aunque no se han realizado estudios neuropsicológicos detallados (deGrauw et al, 2003). Probablemente, los síntomas en portadoras dependen del patrón de lionización del cromosoma X, aunque en la mayoría de los casos, la concentración de Cr en orina y en cerebro es normal.

Deficiencia	Nº Casos	Retraso mental	Epilepsia		Trastorno del movimiento	Trastorno de conducta
			Frecuencia	Fármaco-resistencia		
GAMT	37	Leve - severo	93%	30%	Severo	TEA
AGAT	3	Leve-moderado	20% CF	No	No	NO
CRTR	150	Leve-severo	50%	1 caso	No	TEA

CF: convulsiones febriles; TEA: trastorno de espectro autista.

Tabla 1. Características clínicas en los defectos cerebrales de creatina.

6. Alteraciones bioquímicas en los defectos cerebrales de creatina

Los estudios bioquímicos en los DCC son de vital importancia para realizar una aproximación diagnóstica inicial en pacientes con sospecha clínica. El diagnóstico bioquímico se realiza mediante la determinación de GA y Cr en líquidos biológicos (sangre y orina) (**Tabla 2**). Cada uno de los defectos presenta unos hallazgos bioquímicos determinados: la deficiencia de GAMT se caracteriza por un aumento de GA y una disminución de Cr en líquidos biológicos y tejidos; en la deficiencia de AGAT se observa una disminución tanto de GA como de Cr; por el contrario, en la deficiencia del CRTR, la concentración de GA se halla dentro de los valores control, mientras que la de Cr en plasma y orina está aumentada. La determinación de Cr y Crn en orina (expresada como ratio de Cr/ Crn) es la forma de diagnosticar bioquímicamente el defecto de CRTR en los cuales se encuentra elevada.

Después de demostrar un patrón anormal de metabolitos (Cr y GA) en sangre y/o orina, la determinación de la actividad enzimática de GAMT y AGAT en fibroblastos o linfoblastos confirma bioquímicamente los defectos de síntesis (Verhoeven et al, 2005) mientras que la incorporación de Cr en fibroblastos cultivados en un medio suplementado con Cr, permite el estudio del defecto del CRTR (Salomons et al, 2001).

Deficiencia enzimática	GA orina	Ratio Cr/Crn orina
GAMT	Elevado	Normal
AGAT	Bajo	Normal
CRTR	Normal	Elevada

Tabla 2. Alteraciones bioquímicas en los diferentes defectos de creatina cerebral.

7. Neuroimagen en los defectos cerebrales de creatina

Los estudios de neuroimagen convencionales (RM cerebral) son normales en la mayoría de pacientes salvo en algunos casos de déficit de GAMT en los que se ha reportado la existencia de hiperintensidad en núcleos pálidos bilaterales (Morris et al, 2007).

Los estudios mediante RMS cerebral muestran una ausencia o disminución importante del pico de Cr en la sustancia blanca periventricular (**Figura 5**), cerebelo y córtex parieto-occipital.

Esta prueba es importante no solo como método de diagnóstico sino como un medio de monitorización de la eficacia del tratamiento principalmente en los defectos de síntesis, dado que refleja el restablecimiento de la concentración de Cr cerebral (Dezortova et al, 2008; Bianchi et al, 2007).

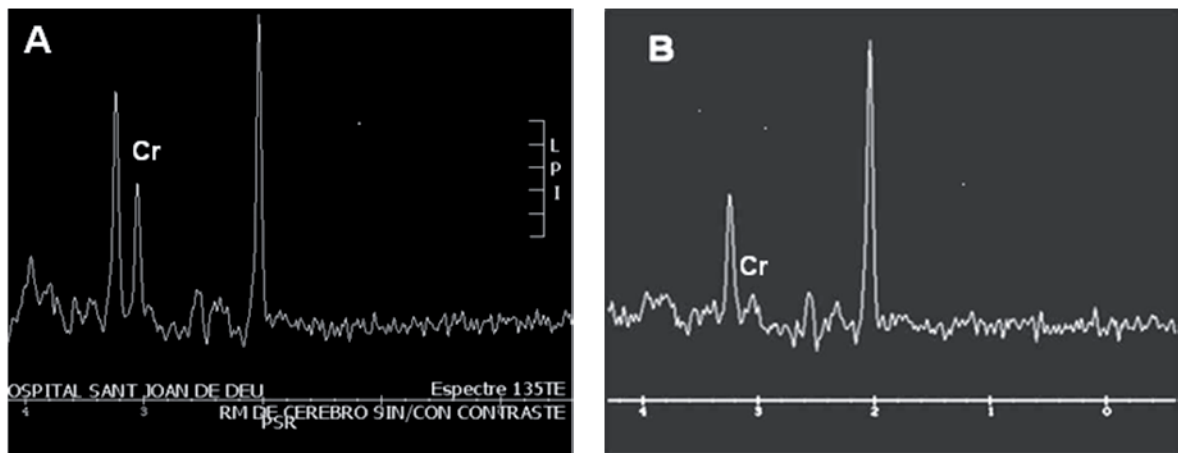


Figura 5. Espectroscopia cerebral (RMS) a nivel de la sustancia blanca periventricular posterior. A) RMS en un sujeto control; B) RMS en un paciente afecto de defecto de CRTR.

8. Protocolo de diagnóstico de los defectos de creatina cerebral

Aún cuando el diagnóstico de los primeros pacientes derivó de la identificación de los mismos a partir de su estudio mediante RMS, este procedimiento es costoso, requiere anestesia (en la mayoría de casos), experiencia con la técnica y no está disponible en todos los centros.

Por otra parte, la selección de pacientes basada en la clínica debe incluir un amplio espectro de síntomas comunes a muchas otras enfermedades: retraso mental, trastornos del lenguaje, epilepsia, trastorno de espectro autista y trastornos del movimiento (Leuzzi et al, 2002; Schulze, 2003; Stromberger et al, 2003). La propuesta de protocolo diagnóstico en los DCC consiste en seleccionar a los pacientes con criterios clínicos y estudiarlos inicialmente desde el punto de vista bioquímico, mediante análisis de metabolitos (GA y ratio Cr/Crn en orina y plasma). De esta forma, sólo los casos que muestren alteraciones bioquímicas sugestivas de una deficiencia cerebral de Cr se estudiarán por RMS, y si se demuestra que existe deficiencia cerebral de Cr se proseguirán los estudios bioquímicos (estudios enzimáticos y de incorporación de Cr en fibroblastos) y moleculares (**Figura 6**).

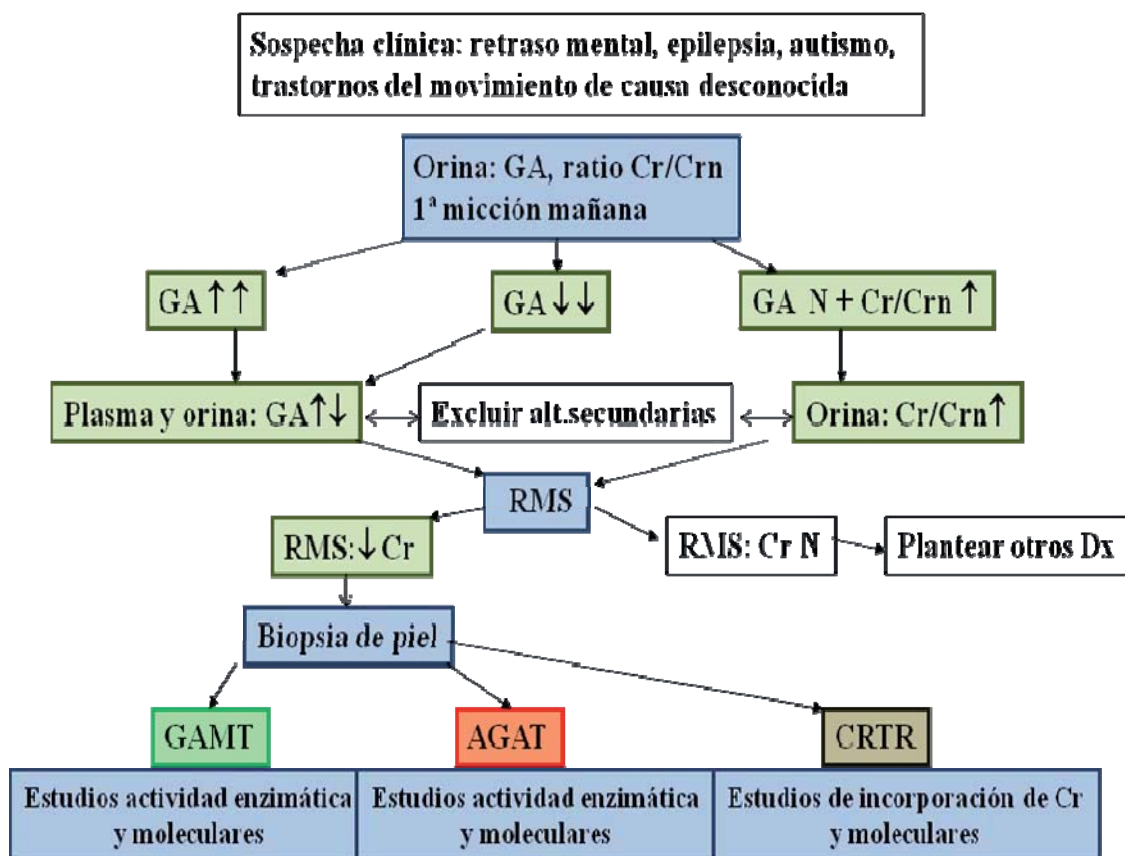


Figura 6. Protocolo de diagnóstico de los defectos cerebrales de creatina.

9. Tratamiento de los defectos cerebrales de creatina

La finalidad del tratamiento se basa en restaurar los niveles de Cr cerebral. Los pacientes con defectos de síntesis de Cr (GAMT y AGAT) responden favorablemente a la administración de CM tanto a nivel clínico como radiológico, aumentando el pico de Cr en la RMS (Sempere et al, 2009; Morris et al, 2007).

Dado que la síntesis de GA por parte de la enzima AGAT y la expresión del gen AGAT se controlan mediante un mecanismo de retro-inhibición dependiente de la concentración de Cr (Derave et al, 2004), en el déficit de GAMT, a pesar de la suplementación con CM (0.4 g/kg/día), no se ha logrado reducir significativamente la concentración de GA ni obtener una franca mejoría clínica.

La disminución de la concentración de GA se ha conseguido mediante la inhibición competitiva del enzima AGAT, asociando al tratamiento suplementos de ornitina (100 mg/kg/día) y restricción dietética de L-arginina (15 mg/kg/día). Con esta estrategia se observó una cierta mejoría clínica así como un mejor control de la epilepsia (Schulze et al, 2001).

En cuanto al tratamiento de la deficiencia de AGAT, existe todavía muy poca experiencia pero parece que la administración oral de CM (0.4 g/kg/día), incrementa el pico de Cr en el cerebro entre un 40-80%, lo cual sería suficiente para conseguir una normalización bioquímica y probablemente clínica (Bianchi et al, 2000).

La suplementación con CM, no parece tener éxito en la deficiencia del CRTR, ya que después de varios meses de tratamiento, se sigue sin detectar pico de Cr cerebral y los síntomas neurológicos persisten (Salomons et al, 2001), además de incrementar notablemente el peso.

En animales de experimentación se ha demostrado que existe un cierto grado de síntesis cerebral de Cr (Braissant et al, 2007), lo que hace suponer que estos pacientes podrían responder al tratamiento con precursores de la síntesis de Cr como la L-arginina y la glicina, como se ha observado en linfoblastos con ausencia de CRTR (Leuzzi et al, 2008). Además Chilosì et al, 2008, reportan un paciente con defecto de CRTR que mejoró clínicamente tras un año de tratamiento con L-arginina.

Recientemente, Lunardi et al, 2006, han observado mediante estudios *in vitro* que determinados análogos de la Cr, con características lipofílicas, pueden atravesar la membrana plasmática de células de hipocampo de ratón de forma independiente del transportador. Posteriormente Perasso et al, 2009, han estudiado *in vivo* los efectos como neuroprotector de uno de estos análogos, el complejo fosfocreatina-Mg-acetato, observando que este compuesto actúa como neuroprotector administrado antes de la isquemia. Además podría considerarse una alternativa terapéutica en un futuro en pacientes con defecto de CRTR.

No obstante, se necesitan estudios clínicos adicionales en humanos para determinar si los precursores de la síntesis de Cr (L-arginina y/o glicina) o los análogos liposolubles de la Cr son realmente eficaces en el tratamiento de los pacientes con defectos de CRTR.

Finalmente, hay que destacar la importancia del tratamiento precoz con CM en pacientes pre-sintomáticos con defectos de síntesis de Cr. Recientemente se ha demostrado que previene el desarrollo de los síntomas de la enfermedad, a pesar de presentar las alteraciones bioquímicas y la deficiencia de Cr en el cerebro (Schulze et al, 2006, 2007; Battini et al, 2006).

**JUSTIFICACIÓN
HIPÓTESIS**

JUSTIFICACIÓN DE LA UNIDAD TEMÁTICA E HIPÓTESIS DE TRABAJO

- 1. Justificación de la unidad temática**
- 2. Hipótesis de trabajo**

Justificación de la unidad temática

Los DCC constituyen un grupo de enfermedades neurometabólicas hereditarias, descritas recientemente y hasta ahora infradiagnosticadas, tanto por la falta de procedimientos adecuados para su diagnóstico, como por el amplio e inespecífico espectro de síntomas con que se manifiestan.

El conjunto de trabajos que forman parte de esta tesis doctoral, pretenden establecer unos criterios de selección aplicados sistemáticamente a un amplio grupo de pacientes pediátricos afectos de retraso mental/TEA como signos clínicos principales, junto con el diseño de una buena estrategia de diagnóstico bioquímico, radiológico y genético. Como objetivo final nos hemos propuesto mejorar la eficacia diagnóstica de los pacientes afectos de DCC.

Además teniendo en cuenta que estudios previos sitúan el defecto de CRTR dentro de las causas más frecuentes de retraso mental ligado al cromosoma X, hemos realizado un estudio basado en la determinación de la prevalencia en nuestro medio del defecto de CRTR, mediante el cribaje de metabolitos de la Cr en orina en una población de pacientes afectos de retraso mental y/o autismo. Además se realizaron estudios bioquímicos para evaluar qué factores dietéticos pueden influir en la alteración de los resultados bioquímicos en orina y así dificultar el diagnóstico bioquímico de esta entidad.

Posteriormente con el objetivo de incrementar el conocimiento del fenotipo clínico en pacientes con defecto de CRTR, evaluamos específicamente las características de la epilepsia, síntoma frecuente y que asocia complicaciones graves. Se estudiaron los mecanismos fisiopatogénicos de la epilepsia y la eficacia de los respectivos tratamientos antiepilépticos además de evaluar la correlación fenotipo-genotipo respecto a la gravedad de la epilepsia.

Dado que el defecto de CRTR, es una enfermedad que no dispone de tratamiento efectivo en la actualidad, consideramos de vital importancia estudiar en estos pacientes posibles tratamientos que han sido ensayados previamente *in vitro* con resultados positivos. Gran parte de nuestro trabajo se ha basado en ensayar diferentes estrategias terapéuticas en pacientes con defecto de CRTR, y evaluar la respuesta a estos tratamientos.

Hipótesis de trabajo

La hipótesis de esta tesis doctoral se basa en que la aplicación de estrategias diagnósticas en los DCC, concretamente en el defecto de CRTR permitirá detectar por vez primera en nuestro país los primeros pacientes afectados de defecto de CRTR.

Dado que estos pacientes presentan una sintomatología neurológica muy variada e inespecífica, ésta amplia sintomatología neurológica podría estar relacionada con el tipo de mutación y el defecto enzimático asociado por lo que intentamos realizar una correlación genotipo-fenotipo.

Considerando la ausencia de tratamiento efectivo en los pacientes con defecto de CRTR, la aplicación de nuevas estrategias terapéuticas en nuestros pacientes (precursores de la síntesis de creatina y análogos de creatina con características liposolubles) posibilitará evaluar la eficacia de las mismas en humanos.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- 1. Objetivo principal**
- 2. Objetivos concretos**

Objetivo principal

Estudiar la prevalencia de los defectos de creatina cerebral en la población pediátrica en nuestro medio, sus características clínicas y la respuesta a diferentes estrategias terapéuticas. Establecer un protocolo diagnóstico y terapéutico.

Objetivos concretos

1. Evaluar la prevalencia del defecto de transportador de creatina cerebral en una población de varones afectados de retraso mental, autismo, epilepsia y trastorno grave de lenguaje. Estudiar la eficacia diagnóstica de las pruebas bioquímicas.
2. Evaluar las características clínicas de la epilepsia así como sus mecanismos fisiopatológicos y correlacionar la gravedad de ésta con el tipo de mutación.
3. Analizar la eficacia de la administración de precursores de la síntesis de creatina (L-arginina) a nivel clínico, neurorradiológico y cognitivo.
4. Investigar la eficacia del tratamiento con análogos de creatina modificados (creatina etil-éster) en fibroblastos de pacientes y en pacientes afectados de defecto de CRTR.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Sujetos del estudio

1.1 Pacientes

1.2 Controles

1.3 Aspectos éticos

2. Material y métodos

2.1 Pruebas bioquímicas

2.1.1 Determinaciones bioquímicas en orina

2.1.2 Evaluación del efecto de la dieta en el valor de la ratio Cr/ Crn en orina

2.1.3 Estudios en fibroblastos

2.1.4 Estudios de incorporación de CM y CEE en fibroblastos

2.2 Estudios neurofisiológicos

2.3 Tratamiento con L-arginina

2.3.1 Protocolo de tratamiento con L-arginina

2.3.2 Evaluación neurorradiológica

2.3.3 Evaluación cognitiva

2.3.4 Determinaciones bioquímicas

2.4 Tratamiento con creatina etil-ester

2.4.1 Análisis bioquímico de la pureza del producto

2.4.2 Protocolo de tratamiento con creatina etil-ester

2.4.3 Evaluación neurorradiológica

2.4.4 Evaluación cognitiva

2.4.5 Determinaciones bioquímicas

2.5 Análisis estadístico

1. Sujetos del estudio

1.1. Pacientes

Durante un período de 2 años, se han analizado las muestras de orina de un total de 1600 pacientes de sexo masculino afectados de retraso mental, autismo, epilepsia y trastorno grave del lenguaje, de origen desconocido. Estos pacientes (rango de edad de 1-18 años, media de 9 años) han sido controlados y estudiados en el departamento de neurología del Hospital Sant Joan de Déu, centro de referencia para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades neurometabólicas. Del total de estos pacientes y siguiendo el algoritmo diseñado para el diagnóstico de los defectos de creatina cerebral (**Figura 6**), se ha confirmado el diagnóstico de defecto de CRTR en 4 pacientes (rango de edad de 9-16 años, media de 12 años).

En el estudio en que analizamos las características de la epilepsia en el defecto de CRTR, se añadieron otros 3 pacientes de 11, 27 y 40 años respectivamente, los cuales se han diagnosticado recientemente.

1.2. Controles

En el trabajo titulado “Defecto de transportador de creatina: prevalencia entre pacientes afectados de retraso mental y dificultades en el screening metabólico”, para valorar la influencia de la dieta en la ratio Cr/Crn en orina, han participado 13 sujetos control (voluntarios sanos) de la misma área socio-demográfica (edad media de 27 años).

En el trabajo titulado “Respuesta a los análogos de creatina en fibroblastos y pacientes con defecto de transportador de creatina”, se utilizaron 6 líneas celulares de fibroblastos del banco celular de fibroblastos procedentes de sujetos control (Instituto Bioquímica Clínica). Estos fibroblastos provenían de pacientes de los que previamente se había descartado un defecto del metabolismo de la Cr.

1.3 Aspectos éticos

Todos los padres o tutores legales de los pacientes que participaron en los diferentes estudios firmaron un consentimiento informado, de acuerdo con la Declaración de Helsinki de 1964, revisada en Edimburgo en el año 2000.

Los diferentes estudios cuentan con la aprobación del comité de ética y de investigación del Hospital Sant Joan de Déu.

2. Material y métodos

2.1 Pruebas bioquímicas

2.1.1 Determinaciones bioquímicas en orina

Se obtuvo una muestra de la orina de primera hora de la mañana. La muestra de orina se conservó a -20° hasta su análisis. La cuantificación de GA y Cr se realizó mediante HPLC-MS/MS (Waters-Micromass, Manchester, UK, model Quatro micro™ API) y HPLC con detección de fluorescencia (Perkin-Elmer, NorwalkCT, USA). El protocolo analítico se ha descrito en detalle previamente (Arias et al, 2006).

La determinación de Crn en orina, se realizó mediante el método Jaffé cinético (A11A00060, ANX Diagnostic, Montpellier, France), según procedimiento automatizado (Junge et al, 2004).

2.1.2 Evaluación del efecto de la dieta en el valor de la ratio Cr/ Crn en orina

Para evaluar la influencia de la dieta en los valores de la ratio de Cr/Crn en orina en un grupo de controles sanos, se recogieron las muestras de orina de primera hora de la mañana, durante 5 días consecutivos y después de 10 horas de haber consumido un tipo específico de comida:

1^a día: verduras (100 g); 2^o día: 2 huevos; 3^o día: pasta (100 g); 4^o día: pescado azul (100 g); 5^o día: filete de ternera (100 g). El análisis de la Cr en orina se realizó mediante el método descrito en el apartado 2.1.

2.1.3 Estudios en fibroblastos

El transporte de Cr en cultivo de fibroblastos se estudió mediante la incubación de los fibroblastos durante 24 horas en un medio que contenía concentraciones fisiológicas y suprafisiológicas de creatina (25 $\mu\text{mol/L}$ y 500 $\mu\text{mol/L}$ respectivamente), siguiendo el método reportado previamente (Salomons et al, 2001). La Cr se midió por HPLC-MS/MS mediante una creatina marcada con isotopo estable (Arias et al, 2006).

2.1.4 Estudios de incorporación de CM y CEE en fibroblastos

Los fibroblastos se cultivaron de forma estándar en un medio mínimo esencial (MEM) suplementado con suero fetal bovino. Los estudios de incorporación de Cr en fibroblastos se llevaron a cabo siguiendo el método de Salomons et al 2001, con alguna modificación. La CEE y la CM se disolvieron en MEM hasta alcanzar la concentración

final de 25 y 500 $\mu\text{mol/L}$ en el medio de cultivo; estas soluciones se filtraron con filtros millipore de 0.22 μm y posteriormente se analizaron mediante MS/MS para cuantificar la concentración exacta de CM y CEE después del filtrado. Las células se incubaron con 25 y 500 $\mu\text{mol/L}$ de CM y CEE durante 24 y 72 horas. El transporte de Cr se cuantificó en el total de las células lisadas mediante HPLC-MS/MS (Waters-Micromass Manchester, UK, model Quatro microTM API) con el método previamente descrito (Arias et al, 2006). Los resultados se expresaron en pmol Cr/ μg de proteína.

2.2 Estudios neurofisiológicos

La monitorización de la epilepsia se realizó mediante registro vídeo-EEG, que consiste en el análisis de la actividad bioeléctrica cerebral recogida en el cuero cabelludo mediante electrodos de superficie (13-19 electrodos) colocados según el sistema internacional 10-20, con montaje bipolar y referencial. La duración de la monitorización fue de 30-45 minutos. El registro se realizó en condiciones de reposo, así como tras métodos de activación (ELI) incluyendo poligrafía. No se pudo registrar hiperventilación por falta de colaboración de los pacientes. La interpretación del Video-EEG se realizó por el mismo neurofisiólogo en todos los casos. Evaluamos los siguientes parámetros:

- Actividad eléctrica cerebral de base
- En sueño espontaneo: grafoelementos específicos de sueño
- Anomalías interictales: actividades lentas y/o actividad epileptiforme

2.3 Tratamiento con L-arginina

2.3.1 Protocolo de tratamiento con L-arginina

La L-arginina (L-arginina poder, SHS Nutricia, Madrid) se administró vía oral a una dosis de 0.4 g/kg/día repartida en 2 dosis, durante un período de 9 meses. La L-arginina es bien conocida en términos de eficacia, dosis, vías de administración y efectos secundarios (Böger et al, 2001) por este motivo, decidimos realizar el ensayo terapéutico con este aminoácido sin añadir glicina.

La dosis se eligió teniendo en cuenta las dosis de L-arginina con las que se suplementan los pacientes afectados de trastornos del ciclo de la urea y las dosis de creatina con las que se suplementan los pacientes con defectos de AGAT y GAMT, que es de 0.4 g/kg/día.

Dos de los pacientes que participaron en el ensayo terapéutico con L-arginina, habían recibido previamente tratamiento con CM (0.4g/kg/día) durante 1 año, sin observar mejoría clínica ni aumento del pico de Cr en la RMS. Se evidenció un considerable aumento de peso durante el tiempo de tratamiento con CM.

2.3.2 Evaluación neurorradiológica

Se estudió el pico de Cr cerebral mediante RMS antes de iniciar el tratamiento y al final de los 9 meses del estudio. Esta prueba se realizó bajo sedación. Se tomaron tomografías en los 3 planos del espacio y secuencias de pulso spin-eco T1, spin-eco T2, FLAIR y adquisición 3D. Para la espectroscopia de protones se adquirieron espectros a tiempo de eco largo (PRESS 1600/135) y corto (STEAM 1600/20).

El pico cerebral de Cr se obtuvo en los planos axiales, a nivel de la sustancia blanca parietal posterior izquierda, mediante el equipo 1.5 Teslas Signa HD, General Electric, Milwaukee, WI, con un post-proceso mediante PROBE® (General Electric).

2.3.3 Evaluación cognitiva

La valoración cognitiva de cada uno de los pacientes se realizó antes del ensayo terapéutico y tras 9 meses de tratamiento.

Dado que la heterogeneidad clínica de los pacientes y la gravedad del déficit cognitivo podía conllevar dificultades en el diseño de una batería de exploraciones neuropsicológicas que pudieran aplicarse a todos los sujetos, se establecieron dos grupos de estudio:

1. Déficit cognitivo leve. Se valoró:

- Rendimiento Cognitivo Global: mediante Escalas de Wechsler: (WISC-R) (6-16 años), WAIS III (menores de 16 años) y K-ABC (mayores de 6 años).
- Lenguaje: Vocabulario por Imágenes Peabody, Subtests verbales y baterías generales.
- Funciones visuoconstructivas: Figura de Rey, VMI Beery, Subtest baterías generales.
- Memoria: Figura Rey, CAVLT-2, Dígitos Wechsler.
- Funciones ejecutivas: TRAIL B, Memoria de trabajo.
- Atención/Distractibilidad: Stroop, Toulouse-Pieron, CPT.
- Cuestionarios de conducta Achenbach. Escalas de desarrollo de Kaufmann y Llevant para niños/as menores de 4 años.

2. Déficit cognitivo grave. Se valoró en cada caso la posibilidad de administrar pruebas estandarizadas.

En 3 de nuestros pacientes, dada la gravedad de su discapacidad intelectual, se utilizó la escala de evaluación de la conducta adaptativa de Vineland (Sparrow et al, 1984). Consiste en una entrevista semi-estructurada y un cuestionario que contestan los padres, en el que se evalúan habilidades sociales y personales de los pacientes. Esta escala valora cuatro áreas: comunicación (receptiva, expresiva, escrita), actividades de la vida diaria (personal, domesticas, comunitarias), socialización (relaciones interpersonales, tiempo libre, hábitos) y habilidades motrices (gruesa, fina). La realización de esta escala tiene una duración aproximada de 20-60 minutos.

2.3.4 Determinaciones bioquímicas durante el ensayo terapéutico con L-arginina

Durante los 9 meses de tratamiento se realizó una monitorización trimestral del GA y la Cr en orina (ratio Cr/Crn). Métodos descritos en apartado 2.1.1.

2.4 Tratamiento con CEE

2.4.1 Análisis bioquímico de la pureza del producto

Previamente al estudio de incorporación de CEE en fibroblastos se estudió la pureza y composición del extracto acuoso del producto (CEE-PRO®, laboratorio muscle-tech, USA) mediante MS/MS.

2.4.2 Protocolo de tratamiento con CEE

La CEE (CEE-PRO®), laboratorio muscle-tech, USA) se administró por vía oral a la dosis de 0.4 g/kg/día repartida en 2 tomas, durante 1 año. Esta dosis se eligió teniendo en cuenta las dosis de creatina con las que se suplementan los pacientes con defectos de AGAT y GAMT que es de 0.4 g/kg/día.

2.4.3 Evaluación neurorradiológica

Se estudió el pico de Cr cerebral mediante RMS antes de iniciar el tratamiento y al final de los 12 meses del estudio. Método descrito en el apartado 2.3.2.

2.4.4 Evaluación cognitiva

La valoración neurocognitiva de cada uno de los pacientes se realizó antes del ensayo terapéutico y tras 12 meses de tratamiento. Método descrito en el apartado 2.3.3.

2.4.5 Determinaciones bioquímicas durante el ensayo terapéutico con CEE

Durante los 12 meses de tratamiento se realizó una monitorización trimestral del GA y la Cr en orina (ratio Cr/Crn). Métodos descritos en apartado 2.1.1.

2.5 Análisis estadístico

Se aplicó la prueba de Wilcoxon para estudiar diferencias entre datos pareados (comparación de la ratio Cr/Crn en voluntarios sanos 10 horas después de tomar diferentes alimentos).

Se aplicó la prueba de la t-Student (datos pareados y no pareados) para comparar los resultados obtenidos en fibroblastos de pacientes y controles en las diferentes situaciones de incubación. La significación se consideró un valor de $p < 0.05$. Estos estudios se realizaron con las versiones 11.0 y 14.0 del programa estadístico SPSS.

RESULTADOS

RESULTADOS

- **Deficiencia de transportador de creatina: prevalencia entre pacientes con retraso mental y dificultades en el cribado metabólico**
- **Espectro de la epilepsia en la deficiencia del transportador de creatina**
- **Suplementación con L-arginina en cuatro pacientes con defecto de transportador de creatina ligado al cromosoma X**
- **Respuesta a los análogos de creatina en fibroblastos y en pacientes con defecto del transportador de creatina**

Objetivo 1.- Evaluar la prevalencia del defecto de transportador de creatina cerebral en una población de varones afectos de retraso mental, autismo, epilepsia y trastorno grave de lenguaje. Estudiar la eficacia diagnóstica de las pruebas bioquímicas.

“CREATINE TRANSPORTER DEFICIENCY: PREVALENCE AMONG PATIENTS WITH MENTAL RETARDATION AND PITFALLS IN METABOLIC SCREENING”

Deficiencia de transportador de creatina: prevalencia entre pacientes con retraso mental y dificultades en el screening metabólico. *Clin Biochem* 2007;40:1328-1331.

Ángela Arias, Marc Corbella, Carmen Fons, Angela Sempere, Judit García-Villoria, Aida Ormazabal, Pilar Póo, Mercé Pineda, María Antonia Vilaseca, Jaume Campistol, Paz Briones, Teresa Pàmpols, Gajja S. Salomons, Antonia Ribes, Rafael Artuch

Estudios recientes consideran el defecto de CRTR entre una de las causas más prevalentes de retraso mental ligado al cromosoma X (Rosenberg et al, 2004). Los pacientes afectos, presentan una sintomatología neurológica inespecífica caracterizada por retraso mental, autismo, epilepsia y trastorno grave del lenguaje expresivo. La elevación de la ratio Cr/Crn en orina ha demostrado ser un buen método de cribado y de diagnóstico inicial para el defecto de CRTR, previo a la realización de estudios de confirmación enzimáticos y/o moleculares. Existen algunos factores que pueden alterar la ratio de Cr/Crn en los líquidos biológicos como la disfunción renal, la dieta rica en Cr y los trastornos del ciclo de la urea. En este estudio nos planteamos el objetivo de estudiar la prevalencia del déficit de CRTR en la población pediátrica de nuestro medio, afecta de retraso mental sin filiar; además evaluamos la influencia de una dieta rica en proteínas (principalmente alimentos con alto contenido en Cr como la carne y el

Carmen Fons Estupiñá, Universitat de Barcelona

pescado) como factor causante de la presencia de los valores falsos positivos de la ratio Cr/Crn en orina.

Creatine transporter deficiency: Prevalence among patients with mental retardation and pitfalls in metabolite screening

Angela Arias^a, Marc Corbella^b, Carmen Fons^b, Angela Sempere^b, Judit García-Villoria^a, Aida Ormazabal^b, Pilar Poo^b, Mercé Pineda^b, María Antonia Vilaseca^b, Jaume Campistol^b, Paz Briones^a, Teresa Pàmols^a, Gajja S. Salomons^c, Antonia Ribes^a, Rafael Artuch^{b,*}

^a Institut de Bioquímica Clínica. Servicio de Bioquímica y Genética Molecular. Hospital Clinic and Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain

^b Department of Clinical Biochemistry and Pediatric Neurology, Hospital Sant Joan de Déu and Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Passeig Sant Joan de Déu, 2., 08950, Esplugues, Barcelona, Spain

^c Department of Clinical Chemistry, Metabolic Unit VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

Received 27 February 2007; received in revised form 10 June 2007; accepted 2 July 2007

Available online 10 August 2007

Abstract

Objectives: To report the prevalence of creatine transporter deficiency in males with mental retardation and to study whether a protein-rich food intake might be a potential diagnostic pitfall.

Design and methods: We determined creatine/creatinine ratio in urine samples from 1600 unrelated male patients with mental retardation and/or autism. Urine creatine was analyzed by HPLC-MS/MS.

Results: Thirty-three of 1600 cases showed increased urine creatine/creatinine ratio. Four out of these thirty-three cases were definitively diagnosed with creatine transporter deficiency, while the other 29 were false positive results. Significantly higher values were observed for urine Cr/Crn ratio in healthy volunteers after a meal based on beef or oily fish as compared to eggs, pasta or salad (Wilcoxon test: $p < 0.005$).

Conclusions: False positive results may be observed in biochemical screening for creatine transporter deficiency, and they may be due to intake of meals rich in creatine prior to urine samples analysis.

© 2007 The Canadian Society of Clinical Chemists. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Cerebral creatine deficiency syndrome; Creatine; Creatinine; Guanidinoacetate; Creatine transporter deficiency

Introduction

Cerebral creatine deficiency syndromes (CCDS) can affect both synthesis and transport of creatine (Cr), causing a deficiency of Cr/phosphocreatine, mainly in brain. Three metabolic defects associated with CCDS have been identified: L-arginine:glycine amidinotransferase (AGAT; OMIM:602360) [1]; guanidinoacetate methyl transferase (GAMT, OMIM:601240) [2]; and X-linked creatine transporter (*SLC6A8* (CT), OMIM:300036) [3]. By measuring guanidinoacetate (GAA), creatine and creatine/creatinine (Cr/Crn) ratio in urine and/or plasma, it is possible to identify AGAT (low GAA and normal Cr concentrations in

plasma), GAMT (high GAA and low Cr concentrations in plasma and urine) and CT deficiencies (high Cr/Crn ratio in urine with normal GAA values in body fluids) [4]. After this first line diagnosis, which may be confirmed by cerebral creatine deficiency measured by proton magnetic resonance spectroscopy (H-MRS), definite diagnosis is made by enzymatic and/or molecular studies.

Considering the unspecific clinical presentation of CCDS, it seems important to screen for these defects in any patient with mental retardation, autism or epilepsy of unknown origin. However, there are several external factors or other metabolic defects that might influence GAA concentrations and Cr/Crn ratio in biological fluids, such as renal dysfunction, dietary intake of Cr and urea cycle disorders [5].

Dietary content of Cr might be an interfering factor in the screening of CT deficiency (the most frequent cause of CCDS)

* Corresponding author. Fax: +34 932803626.

E-mail address: rtartuch@hsjdbcn.org (R. Artuch).

since an increase in the Cr/Crn ratio is the hallmark of CT deficiency. Indeed, there are several dietary sources with high Cr content (especially fish and meat) [6] which may influence the urinary Cr/Crn. However, food intake has not been evaluated in the screening for CCDS.

In the present study we report the prevalence of CT deficiency in males with mental retardation, who were referred for a metabolic workup. Furthermore, we studied whether a protein-rich food intake might be a potential diagnostic pitfall.

Materials and methods

Patients

Over a 24-month period, we have studied urine samples from 1600 unrelated male patients with mental retardation and/or autism of unknown origin (age range 1–18 years, average 9 years). Urine was stored at -20°C until analysis. In patients presenting twice an increased urinary Cr/Crn value, an additional urine sample(s), skin biopsy (for Cr uptake studies) and/or brain H-MRS were requested.

To assess the dietary influence in Cr/Crn ratio, we collected 65 first-morning urine samples from thirteen healthy volunteers (5 samples per subject) after 10 h of fasting. Urine samples were collected during the same week after 10 h of the intake of a specific kind of meal: 1st day: vegetarian salad (100 g); 2nd day: two eggs (omelette); 3rd day: pasta (100 g); 4th day: oily fish (100 g); 5th day: beef (100 g).

Methods

Urine GAA and Cr determination was performed by HPLC-MS/MS (Waters-Micromass, Manchester, UK, model Quattro micro™ API), as previously reported [7]. Creatinine determination was assayed with the Jaffé kinetic procedure (A11A00060, ANX Diagnostic, Montpellier, France) [8].

Creatine uptake by cultured fibroblasts was measured by incubating them for 24 h in medium containing physiological and supraphysiological Cr concentration (25 μM and 500 μM , respectively), according to a previously reported procedure [3], except that Cr was measured by HPLC-MS/MS with stable isotope-labeled Cr as the internal standard [7]. Protein concentrations were measured by the classical method of Lowry.

DNA sequence analysis of SLC6A8 was performed in DNA isolated from blood or fibroblasts, as previously reported [3].

Statistical analysis: Wilcoxon test for paired data was applied to compare Cr/Crn ratio in healthy volunteers 10 h after the intake of the different meals. Statistical analyses were performed using the SPSS 11.0 program.

Results

Thirty-three of 1600 cases showed increased Cr/Crn ratio in the first urine sample (age range 1–12 years, Cr/Crn ratio range: 1.7–4.3, average: 2.7, SD: 0.71) compared with age related reference ranges established in our laboratory (Table 1). However, in a second urine sample, only 10 out of these 33

Table 1
Laboratory findings in 10 pediatric patients with mental retardation

Cases	Age (years)	1st Cr/Crn ratio	2nd Cr/Crn ratio	3rd Cr/Crn ratio	H-MRS creatine peak	Creatine uptake pmol creatine/ μg prot.	
						25 μM	500 μM
1	12	2.2	1.9	1.9	Absent	0.8	3.1
2	10	3.4	2.5	2.4	Absent	0.5	4.0
3	7	6.8	4.1	2.4	Absent	0.4	5.7
4	9	3.7	3.8	4.9	Low	1.4	5.0
5	7	3.9	4.1	1.3	Normal	24	34
6	2	2.6	4.1	0.3	Normal	34	45
7	2	1.9	1.8	n.d.	Normal	28	39
8	2	2.8	2.3	n.d.	n.d.	35	44
9	3	3.0	2.3	0.7	Normal	37	53
10	1	2.4	2.1	1.4	n.d.	25	29
	Controls	0–6 years 0.2–1.6	7–12 years 0.2–1.4			15–49	20–60

Molecular genetic analysis

Cases	Mutation type	Mutation	Deduced effect	Exon
1	Deletion	c.1222_1224delTTC	p.Phe408del	8
2	Frameshift	c.878_879delTC	p.Lys293fsX3	5
3	Deletion	c.942_944delCTT	p.Phe315del	6
4	Missense	c.1631C>T	p.Pro544Leu	12

In four of them, the diagnosis of CT deficiency was proven by impaired Cr uptake profile in cultured fibroblasts, clearly low or absent creatine peak in brain by H-MRS and the presence of pathogenic mutations in SLC6A8 gene (cases 1 to 4). Cases 1 to 3 harbored severe mutations and these were associated with the absence of creatine peak by H-MRS and low creatine uptake by fibroblasts. Conversely, case 4 presented a mild mutation associated with partially decreased creatine peak in H-MRS and the highest creatine uptake by fibroblasts incubated with 25 $\mu\text{mol/l}$ of creatine. In the other 6 cases, the increased urine Cr/Crn appeared to be a false positive result since all of them showed normal creatine uptake by fibroblasts and creatine peak by H-MRS. Increased Cr/Crn values and decreased Cr content in fibroblasts are depicted in bold.

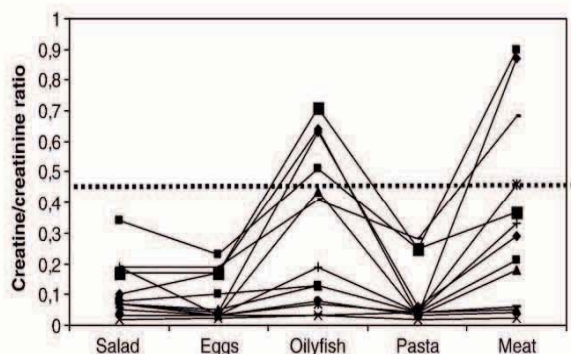


Fig. 1. First-morning urine Cr/Crn ratio values in adult volunteers after different meals and overnight fasting. The dotted line represents the upper limit of urine Cr/Crn ratio for adult controls (0.46).

cases showed increased Cr/Crn ratio, while in the other 23 the ratio normalized. Four out of these ten positive cases were definitively diagnosed with CT deficiency, including two patients that were previously published [9] (Table 1). The diagnosis was based on the impaired Cr uptake profile in fibroblasts, and/or on reduced brain Cr peak revealed by H-MRS, and confirmed at the DNA level by the presence of a pathogenic mutation in *SLC6A8* (Table 1). In the other 6 cases, Cr uptake in fibroblasts and/or H-MRS analysis showed normal results. Consequently, no genetic studies were performed. Quantification of Cr/Crn ratio in a third urine sample from 4 of these 6 false positive results finally showed normal values, whereas this third sample was not available for the other 2 individuals. However, none of our four patients who are affected with CT deficiency showed normal results in the third sample (Table 1) or in any other sample analyzed during their follow up.

Results of Cr/Crn ratio from healthy adult volunteers in the first-morning urine samples after different meals are depicted in Fig. 1. Urine samples collected after a meal based on salad, pasta or eggs showed normal Cr/Crn ratio in all cases, compared with previously established reference ranges for healthy adult controls. Conversely, 4 of 13 volunteers showed increased Cr/Crn ratio after eating both oily fish and beef. Furthermore, significantly higher results were observed for urine Cr/Crn ratio after a meal based on beef or oily fish as compared to eggs, pasta or salad (Wilcoxon test: $p < 0.005$), while no differences were observed when comparing eggs with salad or pasta, and fish with meat, respectively.

Discussion

It has been shown that CT deficiency is relatively frequent among patients with mental retardation [3,10–13]. Therefore, the inclusion of urine analysis of Cr/Crn (the hallmark of this disease) in the screening of patients with these neurological symptoms seems advisable. During a 2 year-period we have searched for Cr defects in 1600 cases with mental retardation, autism and/or epilepsy, of which 33 (2.1%) showed an increased Cr/Crn ratio in urine, suggesting a CT deficiency. However, a definite diagnosis was only established in 4 patients (0.25%), while in the other 29 cases the Cr/Crn ratio normalized in the

second or third urine sample, and/or Cr uptake in fibroblasts and H-MRS studies showed normal results. These data demonstrate a prevalence of CT deficiency of about 0.3% in males with mental retardation, which is lower from the recently reported studies, where this prevalence varied from 0.8% up to 2.7% [11–13]. Furthermore, the present study revealed false positive results in 1.8% (29 out of 1600) when only one urine sample was analyzed. The Cr/Crn ratio normalized in a second urine sample in 17 out of the 21 false positives, suggesting that repeated urine analysis should be considered before undertaking invasive studies (e.g. proton MRS of brain, Cr uptake studies in fibroblasts). Formally, it is not proven that these represent false positives since no confirmative follow up studies were performed. However, it is important to note that the 4 patients affected with CT deficiency repeatedly showed increased urinary Cr/Crn ratio, indicating that the ratio is constantly increased in these patients. The causes for these false positive results are not unraveled yet. In the present study we showed that after a high-protein intake there is an increase in the urinary Cr/Crn, resulting in false positive results in 4 out of 13 non-affected individuals (Fig. 1). Conversely, these volunteers always showed normal results after meals containing foods with low Cr followed by overnight fasting. Unfortunately, we did not have dietary questionnaires from our investigated cohort of patients and controls, although these differences between repeated measurements of urine Cr/Crn ratio in our patients might be due to variations in dietary creatine intake. Nevertheless, the establishment of reference values after a low Cr content meal, as well as the analysis of patients under the same controlled conditions, seems advisable.

Brain H-MRS is a valuable test for the detection of CCDS. However, sedation of patients with behavior disorders/mental retardation is usually required and at least in Spain it is very expensive. Therefore, this method is not appropriate for first line screening purposes. Based on our results, we suggest that after a first positive Cr/Crn ratio in urine, a second urine sample in the morning after overnight fasting should be taken (after a diet free of meat or fish the day before) for confirmation. If in this second sample the Cr/Crn ratio is also increased, a skin biopsy to study Cr uptake and brain H-MRS should be performed, followed by DNA analysis, to confirm or exclude CT deficiency. However, limitations of DNA sequence studies for CT deficiency exist, such as if no variant or mutation is detected. In this situation, it should be considered that the mutation could be missed, as at present time the entire gene is not being analyzed (e.g. promoter region) [14].

In conclusion, the present study shows a lower prevalence of CT deficiency in males with mental retardation compared with other studies. When performing urine studies, care should be taken with meals rich in Cr since they may result in a significant increase of the Cr/Crn ratio and thus may cause false positive results. Therefore, in case of an increased urinary Cr/Crn ratio, the results should be confirmed in a second sample of urine under controlled diet (morning, after overnight fasting) followed by brain H-MRS, Cr uptake studies and/or molecular analysis of the *SLC6A8* gene, before it can be concluded that the patient is affected by CT deficiency.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from FIS (PI05/1200), INERGEN and REDEMETH from Ministerio de Sanidad, Spain. G.S.S was supported by the Dutch Society for Scientific Research (ZonMW/NWO), VIDI grant number 917.56.349.

References

- [1] Item CB, Stockler-Ipsiroglu S, Stromberger C, et al. Arginine:glycine amidinotransferase deficiency: the third inborn error of creatine metabolism in humans. *Am J Hum Genet* 2001;69:1127–33.
- [2] Stöckler S, Holzbach U, Hanefeld F, et al. Creatine deficiency in the brain: a new treatable inborn error of metabolism. *Pediatr Res* 1994;36:409–13.
- [3] Salomons GS, van Dooren SJM, Verhoeven NM, et al. X-linked creatine-transporter gene (SLC6A8) defect: a new creatine-deficiency syndrome. *Am J Hum Genet* 2001;68:1497–500.
- [4] Schulze A. Creatine deficiency syndromes. *Mol Cell Biochem* 2003;244:143–50.
- [5] Arias A, Garcia-Villoria J, Ribes A. Guanidinoacetate and creatine/creatinine levels in controls and patients with urea cycle defects. *Mol Genet Metab* 2004;82:220–4.
- [6] Balsom PD, Soderlund K, Ekblom B. Creatine in humans with special reference to creatine supplementation. *Sport Med* 1994;18:268–820.
- [7] Arias A, Ormazabal A, Moreno J, et al. Methods for the diagnosis of creatine deficiency syndrome: a comparative study. *J Neurosci Methods* 2006;156:305–9.
- [8] Junge W, Wilke B, Halabi A, Klein G. Determination of reference intervals for serum creatinine, creatinine excretion and creatinine clearance with an enzymatic and a modified Jaffé method. *Clin Chim Acta* 2004;344:137–48.
- [9] Póo-Argüelles P, Arias A, Vilaseca MA, et al. X-linked CT deficiency in two patients with severe mental retardation and autism. *J Inherit Metab Dis* 2006;29:220–3.
- [10] Rosenberg EH, Almeida LS, Kleefstra T, et al. High prevalence of SLC6A8 deficiency in X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* 2004;75:97–105.
- [11] Clark AJ, Rosenberg EH, Almeida LS, et al. X-linked CT (SLC6A8) mutations in about 1% of males with mental retardation of unknown etiology. *Hum Genet* 2006;119:604–10.
- [12] Newmeyer A, Cecil KM, Schapiro M, Clark JF, Degrauw TJ. Incidence of brain CT deficiency in males with developmental delay referred for brain magnetic resonance imaging. *J Dev Behav Pediatr* 2005;26:276–82.
- [13] Lion-Francois L, Cheillan D, Pitelet G, et al. V. High frequency of creatine deficiency syndromes in patients with unexplained mental retardation. *Neurology* 2006;67:1713–4.
- [14] Jakobs C, deGrauw TJ, Kleefstra T, Schwartz CE, Salomons GS. Functional characterization of missense variants in the creatine transporter gene (SLC6A8): improved diagnostic application. *Hum Mutat* 2007;28:890–6.

Síntesis de resultados

- De los 1600 pacientes estudiados, 33 mostraron un aumento de la ratio Cr/Crn en la primera orina de la mañana (edad: 1-12 años, rango de la ratio Cr/Crn: 1.7-4.3, media: 2.7, DT: 0.71), comparándolos con los valores de referencia establecidos en nuestro laboratorio para varones de la misma edad. El estudio de una nueva muestra de orina en estos pacientes, mostró una elevación de la ratio Cr/Crn en orina en 10 pacientes.
- La concentración de Cr en la RMS cerebral y el estudio de incorporación de Cr en fibroblastos en los 10 casos con ratio anormalmente elevada, solo fueron positivos en 4 casos, en los cuales posteriormente se confirmó una mutación patogénica en el gen SLC6A8.
- En análisis posteriores de orina, en 6 pacientes con una ratio elevada inicialmente pero sin confirmar el defecto cerebral de Cr, esta se normalizó, al contrario de lo observado en los pacientes con diagnóstico confirmado de defecto de CRTR en los que la ratio Cr/Crn siempre persistió elevada.
- La ratio Cr/Crn en orina de voluntarios adultos sanos tras haber consumido ensalada, pasta y huevos la noche anterior a la recogida de la muestra de orina mostró valores normales comparándola con valores de referencia de adultos sanos. En cambio, la ratio Cr/Crn en orina mostró valores anormalmente elevados en 4/13 voluntarios tras el consumo de pescado azul y carne.

- La elevación de la ratio Cr/Crn en orina fue estadísticamente significativa comparando los valores tras ingesta de carne y pescado azul respecto la ingesta previa de huevos, pasta y ensalada (prueba de Wilcoxon: $p < 0.005$). No se observaron diferencias significativas al comparar la ratio Cr/Crn en orina tras ingesta de huevos con ensalada o pasta así como carne con pescado azul.

Objetivo 2.- Evaluar las características clínicas de la epilepsia así como sus mecanismos fisiopatológicos y correlacionar la gravedad de esta con el tipo de mutación.

“EPILEPSY SPECTRUM IN CEREBRAL CREATINE TRANSPORTER DEFICIENCY”

Espectro de la epilepsia en la deficiencia del transportador de creatina cerebral.

Epilepsia 2009;50:2168-2170.

Carmen Fons, Ángela Sempere, Francesc X. Sanmartí, Ángela Arias, Pilar Póo, Mercedes Pineda, Antonia Ribes, Begoña Merinero, Maria A. Vilaseca, Gajja S. Salomons, Rafael Artuch, Jaume Campistol.

La epilepsia es un síntoma inespecífico que se presenta durante el curso de numerosas enfermedades neurometabólicas. En el caso de los DCC, se ha descrito que los compuestos guanidino (la Cr y el GA), tienen potencial epileptógeno ya que actúan como agonistas parciales del receptor de GABA_A (D’Hooge et al, 1992; De Deyn et al, 1990). En el defecto de CRTR, el acúmulo de Cr en el espacio sináptico debido a un déficit de su transporte, provoca una estimulación prolongada de estos receptores postsinápticos y se genera un bloqueo de las respuestas inhibitorias GABAérgicas. Dado que la epilepsia es un síntoma frecuente en pacientes con defecto de CRTR (aproximadamente se presenta en un 50 % de casos (Salomons et al, 2003)), nos planteamos los objetivos de describir detalladamente las características de la epilepsia en nuestra serie de pacientes para así poder mejorar su manejo clínico y en segundo lugar, investigar si existe una correlación entre la gravedad de la clínica neurológica y de la epilepsia y el pico de creatina en la RMS y/o el tipo de mutación.



GRAY MATTERS

the general capacity of health-care systems will go a long way in reducing stigma in epilepsy and the treatment gap in SSA.

DISCLOSURE

Conflict of interest: I confirm that I have read the Journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines.

The author has no conflict of interest to disclose.

Alfred K. Njamnshi

aknjamnshi@yahoo.co.uk

Consultant Neurologist & Clinical Neurophysiologist,
Head, Neurology Department, Central Hospital Yaoundé,
Cameroon; and National Focal Person for Epilepsy,
Ministry of Public Cameroon

REFERENCES

- Adamolekun B, Mielke J, Ball D, Mundanda T. (2000) An evaluation of the management of epilepsy by primary health care nurses in Chitungwiza, Zimbabwe. *Epilepsy Res* 39:177–181.
- African Declaration on Epilepsy. (2001) *Afr J Neurol Sci* 20. [Available at <http://www.ajns.paans.org>].
- Akinyemi K, Yepnjo F, Njamnshi AK. (2008) Neuroscience in Africa: raising the next generation and changing attitudes towards epilepsy: IBRO brain campaign funds Pre-PAANS congress 2008, Yaounde, Cameroon. Available at http://www.braincampaign.org/Pub/Pub_Main_Display.asp?LC_Docs_ID=3740 (accessed December 5, 2008).
- Birbeck GL. (2008) The health care workforce for epilepsy in resource-poor settings: what will work? What is realistic? *Epilepsia* 49:1642–1643.
- Dongmo L, Mbonda E, Njamnshi AK, Ndong E, Ndo D. (2000) Bien Soigner l'Épilepsie: A l'usage des personnels médicaux et paramédicaux. Séminaire de prise en charge des épileptiques. Bafia, 9–13 Octobre 2000 (*Monographie*).
- Dongmo L, Echouffo B, Njamnshi AK, Sini V, Pepouomi MN, Kamdem P. (2003) Difficulties faced in the management of epilepsy in rural Cameroon: the case of Mbangassina locality. *Afr J Neurol Sci* 22. [Available at: <http://www.ajns.paans.org>] (Accessed December 5, 2008).
- Kendall-Taylor N, Muba C, Rimba K, Newton C. (2008) Traditional healers and epilepsy treatment on the Kenyan coast. *Epilepsia* 49:1638–1639.
- Kengne A, Fezeu L, Awah P, Sobngwi E, Dongmo S, Mbanya JC. (2008) Nurse-led care for epilepsy at primary level in a rural health district in Cameroon. *Epilepsia* 49:1639–1642.
- Njamnshi AK, Dongmo L, Sini V, Echouffo B, Pepouomi MN, Kamdem P, Ndo D, Atchou G. (2005) Epilepsy in rural Cameroon: the alarming prevalence rates in the Mbam valley. *J Neurol Sci* 238(suppl 1):S136.
- Njamnshi A, Bella Hiag A, Mbanya J-C. (2006) From research to policy: the development of a national diabetes programme in Cameroon. *Diabetes Voice* 51:18–21.
- Njamnshi AK, Angwafor SA, Baumann F, Angwafo F III, Jallon P, Muna WFT. (2008a) Knowledge, attitudes and practice of Cameroonian medical students and graduating physicians towards epilepsy. *Epilepsia*, in press.
- Njamnshi AK, Angwafor SA, Jallon P, Muna WFT. (2008b) Secondary school students' knowledge, attitudes and practice towards epilepsy in the Batibo Health District—Cameroon. *Epilepsia* doi: 10.1111/j.1528-1167.2008.01809.x.
- Njamnshi AK, Angwafor SA, Tabah EN, Jallon P, Muna WFT. (2009) General public knowledge, attitudes and practice towards epilepsy in the Batibo Health District, Cameroon. *Epilepsy Behav* 14:83–88.

Epilepsy spectrum in cerebral creatine transporter deficiency

To the Editors:

In the last decade, a novel group of inborn errors leading to cerebral creatine (Cr) deficiency has been described. They are characterized by absence or decrease of Cr in the brain measured by in vivo proton magnetic resonance spectroscopy (¹H-MRS) (Schulze, 2003).

Cerebral creatine transport deficiency (CRTR-D) is the most prevalent of these, and its biochemical hallmark is an increased urinary Cr-to-creatinine ratio. Final diagnosis is achieved by the study of CRTR activity in fibroblasts (Cr uptake) and by the mutational analysis of the *SLC6A8* gene.

Males with *SLC6A8* mutations develop mental retardation, autistic features, language delay, and epilepsy. Epilepsy of variable severity affects about 50% of patients with CRTR-D (Cecil et al., 2001; Salomons et al., 2003; Anselm et al., 2006; Mancardi et al., 2007).

Guanidino compounds such as Cr (α -N-methylguanidino acetic acid) and guanidinoacetate have epileptogenic potential (De Deyn et al., 1991; D'Hooge et al., 1992), acting as a partial γ -aminobutyric acid (GABA)_A receptor agonist. This may generate a prolonged stimulation of postsynaptic GABA_A receptor, and interference in inhibitory GABAergic circuits.

We characterized epilepsy severity and treatment response, and investigated the possible relationships between *SLC6A8* mutations and/or Cr uptake in fibroblasts with epilepsy severity in seven patients with CRTR-D. We selected all the patients diagnosed with CRTR-D who were followed up in the Hospital Sant Joan de Déu Pediatric-Neurology Department in the last 6 years. Five cases were unrelated and patients 5 and 6 were brothers. We retrospectively reviewed clinical data, seizure types (classified according to the International League Against Epilepsy, 1981), video-EEG (electroencephalography), treatment, seizure control, episodes of status epilepticus, seizure outcome, metabolic examinations in blood and urine, Cr signal in brain ¹H-MRS, Cr uptake in fibroblasts, and *SLC6A8* mutational analysis. Results are detailed in Table 1.

Although no specific EEG pattern or seizure type has been reported so far in CRTR-D, our patients presented slow background activity for their ages in interictal video-EEG, without any specific paroxysmal activity.

No correlation was observed between residual Cr uptake in fibroblasts or the type of mutation with the occurrence of seizures or with their pattern. Overall, no genotype-phenotype correlations could be demonstrated in this small series. Although one patient (3), who presented the highest residual activity in fibroblasts and a missense mutation, had milder clinical manifestations and no epilepsy, refractory seizures had been observed in previously



Table 1. Summary of clinical, electroencephalographic, biochemical, neuroradiologic, and molecular data

Data	Patient 1 (*)	Patient 2 (*)	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6	Patient 7
Age (years)	17	14	10	11	11	27	40
Neurological symptoms	Severe MR Speech delay Autistic behaviour Epilepsy	Severe MR Speech delay Autistic behaviour Epilepsy	Moderate MR Severe speech delay Autistic behaviour Epilepsy	Severe MR Speech delay Autistic behaviour Epilepsy	Severe MR Speech delay Autistic behaviour Epilepsy	Severe MR Speech delay Autistic behaviour Epilepsy	Severe MR Speech delay Autistic behaviour Epilepsy
Family history of epilepsy	Positive (1) Typical	Negative	Negative (3) Typical	Negative (3) Typical	Negative	Positive (Multiple) Atypical	Positive (1) Typical; (1) atypical
Febrile seizures (number)	40 m	-	-	24 m	-	17 m	23 m
Age (months)	8	9	-	24 m	2	2	4
Non-febrile seizure onset (years)	G T-C	Right hemiconic G T-C	-	(2) Right hemiconic (3) P S G	G T-C	G T-C	G T-C
Seizure Type (ILAE)	Slightly low for age	Low for age	Normal	Low for age	Low for age	Right or left hemiconic	Right hemiconic
Video-EEG	Alpha 8 HZ (17y) No	Theta 7 Hz (14y) No	Normal	Theta 5 Hz (11y) No	Theta 5 Hz Frontal during sleep	Unknown	Unknown
Background	Seizure free from 4 years	Seizure free from 3 years	-	Refractory epilepsy VPA (no response) CBZ + LEV	Seizure free from 6 y VPA	Seizure free from 24 y VPA	Seizure free from 36 y CBZ
Interictal abnormalities	VPA	3 years CBZ	-	(+) G T-C with VPA treatment	-	(+) G T-C Febrile and non-febrile without AED	(+) G T-C Febrile and non-febrile without AED
Slow activity	(+) G T-C after VPA suppression	-	-	-	-	-	-
Paroxysmal activity	(+) Negative	(+) Negative	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Seizure control (years)	(+) Negative	(+) Negative	(+) Negative	(+) Negative	N/A	N/A	N/A
Current treatment (AED)	Low-near absent	Absent	Low	Low-near absent	Low-near absent	Low-near absent	Low-near absent
Status epilepticus	56	80	120	69	87	50	64
Urine GA (mmol/mol creatinine)	RV: 26-167	3.4	4.6	3.7	3.2	2.6	3.0
RV: 0.05-1.9	2.5	2.6	13.3	6	4.8	7.8	Not done
Creatinine uptake in fibroblasts	c.1222_1224delTTC p.Phe408G	c.878_879delITC p.Lys293Ile	c.1631C>T p.Pro544Leu	c.942_944delICTT p.Phe315del	c.462G>A p.W154X	c.1078-1080 del TTC p.Phe360del	c.1078-1080 del TTC p.Phe360del
RV: 36 ± 5.1							
SLC6A8 mutational analysis							
Effect on protein							

MR, mental retardation; N/A, not applicable; RV, reference value; AED, antiepileptic drug; G T-C, generalized tonic-clonic; P S G, partial secondarily generalized; VPA, valproate; CBZ, carbamazepine.
*Reprinted with permission from Póo et al., 2006.



GRAY MATTERS

published report of one patient with the same mutation (Mancardi et al., 2007).

The level of brain Cr by H-MRS was not associated with the occurrence or severity of epilepsy. We did not find structural abnormalities in brain magnetic resonance imaging (MRI) of CRTR-D patients, although nonspecific white matter lesions related to prenatal hypoxic encephalopathy had been reported (Mancini et al., 2005). No additional reports of CRTR-D patients with hypoxic events or specific focal lesions in brain MRI have been published. Despite lack of effective treatment for patients with CRTR-D (Fons et al., 2008), epilepsy can usually be controlled with classical antiepileptic drugs (AEDs) in monotherapy (carbamazepine or valproate), as also observed in our patients.

In conclusion, patients with mental retardation, autistic behavior, severe language delay, and mild or severe epilepsy who have presented episodes of status epilepticus (SE) or recurrent febrile seizures (FS) should be tested for cerebral creatine deficiency syndromes. We observed a high risk of developing SE in patients not treated with AEDs or when treatment is discontinued, despite normal EEG and long-term good seizure control. Therefore, we recommend pharmacologic treatment of patients with CRTR-D after a first seizure in order to protect them from occurrence or status epilepticus. Further studies in larger series are needed to better characterize the clinical phenotype and epilepsy spectrum.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Ministerio de Sanidad (FIS PI05/2080 and FIS PI05/1200) and Caixa Girona. G.S.S. is supported by the Dutch Society for Scientific Research (ZonMW/NWO), VIDI grant number 917.56.349.

DISCLOSURE

We confirm that we have read the journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines.

None of the authors has any conflict of interest to disclose.

Carmen Fons¹
cfons@hsjdbcn.org¹
Ángela Sempere¹
Francesc X. Sanmartí¹
Ángela Arias²
Pilar Póo¹
Mercedes Pineda¹
Antonia Ribes²
Begoña Merinero³
María A. Vilaseca⁴
Gajja S. Salomons⁵
Rafael Artuch⁴
Jaume Campistol¹

¹Department of Child Neurology, Epilepsy Unit, University Children's Hospital Sant Joan de Déu, Centre for Research on Rare Diseases (CIBERER), Barcelona, Spain

²Division of Inborn Errors of Metabolism, Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Hospital Clínic, CIBERER, Barcelona, Spain

³Department of Molecular Biology 'Severo Ochoa,' Universidad Autónoma, Madrid, Spain

⁴Department of Clinical Biochemistry, Hospital Universitari Sant Joan de Déu, CIBERER, Barcelona, Spain

⁵Department of Clinical Chemistry, Metabolic Unit, VU University Medical Center, Amsterdam, the Netherlands

REFERENCES

- Anselm IM, Alkuraya FS, Salomons GS, Jakobs C, Fulton AB, Mazumdar M, Rivkin M, Frye R, Young T, Marsden D. (2006) X-linked creatine transporter defect: a report on two unrelated boys with a severe clinical phenotype. *J Inher Metab Dis* 29:214–219.
- Cecil KM, Salomons GS, Ball WS Jr, Wong B, Chuck G, Verhoeven NM, Jakobs C, DeGraw TJ. (2001) Irreversible brain creatine deficiency with elevated serum and urine creatine: a creatine transporter defect?. *Ann Neurol* 49:401–404.
- De Deyn PP, Marescau B, Macdonald RL. (1991) Guanidino compounds that are increased in Hyperargininemia inhibit GABA and glycine responses on mouse neurons in cell culture. *Epilepsy Res* 8:134–141.
- D'Hooge R, Pei YQ, Marescau B, De Deyn PP. (1992) Convulsive action and toxicity of uremic guanidino compounds: behavioral assessment and relation to brain concentration in adult mice. *J Neurol Sci* 112:96–105.
- Fons C, Sempere A, Arias A, López-Sala A, Póo P, Pineda M, Mas A, Vilaseca MA, Salomons GS, Ribes A, Artuch R, Campistol J. (2008) Arginine supplementation in four patients with X-linked creatine transporter defect. *J Inher Metab Dis* 31:724–728.
- Mancardi MM, Canuso U, Schiaffino MC, Baglietto MG, Rossi A, Battaglia FM, Salomons GS, Jakobs C, Zara F, Veneselli E, Gaggero R. (2007) Severe epilepsy in X-linked creatine transporter defect (CRTR-D). *Epilepsia* 48:1211–1213.
- Mancini GM, Catsman-Berrevoets CE, de Coo IF, Aarsen FK, Kamphoven JH, Huijman JG, Duran M, van der Knaap MS, Jakobs C, Salomons GS. (2005) 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* 30:288–295.
- Póo P, Arias A, Vilaseca MA, Ribes A, Artuch R, Sans A, Moreno A, Jakobs C, Salomons GS. (2006) X-linked creatine transporter deficiency in two patients with severe mental retardation and autism. *J Inher Metab Dis* 29:220–223.
- Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. From the Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. (1981) *Epilepsia* 22:489–501.
- Salomons GS, van Dooren SJM, Verhoeven NM, Marsden D, Schwartz C, Cecil KM, DeGraw TJ, Jakobs C. (2003) X-Linked creatine transporter defect: an overview. *J Inher Metab Dis* 26:309–318.
- Schulze A. (2003) Creatine deficiency syndromes. *Mol Cell Biochem* 244:143–150.

Síntesis de resultados

- Un 85 % de pacientes de nuestra serie presentaban epilepsia, con una edad media al debut de las crisis afebriles de 4.5 años (rango: 2-9 años).
- Observamos el antecedente de convulsiones febriles en un porcentaje alto de pacientes que posteriormente desarrollaron epilepsia. La edad media de debut de las convulsiones febriles fue de 26 meses (rango: 17-40 meses).
- La morfología de las crisis era muy inespecífica, pudiendo presentar tanto crisis generalizadas como focales.
- No observamos ninguna actividad paroxística específica del déficit de CRTR, en el vídeo-EEG intercrítico, aunque todos los pacientes presentaban una actividad de base lenta para su edad.
- La epilepsia en estos pacientes generalmente respondió bien al tratamiento con fármacos antiepilépticos clásicos y en monoterapia.
- Destacamos la elevada frecuencia de estados de mal epiléptico de tipo generalizado en nuestra serie de pacientes (4/7), cuando aún no recibían tratamiento antiepiléptico.

- Los pacientes que presentaron estado de mal epiléptico y epilepsia refractaria presentaban deleciones en el gen *SLC6A8*.
- Característicamente, uno de nuestros pacientes (paciente 3) el cual presentó la mayor actividad residual del CRTR y una mutación missense en el gen *SLC6A8*, mostró unas manifestaciones clínicas leves y hasta el momento no ha desarrollado epilepsia.
- No observamos la existencia de correlación entre el nivel del pico de Cr cerebral en la RMS y/o la actividad residual de transporte de Cr en fibroblastos con el patrón y/o gravedad de la epilepsia.

Objetivo 3.- Analizar la eficacia de la administración de precursores de la síntesis de creatina (L-arginina) tanto a nivel clínico, neurorradiológico como cognitivo.

“L-ARGININE SUPPLEMENTATION IN FOUR PATIENTS WITH X-LINKED CREATINE TRANSPORTER DEFECT”

Suplementación con L-arginina en cuatro pacientes con defecto de transportador de creatina ligado a X. *J Inherit Metab Dis* 2008;31:724-728

Carmen Fons, Ángela Sempere, Ángela Arias, Pilar Póo, Mercedes Pineda, Anna López-Sala, Anna Mas, Maria A. Vilaseca, Gajja S. Salomons, Antonia Ribes, Rafael Artuch, Jaume Campistol.

El déficit de CRTR es una enfermedad neurometabólica caracterizada por un déficit de Cr en el cerebro y por asociar unos síntomas clínicos graves. A diferencia de los defectos de síntesis de Cr (déficit de AGAT y GAMT) que responden al tratamiento con CM, en el caso del defecto de CRTR no existe un tratamiento sustitutivo eficaz. Respecto a la expresión y función de los enzimas de síntesis y transporte de Cr en el cerebro, se ha reportado que los enzimas de síntesis AGAT y GAMT y el transportador CRTR se expresan de forma mínima en las neuronas y la glía, mientras que el CRTR no se expresa en astrocitos y particularmente en aquellos que contactan con las células del endotelio capilar (BHE) (Braissant et al, 2001, 2007). Estos hallazgos apoyan la idea de que bajo condiciones normales, en el cerebro adulto la Cr es sintetizada principalmente por las células del SNC a partir de precursores (L-arginina y glicina). Además, estudios *in vitro* en linfoblastos deficientes en CRTR muestran que la síntesis de Cr se estimula aumentando la disponibilidad de estos precursores. Nuestro objetivo fue valorar *in vivo*, la eficacia del tratamiento con L-arginina en una serie de pacientes afectados de déficit de CRTR.

Arginine supplementation in four patients with X-linked creatine transporter defect

C. Fons · A. Sempere · A. Arias · A. López-Sala ·
P. Póo · M. Pineda · A. Mas · M. A. Vilaseca ·
G. S. Salomons · A. Ribes · R. Artuch · J. Campistol

Received: 22 February 2008 / Submitted in revised form: 8 June 2008 / Accepted: 23 June 2008 / Published online: 16 October 2008
© SSIEM and Springer 2008

Summary

Background Treatment with oral creatine monohydrate has not shown efficacy in patients with creatine transporter deficiency (CRTR-D). Another therapeutic option proposed is L-arginine, the substrate for the enzyme L-arginine:glycine amidinotransferase (AGAT). We evaluate clinical characteristics and cerebral creatine replenishment after L-arginine therapy in four patients with CRTR-D.

Patients and methods Four boys with genetically confirmed diagnosis of CRTR-D (ages 9–16 years) were supplemented with L-arginine (0.4 g/kg per day) for a period of 9 months. Treatment efficacy was evaluated by clinical and neuropsychological assessment and determination of creatine signals by brain

proton magnetic resonance spectroscopy (¹H-MRS). **Results** Epileptic seizures remained well controlled with antiepileptic drugs in three cases, both before and after L-arginine supplementation. Vineland Adaptive Behaviour Scale did not show any change in communication, daily living skills, socialization or motor skills, and a lack of improvement in brain ¹H-MRS follow-up was observed. L-Arginine was discontinued at the end of the observation period.

Conclusions Nine months of L-arginine supplementation did not show effectiveness in the four patients affected with CRTR-D in this protocol.

Abbreviations

AGAT	L-arginine:glycine amidinotransferase
Cr	creatine
CRTR	creatine transporter
GA	guanidinoacetate
GAMT	guanidinoacetate methyltransferase
¹ H-MRS	proton magnetic resonance spectroscopy

Communicating editor: Sylvia Stockler-Ipsiroglu

Competing interests: None declared

References to electronic databases: L-Arginine:glycine amidinotransferase deficiency: OMIM 602360. Guanidinoacetate methyltransferase deficiency: OMIM 601240. Creatine transporter deficiency: OMIM: 300036.

C. Fons · A. Sempere · A. López-Sala · P. Póo · M. Pineda ·
J. Campistol
Department of Child Neurology,
Hospital Universitari Sant Joan de Déu,
Centre for Research on Rare Diseases (CIBERER),
Barcelona, Spain

A. Mas
Department of Pharmacy,
Hospital Universitari Sant Joan de Déu,
Barcelona, Spain

M. A. Vilaseca · R. Artuch
Department of Clinical Biochemistry,
Hospital Universitari Sant Joan de Déu, CIBERER,
Barcelona, Spain

A. Arias · A. Ribes
Division of Inborn Errors of Metabolism,
Department of Biochemistry and Molecular Genetics,
Hospital Clinic, CIBERER,
Barcelona, Spain

G. S. Salomons
Department of Clinical Chemistry, Metabolic Unit,
VU University Medical Center,
Amsterdam, The Netherlands

C. Fons (✉)
Department of Child Neurology,
Hospital Sant Joan de Déu Passeig Sant Joan de Déu,
2, 08950 Esplugues, Barcelona, Spain
e-mail: cfons@hsjdbcn.org

Introduction

Cerebral creatine (Cr) deficiency syndromes can be caused by synthesis defects, including L-arginine:glycine amidinotransferase deficiency (AGAT-D; OMIM 602360) and guanidinoacetate methyltransferase deficiency (GAMT-D; OMIM 601240), and creatine transporter deficiency (CRTR-D; OMIM: 300036) and lead to a complete absence, or a great decrease of creatine within the brain, measured by brain proton magnetic resonance spectroscopy ($^1\text{H-MRS}$) (Stromberger et al 2003). Creatine biosynthesis defects may benefit from oral creatine supplementation, as previously reported by Stöckler et al (1994, 2007) and Schulze (2003). In contrast to synthesis defects, creatine monohydrate supplementation has not shown any change in the creatine peak in $^1\text{H-MRS}$ or clinical improvement in the case of CRTR-D (Schulze 2003; Póo-Argüelles et al 2006). Because of this lack of response, other therapeutic strategies have been proposed, such as L-arginine and L-arginine plus glycine, with an observed increase in intracellular concentration of creatine in lymphoblasts lacking transporter (Leuzzi et al 2008). To the best of our knowledge, no studies concerning the evaluation of L-arginine treatment in CRTR-deficient patients have previously been reported.

The rationale for this treatment is that L-arginine, a substrate for the enzyme AGAT, would increase cerebral creatine availability by enhancing endogenous cerebral creatine biosynthesis. *In situ* hybridization studies in rat brain have revealed a ubiquitous neuronal and glial expression of AGAT and GAMT, whereas CRTR is present in neurons and oligodendrocytes but not in astrocytes, suggesting that the creatine machinery is also present in brain of patients affected with a creatine transporter defect and, moreover, that all cells in brain might synthesize creatine from L-arginine (Braissant et al 2001).

Here we describe the treatment results in four paediatric patients diagnosed with CRTR-D, who were included in a 9-month trial with 400 mg/kg per day of L-arginine. Our aim was to restore the cerebral creatine concentrations of these patients, and thereby to improve the clinical outcome.

Subjects and methods

Patients

The subjects were four boys affected with genetically confirmed CRTR-D. Clinical data, video-EEG features, metabolic studies, creatine peak in brain $^1\text{H-MRS}$,

creatine uptake in fibroblasts and *SLC6A8* mutational analysis are summarized in Table 1.

Design

L-Arginine (L-arginine powder, SHS Nutricia, Madrid, Spain) was orally supplemented (0.4 g/kg, twice daily) for 9 months. Doses were chosen on the basis of the amount of arginine supplemented in patients with urea cycle disorders and also considering that creatine supplementation for AGAT- and GAMT-deficient patients is about 400 mg/kg per day. Patients 1 and 2 had been treated previously with creatine monohydrate, which was stopped after a 12-month period owing to a lack of response (Póo-Argüelles et al 2006).

The following were studied twice (before and after 9 months of treatment): physical examination including weight; seizure control; video-EEG assessment, neuropsychological evaluation using the Weschler Intelligence Scale for Children – Revised (WISC-R) in patient 3 who presented the mild phenotype and Vineland Adaptive Behaviour Scale (VABS) in the other 3 patients with severe handicaps (all were assessed by the same paediatric neuropsychologist); urinary guanidinoacetate (GA) and creatine/creatinine ratio and brain creatine peak (ppm) were also determined.

Informed consent was obtained from the patients' parents. The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital San Joan de Déu and samples from patients and controls were obtained in accordance with the Helsinki Declaration of 1964, as revised in 2001.

Methods

Brain creatine peak was measured by $^1\text{H-MRS}$, as previously reported (Rosenberg et al 2007). Biochemical analysis of first-morning urine GA and creatine/creatinine ratio was performed by liquid chromatography-mass spectrometry with isotopic dilution following previously reported procedures (Arias et al 2006). Creatine transporter activity in fibroblasts and molecular analysis of the *SLC6A8* gene were analysed as previously reported (Salomons et al 2001).

Results

L-Arginine administration was well tolerated by all four patients and did not cause noticeable adverse effects. All of them reported compliance with the treatment until the end of the 9-month study.

Table 1 Summary of clinical, biochemical, neuroradiological and molecular data in four patients diagnosed with CRTR-D

Data	Patient 1 ^a		Patient 2 ^a		Patient 3		Patient 4	
Age (years)	16		13		9		10	
Neurological symptoms at onset	Developmental and language delay, autistic behaviour		Developmental and severe language delay, autistic behaviour		Expressive language delay, hypotonia		Developmental and severe language delay, autistic behaviour	
Age at onset (months)	12		30		30		21	
Epilepsy type	Generalized		Complex partial		No		Generalized	
Age at onset (years)	8 years 5 months		8 years 10 months				3 years	
Interictal video-EEG background	Frontal spikes		Left hemisphere slow activity				Left hemisphere slow activity	
Previous creatine treatment	(+) No response		(+) No response		(-)		(-)	
¹ H-MRS (creatine peak)	Low-near absence		Absence		Low		Low-near absence	
Urine GA (mmol/mol creatinine). RV: 26–167	56		80		120		69	
Creatine/creatinine. RV: 0.05–1.9	2.9		3.4		4.6		3.7	
Creatine uptake in fibroblasts (% compared controls). RV: 36±5.1	2.5		2.6		13.3		6	
<i>SLC6A8</i> mutational analysis	c.1222_1224delITTC		c.878_879delITC		c.1631C>T		c.942_944delICTT	
Effect on protein	p.Phe408del		p.Lys293fsx3		p.Pro544Leu		p.Phe315del	
Neurological status at present	Severe MR, receptive and expressive language disorder, autistic behaviour, abnormal gross and fine motor function. Well-controlled epilepsy		Severe MR, receptive and expressive language disorder, autistic behaviour. Well-controlled epilepsy		Mild MR, expressive language disorder, mild central hypotonia, normal gross and fine motor function		Severe MR, receptive and expressive language disorder, autistic behaviour. Intractable epilepsy	
	Before treatment	After treatment	Before treatment	After treatment	Before treatment	After treatment	Before treatment	After treatment
Urinary GA (mmol/mol creatinine). RV: 26–167	34	66	22	108	117	149	50	105
Urinary creatine/creatinine. RV: 0.05–1.9	2.1	2.5	1.9	3.4	4.3	4.7	5.9	5.4

MR, mental retardation; GA: guanidinoacetate; RV: reference values

^aP60-Argüelles et al (2006).

In terms of clinical assessment, epileptic seizures occurred in 3 out of 4 cases and were well controlled with antiepileptic drugs. L-Arginine supplementation did not have any adverse effects on this control of seizures. We did not observe any significant improvement in VABS (communication, daily living skills, socialization and motor skills) and WISC-R (patient 3) after 9 months of L-arginine supplementation. No changes in creatine peak in brain ¹H-MRS follow-up were observed when comparing baseline conditions with those after 9 months of L-arginine supplementation.

Results of the measurement of GA and creatine/creatinine ratio in urine are shown in Table 1. No reduction in creatine/creatinine ratio was observed

although GA in urine increased in all of the patients after 9 months of supplementation (see Fig. 1). No association was observed among severity of mutations and clinical response to treatment.

Owing to the lack of clinical improvement and absence of changes in brain ¹H-MRS creatine concentrations, L-arginine treatment was discontinued at the end of the observation period.

Discussion

Creatine and creatine phosphate play essential roles in the storage and transmission of phosphate-bound

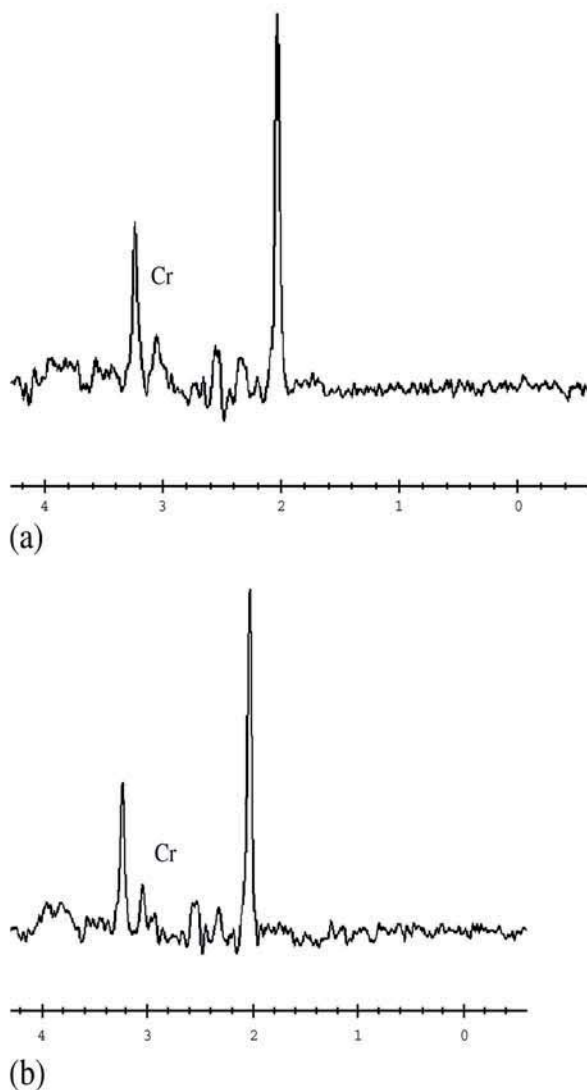


Fig. 1 *In vivo* brain ^1H -MRS with spin echo pulse sequences of long TE (PRESS 1500/135) in a patient with CRTR-D (case 4). No changes in creatine peak (ppm) (a) pre-treatment and (b) after 9 months of L-arginine treatment

energy. Humans maintain their daily creatine pool (1–2 g creatine/day) partly from non-vegetarian nutritional intake, and the remainder from kidney, liver and pancreatic biosynthesis, which comprises two reactions catalysed by the enzymes AGAT and GAMT (Crim et al 1975; Wyss and Kaddurah-Daouk 2000). Cellular creatine uptake is mediated by the CRTR transporter, which contains 12 transmembrane-spanning domains. This transporter is of fundamental importance for creatine homeostasis in tissues with very limited biosynthesis, such as muscle and brain (Stöckler et al 2007).

The creatine transporter gene (*SLC6A8/CTI/CRTR*) is mapped to chromosome Xq28 (Gregor et al 1995), is a member of the Na^+/Cl^- dependent neurotransmitter transporter family, and is highly expressed in skeletal muscle and kidney and somewhat less so in brain (Nash et al 1994). The main clinical

features of CRTR-D are mental retardation, language delay, epilepsy and autistic behaviour (Kleefstra et al 2005; Campistol et al 2007; deGrauw et al 2003). Another hallmark of the disease is the reduction or absence of creatine signal in ^1H -MRS. Definitive diagnosis is achieved by quantification of the urine creatine/creatinine ratio, fibroblast creatine uptake assay and identification of mutations in the *SLC6A8* gene (Rosenberg et al 2007; Salomons et al 2003).

In the present study, after 9 months of treatment we did not observe any improvement in communication, daily living skills, socialization, or motor skills in our patients with CRTR-D.

It is important to note that the study of patients with mental retardation requires an extensive neurological and neuropsychological assessment. In patient 3, we applied the WISC-R test because he presented a less severe language involvement compared with the other patients, and he was able to cooperate. In the rest of patients, the lack of cooperation, absence of expressive language and autistic behaviour prevented us from evaluating them with WISC-R. In accordance with our hospital protocol for severely retarded patients, we assessed them with VABS.

The lack of clinical improvement is related to the fact that the cerebral creatine concentrations were not restored by L-arginine supplementation. Moreover the diverse treatment results in both neonates and adult patients affected with AGAT or GAMT deficiency (Schulze 2003; Schulze et al 2006) suggest that creatine is essential at early stages during brain development, which may be related to creatine's proposed role in neurotransmission (Almeida et al 2006). The absence or severe reduction of cerebral creatine levels during brain development and in the first years of life may result in (partly) irreversible damage. Consequently, there might be a lack of clinical improvement if the cerebral creatine pool is restored by either supplementation of creatine's biosynthetic precursors or by creatine analogues when treatment is initiated at advanced age.

We could not evaluate the efficacy of L-arginine as monotherapy in epilepsy control since, for ethical reasons, we could not stop antiepileptic drug treatment in three of our patients affected by epilepsy. In video-EEG, no changes in background activity were observed. Finally, no changes in brain ^1H -MRS creatine peak were detected after the observational period. Several mechanisms might be invoked to explain the lack of increase of brain creatine peak after treatment. L-Arginine transport through the blood–brain barrier was not studied, but the amount of L-arginine that reaches CSF owing to transport and anti-transport regulation might not be sufficient to significantly

improve cerebral creatine biosynthesis. Furthermore, AGAT expression in brain could be too low to significantly increase the amount of cerebral creatine even after L-arginine (and glycine) supplementation. Alternatively, it could be that the creatine transporter is also needed for the biosynthesis of creatine in brain; recent data suggest that AGAT and GAMT are rarely co-expressed in one cell and the creatine transporter may be needed for GA uptake from AGAT- to GAMT-expressing cells (Braissant and Henry 2008). Thus even if GA is formed, it may not be available for further creatine metabolism since GA may not enter the cells that express GAMT.

Biochemically, urinary GA values increased after 9 months of treatment, lending support to the idea that peripheral endogenous synthesis is stimulated by L-arginine. Recently, in 2008, Leuzzi and colleagues also observed that creatine synthesis *in vitro* can be stimulated by increasing the availability of its precursors, but we did not observe any such effect in our patients.

In conclusion, this 9-month trial with 400 mg/kg per day L-arginine showed stimulation of AGAT activity since GA excretion was increased. However, the creatine concentrations were not significantly increased in brain. This suggests either that CRTR alone is required for significant accumulation of creatine in brain, or/and that CRTR is also needed in cerebral CR synthesis. The usefulness of the reported L-arginine treatment regimen in patients with CRTR-D seems limited, at least as monotherapy, and it might be influenced by several factors such as age or genotype in our paediatric patients.

Acknowledgements This work was supported by the Ministerio de Sanidad (FIS PI05/2080 and FIS PI05/1200) and Caixa Girona. G.S.S. is supported by the Dutch Society for Scientific Research (ZonMW/NOW), VIDI grant number 917.56.349.

References

- Almeida LS, Salomons GS, Hogenboom F, Jackobs C, Schoffeleers AN (2006) Exocytotic release of creatine in rat brain. *Synapse* **60**: 118–123. doi:10.1002/syn.20280.
- Arias A, Ormazabal A, Moreno J, et al (2006) Methods for the diagnosis of creatine deficiency syndromes: a comparative study. *J Neurosci Methods* **156**(1–2): 305–309.
- Braissant O, Henry H (2008) AGAT, GAMT and SLC6A8 distribution in the central nervous system, in relation to creatine deficiency syndromes: a review. *J Inherit Metab Dis* **31**: 230–239. doi:10.1007/s10545-008-0826-9.
- Braissant O, Henry H, Loup M, Eilers B, Bachmann C (2001) Endogenous synthesis and transport of creatine in the rat brain: an in situ hybridation study. *Brain Res Mol Brain Res* **86**: 193–201. doi:10.1016/S0169-328X(00)00269-2.
- Campistol J, Arias-Dimas A, Poo P, et al (2007) Cerebral creatine transporter deficiency: an infradiagnosed neuro-metabolic disease. *Rev Neurol* **44**(6): 343–347.
- Crim MC, Calloway DH, Mergen S (1975) Creatine metabolism in men: urinary creatine and creatinine excretions with creatine feeding. *J Nutr* **105**: 428–438.
- deGrauw TJ, Cecil KM, Byars AW, Salomons GS, Ball WS, Jakobs C (2003) The clinical syndrome of creatine transporter deficiency. *Mol Cell Biochem* **244**: 45–48. doi:10.1023/A:1022487218904.
- Gregor P, Nash SR, Caron MG, Seldin MF, Warren ST (1995) Assignment of the creatine transporter gene (SLC6A8) to human chromosome Xq28 telomeric to G6PD. *Genomics* **25**: 332–333. doi:10.1016/0888-7543(95)80155-F.
- Kleefstra T, Rosenberg EH, Salomons GS, et al (2005) Progressive intestinal, neurological and psychiatric problems in two adult males with cerebral creatine deficiency caused by an SLC6A8 mutation. *Clin Genet* **68**: 379–381. doi:10.1111/j.1399-0004.2005.00489.x.
- Leuzzi V, Alessandri MG, Casarano M, Battini R, Cioni G (2008) Arginine and glycine stimulate creatine synthesis in creatine transporter 1-deficient lymphoblasts. *Anal Biochem* **375**: 153–155.
- Nash SR, Giros B, Kingsmore SF, et al (1994) Cloning, pharmacological characterization, and genomic localization of the human creatine transporter. *Receptors Channels* **2**: 165–174.
- Póo-Argüelles P, Arias A, Vilaseca MA, et al (2006) X-linked creatine transporter deficiency in two patients with severe mental retardation and autism. *J Inherit Metab Dis* **29**: 220–223. doi:10.1007/s10545-006-0212-4.
- Rosenberg EH, Martínez-Muñoz C, Betsalel OT, et al (2007) Functional characterization of missense variants in the creatine transporter gene (SLC6A8): improved diagnostic application. *Hum Mutat* **28**(9): 890–896. doi:10.1002/humu.20532.
- Salomons GS, van Dooren SJM, Verhoeven NM, et al (2001) X-linked creatine-transporter gene (SLC6A8) defect: A new creatine deficiency syndrome. *Am J Hum Genet* **68**: 1497–1500. doi:10.1086/320595.
- Salomons GS, van Dooren SJM, Verhoeven NM, et al (2003) X-Linked creatine transporter defect: an overview. *J Inherit Metab Dis* **26**: 309–318. doi:10.1023/A:1024405821638.
- Schulze A (2003) Creatine deficiency syndromes. *Mol Cell Biochem* **244**: 143–150. doi:10.1023/A:1022443503883.
- Schulze A, Hoffmann GF, Bachert P, et al (2006) Presymptomatic treatment of neonatal guanidinoacetate methyltransferase deficiency. *Neurology* **67**(4): 719–721.
- Stöckler S, Schutz PW, Salomons GS (2007) Cerebral creatine deficiency syndromes: clinical aspects, treatment and pathophysiology. *Subcell Biochem* **46**: 149–166.
- Stöckler S, Holzbach U, Hanefeld F, et al (1994) Creatine deficiency in the brain: a new, treatable inborn error of metabolism. *Pediatr Res* **36**(3): 409–413.
- Stromberger C, Bodamer OA, Stöckler S (2003) Clinical characteristics and diagnostic clues in inborn errors of creatine metabolism. *J Inherit Metab Dis* **26**: 299–308. doi:10.1023/A:1024453704800.
- Wyss M, Kaddurah-Daouk R (2000) Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* **80**(3): 1107–1213.

Síntesis de resultados

- La administración oral de 0.4 g/kg/día de L-arginina se toleró aceptablemente por todos los pacientes, sin observar efectos adversos. Todos los pacientes cumplieron el protocolo de tratamiento hasta su finalización (9 meses).
- Los pacientes afectos de epilepsia siguieron con buen control de crisis aunque éstas ya estaban bien controladas previamente con fármacos antiepilépticos. La suplementación con L-arginina no interfirió en el control de las crisis.
- No observamos ninguna mejoría en la evaluación neurocognitiva mediante la escala de evaluación de la conducta adaptativa de Vineland (3 pacientes con déficit cognitivo grave) y el test WISC-R (1 paciente con déficit cognitivo leve) tras 9 meses de suplementación con L-arginina.
- No identificamos cambios en el pico de Cr en la RMS cerebral realizada a los 9 meses de suplementación con L-arginina comparándola con la RMS realizada en condiciones basales, previa al tratamiento.
- Bioquímicamente, la ratio Cr/Crn en orina no disminuyó ni se normalizó, aunque el GA en orina aumentó en todos los casos después de los 9 meses de suplementación con L-arginina, indicando que sí se estimuló la actividad de la enzima AGAT.

- No observamos ninguna relación entre la gravedad de la clínica, el tipo de mutación, la actividad residual del CRTR en fibroblastos y la respuesta clínica al tratamiento.

- Tras 9 meses de tratamiento, y basándonos en la ausencia de mejoría clínica y de cambios en el pico de creatina en la RMS cerebral, se suspendió la suplementación con L-arginina.

Objetivo 4.- Investigar la eficacia del tratamiento con análogos de creatina modificados tanto en fibroblastos de pacientes y en pacientes afectados de defecto de CRTR.

“RESPONSE TO CREATINE ANALOGS IN FIBROBLASTS AND PATIENTS WITH CREATINE TRANSPORTER DEFICIENCY”.

Respuesta a los análogos de creatina en fibroblastos y pacientes con defecto de transportador de creatina. *Mol Genet Metab* 2009; en prensa.

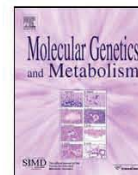
Carmen Fons, Ángela Arias, Ángela Sempere, Pilar Póo, Mercedes Pineda, Anna Mas, Anna López-Sala, Judith Garcia-Villoria, María A. Vilaseca, L. Ozaez, Montse Lluch, Rafael Artuch, Jaume Campistol, Antonia Ribes.

Tras el fracaso del ensayo terapéutico con precursores de la síntesis de Cr en el cerebro (L-arginina) en pacientes con defecto de CRTR, y dada la gravedad de los síntomas asociados a esta enfermedad, hemos seguido estudiando posibles estrategias terapéuticas para estos pacientes. La CM es una molécula polar e hidrofílica, por lo que no es capaz de atravesar las membranas celulares sin la utilización del CRTR. Como consecuencia, su administración no es eficaz en el caso de déficit de CRTR. Estudios recientes *in vitro* muestran un aumento del contenido de Cr cuando se bloquea el CRTR en cultivo células de hipocampo de ratas y se incuban con compuestos lipofílicos derivados de la Cr. Estos resultados indican que estos análogos derivados de la Cr pueden atravesar las membranas celulares de forma independiente del transportador (Lunardi et al, 2006). En el mercado existe la creatina etil-ester (CEE), molécula lipofílica derivada de la creatina monohidrato (CM), consumida por deportistas para aumentar su rendimiento. No se han observado efectos secundarios derivados de su consumo (Spillane et al, 2009). Dado que su efecto no se ha estudiado previamente en pacientes con déficit de CRTR, el objetivo que nos propusimos en este estudio fue evaluar la eficacia de la suplementación con CEE en fibroblastos de pacientes y en pacientes con defecto de CRTR.



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular Genetics and Metabolism

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

Response to creatine analogs in fibroblasts and patients with creatine transporter deficiency

C. Fons^{a,*}, A. Arias^{b,1}, A. Sempere^a, P. Póo^a, M. Pineda^a, A. Mas^c, A. López-Sala^a, J. Garcia-Villoria^b, M.A. Vilaseca^d, L. Ozaez^b, M. Lluch^b, R. Artuch^d, J. Campistol^a, A. Ribes^b^a Department of Child Neurology, Hospital Universitari Sant Joan de Déu, Centre for Research on Rare Diseases (CIBERER), Barcelona, Spain^b Division of Inborn Errors of Metabolism, Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Hospital Clínic, CIBERER, Barcelona, Spain^c Department of Pharmacy, Hospital Universitari Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain^d Department of Clinical Biochemistry, Hospital Universitari Sant Joan de Déu, CIBERER, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 October 2009

Accepted 27 October 2009

Available online xxxx

Keywords:

Creatine transporter deficiency

Mental retardation

Creatine ethyl ester

Proton magnetic resonance spectroscopy

ABSTRACT

Creatine transporter (CRTR) deficiency is one of the most frequent causes of X-linked mental retardation. The lack of an effective treatment for this disease, in contrast to creatine (Cr) biosynthesis disorders that respond to Cr monohydrate (CM), led us to analyze the efficacy of a lipophilic molecule derived from Cr, creatine ethyl ester (CEE), in fibroblasts and patients with CRTR deficiency. CM and CEE uptake studies were performed in six controls and four fibroblast cell lines from patients. We found a significant increase in Cr uptake after 72 h of incubation with CEE (500 μmol/L) in patients and control fibroblasts compared to incubation with CM. Subsequently, we assayed the clinical effect of CEE administration in four patients with CRTR deficiency. After 1 year of treatment, a lack of significant improvement in neuropsychological assessment or changes in Cr level in brain ¹H MRS was observed, and CEE was discontinued. In conclusion, this 12-month trial with CEE did not increase the brain concentration of Cr. Our *in vitro* data lend support to the idea of a certain passive transport of CEE in both pathological and control cells, although more lipophilic molecules or other cell systems that mimic the BBB should be used for a better approach to the *in vivo* system.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Creatine (Cr) is an essential molecule for the central nervous system that comes from dietary sources and endogenous biosynthesis, mainly in liver and pancreas [1]. Cr is transported from blood to the central nervous system by a Cr transporter protein (CRTR) that depends on Na⁺ and Cl⁻ [2].

In humans, two inborn errors of Cr biosynthesis, arginine-glycine amidinotransferase (AGAT) [OMIM 612718] and guanidinoacetate methyltransferase (GAMT) deficiencies [OMIM 612736], and one of transport, the X-linked CRTR defect [OMIM 300352], are known. All these defects are characterized by the absence or de-

crease of Cr in the brain measured by *in vivo* proton magnetic resonance spectroscopy (¹H MRS) [3]. The main clinical features of these disorders include mild or severe mental retardation, autistic behavior, language delay, movement disorders and epilepsy [4]. CRTR deficiency is the most frequent of these; its biochemical hallmark is an increased urinary Cr/creatinine ratio, and the final diagnosis is achieved by the study of Cr uptake in fibroblasts and by the mutational analysis of *SLC6A8* gene.

Treatment of Cr synthesis defects consists of oral administration with Cr monohydrate (CM) at high doses. Supplementation with CM leads to partial restoration of cerebral Cr concentration and clinical progress in the acquisition of motor skills together with slight improvement of some cognitive functions [5]. However, CRTR deficiency is unresponsive to this treatment [3,6]. CM is a polar hydrophilic molecule that probably is not able to cross the lipid membrane of the blood–brain barrier (BBB) without the action of CRTR [7]. Therefore, other therapeutic strategies, such as administration of L-arginine [8,9], have been proposed, with contradictory effects.

Recent *in vitro* studies showed an increased content of Cr when CRTR-blocked mouse hippocampus cells were incubated with lipophilic Cr-derived compounds. These results indicate that Cr-lipophilic analogs could cross lipid membranes independently of the CRTR [10].

Abbreviations: Cr, creatine; CRTR, creatine transporter; AGAT, arginine-glycine amidinotransferase; GAMT, guanidinoacetate methyltransferase; GA, guanidinoacetate; ¹H MRS, proton magnetic resonance spectroscopy; CM, creatine monohydrate; CEE, creatine ethyl ester; MEM, minimal essential medium; SS, saline solution; WISC-R, Weschler Intelligence Scale for Children-Revised; VABS, Vineland Adaptive Behavior Scale; BBB, blood–brain barrier.

* Corresponding author. Address: Department of Child Neurology, Hospital Sant Joan de Déu, Passeig Sant Joan de Déu, 2, 08950 Esplugues, Barcelona, Spain. Fax: +34 93 203 3959.

E-mail address: cfons@hsjdbcn.org (C. Fons).

¹ These authors contributed equally to this work.

1096-7192/\$ - see front matter © 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.ymgme.2009.10.186

Please cite this article in press as: C. Fons et al., Response to creatine analogs in fibroblasts and patients with creatine transporter deficiency, Mol. Genet. Metab. (2010), doi:10.1016/j.ymgme.2009.10.186

Creatine ethyl ester (CEE), which is a lipophilic molecule, has been used by many athletes for enhanced performance without secondary effects [11], but the clinical effectiveness of CEE has not yet been studied. Therefore, we decided to evaluate the efficacy of CEE supplementation both in fibroblasts and in patients with CRTR deficiency.

Materials and methods

Creatine uptake assay

CM and CEE uptake studies were performed in six controls and four fibroblast cell lines from patients previously diagnosed with CRTR deficiency. Fibroblasts were cultured in minimal essential medium (MEM) supplemented with fetal bovine serum. Cr uptake was carried out following the method of Salomons et al. [12], with some modifications. Briefly, CEE and CM were dissolved in MEM to reach a final concentration of 50 and 1000 μM ; these solutions were filtered with 0.22 μm Millipore and then analyzed by MS/MS to quantify the exact concentration of CM and CEE after filtering. The solutions were diluted to obtain a final concentration of 25 and 500 μM in the culture medium. Cells were incubated with 25 and 500 μM of CM and CEE for 24 and 72 h. Prior to Cr measurement, cells were washed twice with Hanks balanced salt solution (Gibco-BRL, Germany). The pellet was washed with saline solution (SS) twice and suspended in 300 μL SS and then sonicated (three times, 10 s) on ice; then the pellet was lysed by ultrasonic disruption and centrifuged for 5 min at 4 °C, 8800g. An aliquot of the homogenate was taken for protein measurement. Cr uptake was measured in total cell lysates by HPLC-MS/MS (Waters-Micromass Manchester, UK, model Quattro micro™ API) with a method previously described [13]. Results were expressed as pmol Cr/ μg protein.

Subjects

The patients were four boys previously reported by Fons et al. [8] with genetically confirmed CRTR deficiency. Clinical data are summarized in Table 1. Six control fibroblast cell lines were obtained from our repository cell bank.

Supplementation with CEE

CEE (CEE-PRO®, Muscle-tech Laboratory, USA) was analyzed by MS/MS; the aqueous extract of the preparation showed the following composition: 74% CEE, 15% creatinine, 7% CM and 4% other minor compounds (Fig. 1). Then it was orally supplemented (0.4 g/kg/day, administered in two divided doses) for 1 year. Total daily dose was from 9 to 18 g; the dosage was chosen on the basis of the amount of Cr supplementation for AGAT- and GAMT-deficient patients, which is about 0.4 g/kg/day.

The following variables were studied twice (before and after 1 year of treatment): physical exam including weight; seizure control; Video-EEG assessment; Cr peak in brain ^1H MRS; neuropsychological evaluation using the Weschler Intelligence Scale for Children-Revised (WISC-R) in one of the patients presenting with the mildest phenotype; and Vineland Adaptive Behavior Scale (VABS) in the other three severely handicapped patients. All were assessed by the same pediatric neuropsychologist.

Urinary guanidinoacetate (GA), creatine/creatinine ratio and creatinine were monitored every 3 months.

Informed consent was obtained from the patients' parents. The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital San Joan de Deu, and samples from patients and controls were obtained in accord with the Helsinki Declaration of 1964, as revised in 2001.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS® software (version 14.0 for Windows®) from SPSS, Inc. Student *t*-test for paired and non-paired data comparison was used to compare results obtained in fibroblast patients under different Cr incubation conditions.

Results

CM and CE uptake in fibroblasts

Results of CM and CE uptake in fibroblasts are shown in Table 2. Baseline values are those expected for patients with this deficiency. When control fibroblasts were incubated with different CM and CEE concentrations and temperatures, significant differences versus baseline, in almost all the situations, were observed. Nevertheless,

Table 1

Summary of clinical, neuroradiological and biochemical data prior to and after 1 year of treatment with CEE.

Data	Patient 1		Patient 2		Patient 3		Patient 4	
Age (years)	17		14		10		11	
Neurological symptoms	Severe MR, severe language disorder, autistic behavior, well-controlled epilepsy		Severe MR, severe language disorder, autistic behavior, well-controlled epilepsy		Mild MR, expressive language disorder, mild central hypotonia		Severe MR, severe language disorder, autistic behavior, refractory epilepsy	
Creatine uptake in fibroblasts % compared to control	2.5		2.6		13.3		6	
SLC6A8 mutational analysis	c.1222 1224delITTC		c.878 879delITTC		c.1631C>T		c.942 944delICTT	
Effect on protein	p.Phe408del		p.Lys293fsx3		p.Pro544Leu		p.Phe315del	
^1H MRS (creatine peak)	Basal	After CEE	Basal	After CEE	Basal	After CEE	Basal	After CEE
Neuropsychological assessment	Low-near absence No changes in VABS		Absence No changes in VABS		Low No changes in WISC-R		Low-near absence No changes in VABS	
Urinary GA (mmol/mol creatinine)	Basal	After CEE ^a	Basal	After CEE ^a	Basal	After CEE ^a	Basal	After CEE ^a
RV: 26–167	56	51	80	35	120	36.7	69	42.5
Urinary creatine/creatinine RV: 0.05–1.9	2.9	8.8	3.4	5.5	4.6	8.3	3.7	7.8
Urinary creatinine (mg/dl)	50.5	64.1	49.6	106.3	52.1	106.3	63.2	118.2

MR, mental retardation; GA, guanidinoacetate; RV, reference values.

^a Mean of values obtained every 3 months during the year of treatment.

Please cite this article in press as: C. Fons et al., Response to creatine analogs in fibroblasts and patients with creatine transporter deficiency, Mol. Genet. Metab. (2010), doi:10.1016/j.ymgme.2009.10.186

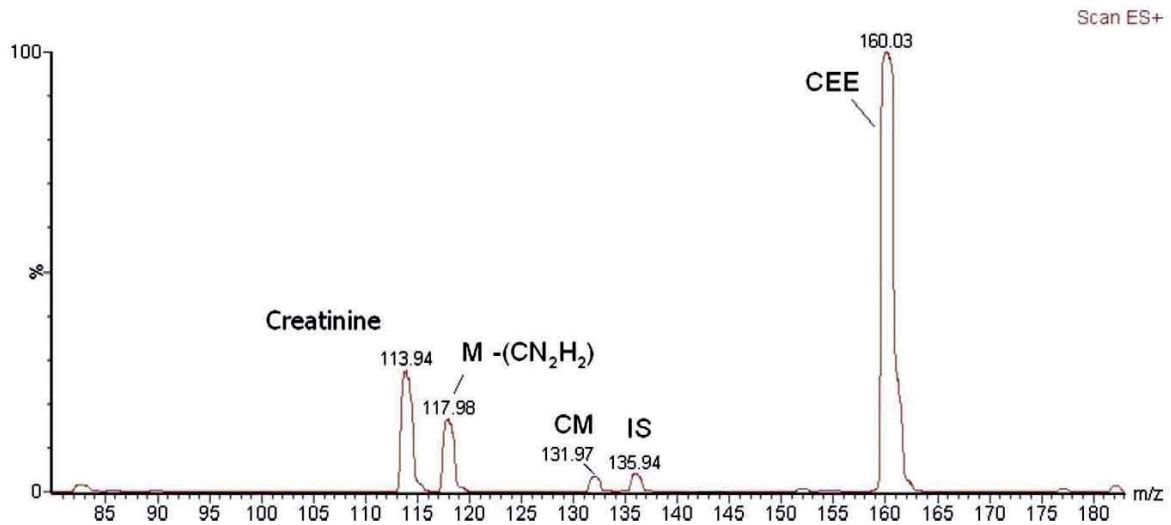


Fig. 1. MS/MS of the aqueous extract of the CEE compound administered to the patients. Creatine ethyl ester (CEE), creatine monohydrate (CM), internal standard (IS) and molecular mass (M).

the most significant uptake was produced when fibroblasts were incubated in supraphysiological conditions, 500 μ M for 72 h, with CEE. Patient fibroblasts followed a similar behavior to the controls, also resulting in a significant Cr uptake when the incubation was performed at 500 μ M for 72 h with CEE. Under these conditions a significant difference in the uptake of CM versus CEE, both for patients and controls, was observed, but no significant difference could be detected under other conditions. It was noteworthy that the uptake of CEE under the former conditions (500 μ M for 72 h) was found to be 2.2 times higher in controls and 1.4 times higher in patients compared with CM incubation. When 25 μ M was compared to 500 μ M the difference was always significant, both in patients and controls, except for 24 h of incubation with CM in controls. When comparing 24 h versus 72 h the difference was not significant, except for a slight difference in controls at 25 μ M CM. These slight differences are probably not biologically significant.

Clinical response

CEE administration was well tolerated by all four patients and did not cause any noticeable adverse effects. All of them reported compliance with the treatment through the end of the 1-year study. In terms of clinical assessment, epileptic seizures occurred in three out of four cases and were well controlled with antiepileptic drugs. CEE supplementation did not have any adverse effects on the seizure control. We did not observe any significant improvement in VABS (communication, daily living skills, socialization and motor skills) or WISC-R after 1 year of CEE supplementation. No changes in Cr peak in brain ¹H MRS follow-up were observed when comparing baseline conditions with those after 1 year of CEE supplementation. Biochemically, urinary Cr/Creatinine ratio and creatinine were markedly elevated during the CEE treatment compared with pre-treatment values (Table 1). No association was observed between the severity of the mutations and the clinical response to treatment.

Due to the lack of clinical improvement and absence of changes in brain Cr level in ¹H MRS, CEE treatment was discontinued at the end of observation period.

Discussion

CRTR deficiency has been reported to be the most frequent disorder of Cr metabolism, and the prevalence of this deficiency was

found to be relatively high in males with X-linked mental retardation [14,15]. However, there is no effective treatment available, although several approaches have been assayed [6,8].

Cr uptake through the BBB is the major source of Cr for the brain, and it is dependent on the function of CRTR [16,17]. Consequently, in the case of CRTR deficiency, Cr cannot be delivered to the brain cells. Cr is a very polar molecule and it does not easily cross the lipid-rich biological membranes. Thus the use of Cr-derived molecules that could cross the BBB and the neuronal plasma membrane in a carrier-independent way would represent major progress in the treatment of CRTR-deficient patients. Lunardi et al. [10] studied the transport of Cr benzyl ester and phosphocreatine-Mg-complex acetate in mouse hippocampal slices and showed that both compounds cross the plasma membrane in a transporter-independent way that might be a useful therapy for CRTR deficiency.

CM and CEE uptake in fibroblasts

The aim of our study was to assess a new therapeutic approach for this disease. Esterification is a process widely used by pharmaceutical companies to increase the bioavailability of certain drugs. Therefore, we decided to study the behavior of CEE compared with CM in patient and control fibroblasts. Although it cannot be expected that fibroblasts will fully reproduce the mechanism of the disease, this could be an approach to assay whether Cr or Cr-derived compounds might be able to cross biological membranes in a transporter-independent way.

Our results, particularly those obtained with CEE at supraphysiological conditions, 500 μ M for 72 h, indicate that CEE crosses the plasma membrane more efficiently than CM and it increases in a similar proportion in patient (1.4-fold) and control fibroblasts (2.2 times). Therefore a clinical assay with evaluation of long-term therapy was proposed.

Clinical assay with CEE

After 1 year of treatment with CEE we did not observe any improvement in communication, daily living skills, socialization or motor skills in our patients with CRTR deficiency. Concerning epilepsy, we could not evaluate the efficacy of CEE as monotherapy in epilepsy control since we could not stop antiepileptic drug treat-

Table 2
Creatine uptake in fibroblasts: CM versus CEE incubation under different conditions.

Incubation time	Base-line 0h	CREATINE MONOHYDRATE (CM)				CREATINE ETHYL ESTER (CEE)				
		24 h		72 h		24 h		72 h		
		25 μM	500 μM	25 μM	500 μM	25 μM	500 μM	25 μM	500 μM	
Concentration of CM or CEE	0 μM	25 μM	500 μM	25 μM	500 μM	25 μM	500 μM	25 μM	500 μM	
CONTROLS n=6	Creatine uptake (μmol/mg prot)	11.5 ± 1.3	20.2 ± 6.2	25.8 ± 8.1	12.7 ± 3.9	20.3 ± 4.6	25.8 ± 4.1	40.3 ± 8.4	21.7 ± 5.5	44.8 ± 9.7
	All conditions vs baseline		0.017 *	0.007 *	0.524	0.006 *	0.000 *	0.000 *	0.007 *	0.000 *
	25 vs 500 μM		0.135		0.000*		0.018*		0.002*	
	CM vs CEE						0.069	0.053	0.058	0.004 *
	24h vs 72 h				0.012 *	0.05			0.204	0.264
PATIENTS n=4	Creatine uptake (μmol/mg prot)	0.38 ± 0.32	1.23 ± 1.15	6.86 ± 1.91	1.67 ± 1.35	8.90 ± 3.91	0.63 ± 0.37	4.89 ± 1.80	0.81 ± 0.33	12.6 ± 3.07
	All conditions vs baseline		0.141	0.000 *	0.108	0.004 *	0.333	0.004 *	0.163	0.000 *
	25 vs 500 μM		0.004*		0.026*		0.007*		0.018*	
	CM vs CEE						0.443	0.357	0.737	0.005 *
	24h vs 72 h				0.612	0.115			0.247	0.132

p-Values marked as * are those showing statistical significance.

ment in three of our patients affected by epilepsy, for ethical reasons. In video-EEG, no changes in background activity were observed. Finally, we did not observe any change in Cr level in brain ¹H MRS after the observational period.

The lack of clinical improvement may be related to the fact that the cerebral Cr concentrations were not restored by CEE supplementation. Taking into account that the quality of supplement we used was highly guaranteed (Supplementary Fig. 1), several other mechanisms could explain the lack of increase of brain Cr after treatment with CEE.

- (1) The dose that we used was not enough to replenish the Cr stores.
- (2) CEE susceptibility to hydrolysis in gastric acidic conditions and consequently a rapid conversion of CEE to Cr and later to creatinine may exist, since CEE supplementation showed a large increase in serum creatinine levels. Some researchers have concluded that a large portion of CEE is degraded within the gastrointestinal tract after ingestion [11].
- (3) The effect of esterase enzymes that rapidly convert CEE into ethyl alcohol and Cr, which cannot cross the BBB in a CRTR-independent way and, moreover, Cr is rapidly transformed to creatinine. Cr benzyl ester suffers a rapid degradation to creatinine and benzyl alcohol [10]. Perhaps CEE has the same limitations.

In conclusion, this 12-month trial with CEE (0.4 g/kg/day) did not increase the brain concentration of Cr and this might be influenced by several factors such as dose, gastric acid pH and esterase enzymes. Furthermore, mechanisms that regulate Cr entry into the cells are still the object of debate, particularly with regard to passive transport. Our *in vitro* data support the idea of a certain passive transport of CEE in both pathological and control cells,

although more lipophilic molecules or other cell systems that mimic the BBB should be used to better approach the *in vivo* system. At the moment, we do not recommend treatment with CEE for patients affected with CRTR-D.

Acknowledgments

This study was supported by the Ministerio de Sanidad (FIS PI05/2080 and FIS PI05/1200). CIBERER is an initiative of the ISCIII (MICIN, Spain). The excellent technical assistance of Cristina Fernandez is acknowledged; she is the recipient of a Grant (FIS CA 06-0128).

References

- [1] M. Wyss, R. Kaddurah-Daouk, Creatine and creatinine metabolism, *Physiol. Rev.* 80 (2000) 1107–1213.
- [2] W.X. Dai, S. Vinnakota, X.J. Qian, D.L. Kunze, H.K. Sarkar, Molecular characterization of the human CRT-1 creatine transporter expressed in *Xenopus* oocytes, *Arch. Biochem. Biophys.* 361 (1999) 75–84.
- [3] A. Schulze, Creatine deficiency syndromes, *Mol. Cell. Biochem.* 244 (2003) 143–150.
- [4] S. Stöckler, P.W. Schutz, G.S. Salomons, Cerebral creatine deficiency syndromes: clinical aspects, treatment and pathophysiology, *Subcell. Biochem.* 46 (2007) 149–166.
- [5] S. Stöckler, U. Holzbach, F. Hanefeld, I. Marquardt, G. Helms, M. Reuquart, W. Hänicke, J. Frahm, Creatine deficiency in the brain: a new, treatable inborn error of metabolism, *Pediatr. Res.* 36 (1994) 409–413.
- [6] P. Póo, A. Arias, M.A. Vilaseca, A. Ribes, R. Artuch, A. Sans, A. Moreno, C. Jakobs, G.S. Salomons, X-linked creatine transporter deficiency in two patients with severe mental retardation and autism, *J. Inher. Metab. Dis.* 29 (2006) 220–223.
- [7] K.M. Cecil, G.S. Salomons, W.S. Ball Jr., 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.
- [8] C. Fons, A. Sempere, A. Arias, A. López-Sala, P. Póo, M. Pineda, A. Mas, M.A. Vilaseca, G.S. Salomons, A. Ribes, R. Artuch, J. Campistol, Arginine supplementation in four patients with X-linked creatine transporter defect, *J. Inher. Metab. Dis.* 31 (2008) 724–728.
- [9] 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.
- [10] G. Lunardi, A. Parodi, L. Perasso, A.V. Pohvozheva, S. Scarrone, E. Adriano, T. Florio, C. Gandolfo, A. Cupello, S.V. Burou, 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.
- [11] M. Spillane, R. Schoch, M. Cooke, T. Harvey, M. Greenwood, R. Kreider, D.S. Willoughby, 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.* 6 (2009) 6.
- [12] G.S. Salomons, S.J.M. van Dooren, N.M. Verhoeven, D. Marsden, C. Schwartz, K.M. Cecil, T.J. DeGrauw, C. Jakobs, X-linked creatine transporter defect: an overview, *J. Inher. Metab. Dis.* 26 (2003) 309–318.
- [13] A. Arias, A. Ormazabal, J. Moreno, B. González, M.A. Vilaseca, J. García-Villoria, T. Pámpols, P. Briones, R. Artuch, A. Ribes, Methods for the diagnosis of creatine deficiency syndromes: a comparative study, *J. Neurosci. Methods* 156 (2006) 305–309.
- [14] 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 gene (SLC6A8) defect: a new creatine-deficiency syndrome, *Am. J. Hum. Genet.* 68 (2001) 1497–1500.
- [15] E.H. Rosenberg, L.S. Almeida, T. Kleefstra, R.S. DeGrauw, H.G. Yntema, N. Bahi, C. Moraine, H.H. Ropers, J.P. Fryns, T.J. DeGrauw, C. Jakobs, G.S. Salomons, High prevalence of SLC6A8 deficiency in X-linked mental retardation, *Am. J. Hum. Genet.* 75 (2004) 97–105.
- [16] 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.
- [17] 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.

Síntesis de resultados

1. Resultados del transporte de Cr en fibroblastos incubados con CM and CEE

- El contenido basal de Cr en los fibroblastos de los pacientes afectados de déficit de CRTR fue indetectable.
- Cuando los fibroblastos de pacientes y controles fueron incubados con diferentes concentraciones de CM y CEE (25 y 500 $\mu\text{mol/L}$) y durante diferentes tiempos (24 y 72 h), se observaron diferencias significativas respecto a los valores basales, en casi todas las situaciones tanto en fibroblastos de controles como de pacientes.
- El aumento del transporte de Cr más significativo se observó cuando los fibroblastos se incubaron con CEE en condiciones suprafisiológicas (500 $\mu\text{mol/L}$ durante 72 horas) tanto en controles (20.3 $\mu\text{mol/mg}$ proteína CM vs 44.8 $\mu\text{mol/mg}$ proteína CEE) como en pacientes (8.9 $\mu\text{mol/mg}$ proteína CM vs 12.6 $\mu\text{mol/mg}$ proteína CEE).

2. Resultados de la respuesta clínica al tratamiento con CEE

- La administración de CEE se toleró perfectamente y no observamos efectos secundarios tras su administración. Todos los pacientes cumplieron correctamente el tratamiento durante el año del estudio.

- Tres de los cuatro pacientes presentaban epilepsia, que se controló con tratamiento antiepiléptico. El tratamiento con CEE no provocó ningún efecto adverso en el control de las crisis epilépticas.
- No observamos cambios en la escala de evaluación de la conducta adaptativa de Vineland (3 pacientes con déficit cognitivo grave) ni en el test WISC-R (1 paciente con déficit cognitivo leve) tras los 12 meses de tratamiento con CEE.
- No observamos cambios en el pico de Cr en la RMS al comparar la imagen basal con la realizada tras los 12 meses de tratamiento con CEE.
- Bioquímicamente, la ratio Cr/Crn y la Crn en orina se elevaron de forma importante durante el tratamiento con CEE comparando con los valores pre-tratamiento, hallazgo lógico tras tratar a los pacientes con dosis altas de Cr oral.
- No observamos ninguna relación entre la respuesta al tratamiento con CEE y la gravedad clínica o de las mutaciones en el gen *SLC6A8*.
- Dada la ausencia de mejoría clínica y de cambios en el pico de Cr en la RMS, a los 12 meses se suspendió el tratamiento con CEE.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN CONJUNTA

1- Deficiencia de transportador de creatina: prevalencia en pacientes con retraso mental y dificultades en el cribado metabólico.

Diferentes estudios han demostrado una prevalencia relativamente elevada del déficit de CRTR en grupos de varones afectados de retraso mental sin filiar (Rosenberg et al, 2004; Mercimek-Mahmutoglu et al, 2009). Por ello es fundamental disponer de métodos de estudio sencillos, asequibles, fiables, y económicos que faciliten el cribado inicial de esta enfermedad. Bioquímicamente, la ratio Cr/Crn en orina (característicamente elevada en esta enfermedad) ha demostrado ser un buen marcador como cribado inicial de varones afectados de retraso mental sin filiar. Nuestro grupo, durante un período de 2 años, ha estudiado a 1600 varones que cumplían criterios clínicos de padecer defecto de CRTR (retraso mental, y/o TEA y/o epilepsia), de los cuales un 2.1 % (33) presentaron un incremento de la ratio Cr/Crn en orina, sugiriendo un defecto de CRTR. Sólo se pudo confirmar el diagnóstico en 4 de estos pacientes (0.25%), siendo la prevalencia del defecto de CRTR en nuestro medio, mucho más baja que la descrita en estudios recientes (2.3 %). En nuestro estudio obtuvimos un 1.8 % de resultados falsos positivos (29 de 1600 casos) al analizar una única muestra de orina. La ratio Cr/Crn se normalizó en las sucesivas muestras analizadas en estos casos y además, la RMS y la incorporación de Cr en fibroblastos resultó normal.

Este hecho indica que es conveniente repetir los análisis de orina cuando la ratio Cr/Crn está elevada por primera vez, antes de proceder a la realización de estudios invasivos y costosos como la RMS cerebral y/o la biopsia de piel para estudio de la incorporación de Cr en fibroblastos. En este mismo estudio intentamos dilucidar las posibles causas de estos resultados falsos positivos y observamos que tras la ingesta de alimentos ricos en proteínas y en Cr, la ratio Cr/Crn en orina daba resultados falsos positivos en 4/13 individuos sanos, mientras que tras ingesta de alimentos con bajo contenido en Cr los valores de la ratio fueron normales en todos ellos. Desafortunadamente no disponemos de cuestionarios dietéticos de la cohorte de pacientes y los controles estudiados aunque estas diferencias de la ratio Cr/Crn entre repetidas muestras de orina en nuestros pacientes podrían ser debidas a variaciones en la ingesta de alimentos ricos en Cr. Nos parece interesante el hecho de establecer valores de referencia tras el consumo de alimentos bajo contenido en Cr así como analizar a los pacientes en estas mismas condiciones. Por tanto, teniendo en cuenta estos comentarios previos, recomendamos que tras un primer resultado anormal de la ratio Cr/Crn en orina, se recoja una segunda muestra de orina la mañana siguiente, después del consumo de una dieta libre de carne o pescado azul la noche anterior. Si obtenemos un segundo resultado elevado, se procederá al estudio de RMS y biopsia de piel para el análisis de la incorporación de Cr en fibroblastos y finalmente el estudio genético que confirmará la mutación en el gen *SLC6A8*.

2- Espectro de la epilepsia en la deficiencia del transportador cerebral de creatina.

Las convulsiones se pueden observar en el curso de diferentes errores congénitos del metabolismo, generalmente formando parte de un amplio espectro clínico. Los derivados guanidino, entre ellos la Cr y el GA tienen potencial epileptógeno (D'Hooge et al, 1992; De Deyn et al, 1990), actuando como agonistas parciales del receptor GABA_A. En el déficit de CRTR, el tráfico intercelular de Cr entre neuronas y células gliales (oligodendrocitos) está alterado (Almeida et al, 2006), ocasionando un incremento de Cr en el espacio sináptico. Este hecho provoca una estimulación prolongada de los receptores GABA_A post-sinápticos, el bloqueo de las respuestas GABAérgicas y la interferencia en los circuitos inhibidores GABAérgicos. Además, la Cr promueve el proceso de diferenciación hacia el fenotipo GABAérgico en cultivo de precursores de neuronas del estriado. La deficiencia de Cr cerebral estará implicada en la reducción de los circuitos GABAérgicos y en la disminución de las vías inhibitorias (Andres et al, 2005).

Se ha reportado que la epilepsia en los defectos de Cr cerebral varía desde epilepsia refractaria en el déficit de GAMT a formas leves de epilepsia o convulsiones febriles en el defecto de AGAT y CRTR (Schulze, 2003). Se han descrito también casos excepcionales de epilepsia refractaria y grave con episodios de estatus epiléptico (Cecil et al, 2001; Mancardi et al, 2007; Anselm et al, 2006). En nuestra serie de pacientes, 4 de 7 pacientes con epilepsia presentaron episodios de convulsiones prolongadas en forma de estatus epiléptico, indicando que la epilepsia en pacientes afectados de déficit de

CRTR, no es tan leve como se había reportado previamente. No observamos ningún patrón específico en el video-EEG en nuestros pacientes, salvo una actividad de base lenta para su edad, al igual que lo observado en muchas otras enfermedades neurometabólicas (Sedel et al, 2007). Las convulsiones febriles descritas en pacientes con defecto de CRTR, se podrían relacionar con la disfunción en los circuitos GABAérgicos dado que se han encontrado mutaciones en subunidades del receptor GABA_A (SCN1B, SCN1A, GABRG2) en pacientes con epilepsia idiopática generalizada asociada a convulsiones febriles plus (Lagae, 2008). A pesar de la falta de un tratamiento efectivo para los pacientes que presentan defecto de CRTR, la epilepsia generalmente se controla con antiepilépticos clásicos (carbamacepina y ácido valproico). Se han detectado una amplia variabilidad de mutaciones en el gen *SLC6A8* (sin sentido o “nonsense”, deleción de un aminoácido, gran deleción parcial o completa, error de splicing y cambio de sentido o “missense”). Los pacientes con mutaciones más leves (p.e mutaciones “missense”) pueden exhibir un fenotipo más leve (Salomons et al, 2001). Nuestro paciente identificado en el artículo como Paciente 3, es el que presenta sintomatología más leve (retraso cognitivo leve, ausencia de epilepsia y sin actividad anormal en el Video-EEG). Presenta además la mayor incorporación de Cr en fibroblastos y una mutación missense en el gen *SLC6A8*. Aunque en nuestra serie observamos que los pacientes con deleciones en el gen *SLC6A8* presentan un fenotipo clínico severo, no hemos podido demostrar una correlación genotipo-fenotipo, primero por el escaso tamaño de la muestra y en segundo lugar, porque se ha descrito recientemente un paciente afecto de déficit de CRTR que presentaba epilepsia severa y refractaria y una mutación missense (c.1631C>T; p.Pro544Leu) (Mancardi et al, 2007). Esta mutación es la misma que la de nuestro paciente (Paciente 3), el cual no presenta

epilepsia ni retraso mental profundo. Por lo tanto, la misma mutación puede ocasionar diferentes fenotipos clínicos, al menos respecto a las características de la epilepsia.

Como recomendación derivada de este apartado, se debería descartar un defecto de Cr cerebral en varones afectos de retraso mental, TEA, trastorno severo del lenguaje expresivo y epilepsia, que han presentado episodios de estatus epiléptico y/o convulsiones febriles típicas o atípicas.

3- Suplementación con L-arginina en cuatro pacientes con defecto de transportador de creatina ligado al cromosoma X.

Basándonos en la ausencia de transporte hasta el SNC de la Cr exógena ocasionado por el déficit de CRTR, y teniendo en cuenta que el cerebro posee la maquinaria necesaria para la propia síntesis de Cr (sus células expresan los enzimas AGAT y GAMT) (Braissant et al, 2001), decidimos ensayar el efecto de la suplementación con L-arginina (aminoácido precursor de la síntesis de Cr) en pacientes con deficiencia de CRTR. En el estudio realizado, después de 9 meses de tratamiento con L-arginina, no observamos aumento de la concentración de Cr cerebral en la RMS, ni mejoría del nivel cognitivo en pacientes con defecto de CRTR. No pudimos evaluar la eficacia de la L-arginina como terapia en el control de la epilepsia, ya que decidimos no suspender la administración del tratamiento antiepiléptico en tres de estos pacientes afectos de epilepsia por razones éticas. Bioquímicamente, los valores de GA en orina aumentaron de forma significativa después de los 9 meses de tratamiento, indicando que la biosíntesis periférica de Cr aumenta durante la suplementación con L-arginina. Recientemente, estudios *in vitro* que utilizan linfoblastos con déficit de CRTR, han demostrado que la síntesis de Cr se

estimula en un medio enriquecido con precursores de la síntesis de Cr (L-arginina y/o glicina) (Leuzzi et al, 2008).

A pesar de estos resultados esperanzadores *in vitro*, nosotros no observamos tal efecto a nivel cerebral en nuestros pacientes, en los cuales el déficit de Cr no se produce por un defecto de enzimas de síntesis sino que es secundario a un defecto de transporte. Se han establecido varias hipótesis sobre los mecanismos implicados en la ausencia de efecto de la L-arginina respecto a la activación de la síntesis endógena cerebral de Cr en pacientes: una de ellas sugiere que el metabolismo de la L-arginina se encuentra rígidamente compartimentalizado según los tejidos (Wu et al, 1998). Esto explicaría las dificultades para restaurar la L-arginina en un compartimiento, como el cerebro. Además, el transporte de L-arginina a través de la BHE no está ampliamente estudiado, pero la cantidad de L-arginina que alcanza el LCR se regula mediante sistemas de transporte complejos y puede que esta cantidad no sea la suficiente para aumentar significativamente la biosíntesis de Cr cerebral.

Otro mecanismo implicado en la ausencia de respuesta a la suplementación con L-arginina, se basa en que el CRTR es probablemente necesario para la biosíntesis de Cr en el cerebro. Se ha observado que las enzimas AGAT y GAMT raramente se co-expresan en una célula y que es el CRTR el que transporta el GA de las células que expresan AGAT a las células que expresan GAMT (Braissant et al, 2009). Por ello, a pesar que se sintetice el GA, este puede que no quede disponible para la síntesis de Cr cerebral porque el GA no se puede transportar a las células que expresan GAMT. Finalmente, es interesante destacar que la ausencia o reducción importante de los niveles de Cr cerebral durante el desarrollo de este órgano y durante los primeros años de vida puede ocasionar un daño (parcialmente) irreversible. Por ello al restaurar la Cr

cerebral a una edad avanzada cabe la posibilidad que la encefalopatía que exhiben estos pacientes no mejore de forma importante.

4- Respuesta a los análogos de creatina en fibroblastos y en pacientes con defecto del transportador de creatina.

En el defecto de CRTR, a pesar de la función correcta de las enzimas de síntesis endógena de Cr, existe un déficit de Cr cerebral relacionado con incapacidad del GA sintetizado en las células que expresan AGAT de ser transportado hacia las células que expresan GAMT y que sintetizan Cr ya que el transporte del GA se realiza mediante el CRTR (Braissant et al, 2009). Otros investigadores, destacan que una fuente de aporte de Cr cerebral es a través de la BHE. Hay que tener en cuenta que la Cr es una molécula polar que no atraviesa con facilidad las membranas lipídicas celulares y que precisa del CRTR, el cual la transporta contra gradiente desde la sangre al cerebro (Ohtsuki et al, 2002). Tras el fracaso del tratamiento con precursores de síntesis de Cr (L-arginina), el uso de moléculas derivadas de la Cr con características hidrofóbicas que le permitan atravesar la BHE y la membrana plasmática neuronal de forma independiente del CRTR, puede representar una estrategia de tratamiento en pacientes con defecto de CRTR. Lunardi et al, 2006, estudiaron *in vitro* el transporte de derivados de Cr liposolubles en células de hipocampo de ratas a los que se bloqueó el CRTR y observaron que estos compuestos atraviesan la membrana plasmática celular de forma independiente del CRTR.

En el mercado encontramos comercializado un derivado esterificado de la Cr (algunas compañías farmacéuticas utilizan el proceso de esterificación para aumentar la

biodisponibilidad de ciertos fármacos), y procedimos a estudiar la capacidad de transporte de la CEE comparándola con la CM en fibroblastos de pacientes y de controles.

Aunque sabemos que los fibroblastos no reproducen el mecanismo de la enfermedad, este estudio podría representar una aproximación para mejorar el transporte de la Cr a través de las membranas biológicas. De hecho, observamos que la CEE en condiciones suprafisiológicas (500 $\mu\text{mol/L}$ durante 72 horas) atraviesa la membrana plasmática celular más eficientemente que la CM tanto en fibroblastos de pacientes como en controles. Ante tales resultados decidimos ensayar el tratamiento en pacientes con defecto de CRTR, pero tras un año de tratamiento con CEE no observamos mejoría clínica de los pacientes ni cambios en el pico de Cr en la RMS, motivo por el cual el tratamiento se finalizó.

La ausencia de efectos en el sistema nervioso central podría estar relacionada con la dosis de la CEE, que no fuera suficiente para llenar los depósitos de Cr cerebral. Otra hipótesis sería que la CEE es susceptible a la hidrólisis por el ácido gástrico y se convierte rápidamente en Cr y posteriormente en Crn, como lo demuestran los valores elevados de Crn en orina observados durante el tratamiento con CEE. Algunos investigadores refieren que una elevada cantidad de CEE se degrada a nivel del tracto gastro-intestinal tras su ingestión oral (Spillane et al, 2009). Además, otro factor podría tener relación con el efecto de las esterasas que rápidamente transforman la CEE en etil-alcohol y Cr, la cual no puede atravesar la BHE sin su transportador específico (CRTR) y además, se transforma rápidamente en Crn.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. En nuestro medio, la prevalencia de defecto de CRTR entre la población de varones con retraso mental es mucho menor que la observada en otras series europeas. El consumo de alimentos ricos en Cr puede ocasionar resultados falsos positivos ya que elevan la ratio Cr/Crn en orina.
2. Recomendamos el tratamiento antiepiléptico en pacientes afectos de déficit de CRTR después de una primera crisis con el objetivo de protegerles de la recurrencia o de las complicaciones graves de la epilepsia como es el estado de mal epiléptico. Son necesarios estudios en series más amplias para caracterizar mejor el fenotipo clínico de la epilepsia en estos pacientes.
3. El ensayo terapéutico con L-arginina durante 9 meses, probablemente causó una estimulación de la actividad de la AGAT, ya que la excreción de GA aumentó; a pesar de ello, la concentración de Cr cerebral no aumentó. El CRTR es por tanto necesario para el aporte de Cr procedente de la periferia hacia el sistema nervioso central. El ensayo con L-arginina como tratamiento del defecto de CRTR en pacientes pediátricos no es eficaz, al menos siguiendo nuestra pauta.

4. Nuestros resultados *in vitro* apoyan la idea de que un cierto transporte pasivo de CEE existe tanto en fibroblastos de pacientes como en controles, y que por tanto se deberían utilizar moléculas liposolubles para el tratamiento de pacientes afectados de déficit de CRTR. En cambio, el ensayo terapéutico con CEE durante 12 meses no aumentó la concentración de Cr en el cerebro en estos pacientes. Varios factores pudieron influenciar en esta ausencia de efecto: la dosis, el pH del ácido gástrico y las esterasas sanguíneas. Por otro lado, parece necesario utilizar otros sistemas celulares que simulen mejor las características de la BHE para realizar una mejor aproximación al sistema *in vivo*.

5. A pesar de la ausencia de resultados positivos en ambos ensayos terapéuticos, nuestros estudios constituyen el paso inicial en la investigación de un posible tratamiento para esta enfermedad tan grave y hasta el momento intratable como es el defecto de CRTR.

OPCIONES DE FUTURO

OPCIONES DE FUTURO

1. Contribuir en la creación de un registro europeo de los síndromes de DCC para una mejor evaluación epidemiológica de estos trastornos.
2. Identificar nuevos pacientes con defectos de Cr cerebral aplicando el protocolo diagnóstico multidisciplinar establecido durante los pasados 3 años. Definir nuevos fenotipos relacionados con los defectos de Cr cerebral, por medio del cribado de poblaciones de pacientes no estudiadas hasta la fecha (epilepsia refractaria, pacientes con sospecha de enfermedad mitocondrial sin diagnóstico, trastornos del movimiento puros).
3. Estudiar desde un punto de vista clínico, bioquímico y molecular a las madres/hermanas portadoras de nuestros pacientes afectos de déficit de CRTR cerebral (ligado al cromosoma X). Diseñar nuevas pruebas diagnósticas e identificar pacientes del sexo femenino portadoras de la deficiencia del CRTR con clínica leve-moderada.

4. Analizar el déficit de creatina mediante RMS multivoxel, en las diferentes áreas cerebrales y correlacionarlos con alteraciones neuropsicológicas y neurológicas específicas de los pacientes, comparándolas con un grupo control.

5. Diseñar nuevas estrategias terapéuticas para los pacientes con defecto de CRTR, investigando la eficacia de nuevas moléculas de Cr con una mejor biodisponibilidad a nivel cerebral.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

Almeida LS, Vilarinho L, Darmin PS et al. A prevalent pathogenic GAMT mutation (c.59G>C) in Portugal. *Mol Genet Metab* 2007;91:1-6.

Almeida LS, Verhoeven NM, Roos B et al. Creatine and guanidinoacetate: diagnostic markers for inborn errors in creatine biosynthesis and transport. *Mol Genet Metab* 2004;82:214-219.

Almeida LS, Salomons GS, Hogenboom F, Jackobs C, Schoffemeer AN. Exocytotic release of creatine in rat brain. *Synapse* 2006;60:118-123.

Almeida LS, Rosenberg EH, Verhoeven NM, Jakobs C, Salomons GS. Are cerebral creatine deficiency syndromes on the radar screen? *Future Neurol* 2006;1:637-649.

Andres RH, Ducray AD, Huber AW et al. Effects of creatine treatment on survival and differentiation of GABA-ergic neurons in cultured striatal tissue. *J Neurochem* 2005;95:33-45.

Anselm IM, Alkuraya FS, Salomons GS et al. X-linked creatine transporter defect: A report on two unrelated boys with a severe clinical phenotype. *J Inherit Metab Dis* 2006; 29:214-219.

Arias A, Ormazabal A, Moreno J et al. Methods for the diagnosis of creatine deficiency syndromes: a comparative study. *J Neurosci Methods* 2006;156:305-309.

Arias A, Garcia-Villoria J, Ribes A. Guanidinoacetate and creatine/creatinine levels in controls and patients with urea cycle defects. *Mol Genet Metab* 2004;82:220-224.

Balsom PD, Soderlund K, Ekblom B. Creatine in humans with special reference to creatine supplementation. *Sport Med* 1994;18:268-820.

Battini R, Alessandri MG, Leuzzi V et al. Arginine:glycine amidinotransferase (AGAT) deficiency in a newborn: early treatment can prevent phenotypic expression of the disease. *J Pediatr* 2006;148:828-830.

Battini R, Leuzzi V, Carducci C et al. Creatine depletion in a new case with AGAT deficiency: clinical and genetic study in a large pedigree. *Molec Genet Metab* 2002;77: 326-331.

Bianchi MC, Tosetti M, Fornai F et al. Reversible brain creatine deficiency in two sisters with normal blood creatine level. *Ann Neurol* 2000;47:511-513.

Bianchi MC, Tosetti M, Battini R et al. Treatment monitoring of brain creatine deficiency syndromes: a ¹H- and ³¹P-MR spectroscopy study. *Am J Neuroradiol* 2007;28:548-554.

Böger RH, Bode-Böger SM. The clinical pharmacology of L-arginine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:70–99.

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

Braissant O, Henry H, Villard AM, Speer O, Wallimann T, Bachmann C. Creatine synthesis and transport during rat embryogenesis: spatiotemporal expression of AGAT, GAMT and CTI. *BMC Dev Biol* 2005;5:9.

Braissant O, Bachmann C, Henry H. Expression and function of AGAT, GAMT and CTI in the mammalian brain. *Subcell Biochem* 2007;46:67-81.

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;31:230-239.

Braissant O, Béard E, Torrent C, Henry H. Dissociation of AGAT, GAMT and SLC6A8 in CNS: Relevance to creatine deficiency syndromes. *Neurobiol Dis* 2009; en prensa

Caldeira-Araújo H, Smit W, Verhoeven NM et al. Guanidinoacetate methyltransferase deficiency identified in adults and a child with mental retardation. *Am J Med Genet A* 2005;1:122-127.

Campistol J, Arias-Dimas A, Póo P et al. Cerebral creatine transporter deficiency: an infradiagnosed neurometabolic disease. *Rev Neurol* 2007;44:343-347.

Carducci C, Leuzzi V, Carducci C, Prudente S, Mercuri L, Antonozzi I. Two new severe mutations causing guanidinoacetate methyltransferase deficiency. *Mol Genet Metab* 2000;71:633–638.

Cecil KM, Salomons GS, Ball WS Jr et al. Irreversible brain creatine deficiency with elevated serum and urine creatine: a creatine transporter defect?. *Ann Neurol* 2001;49:401-404.

Chilosi A, Leuzzi V, Battini R et al. Treatment with L- arginine improves neuropsychological disorders in a child with creatine transporter defect. *Neurocase* 2008;14:151-161.

Clark AJ, Rosenberg EH, Almeida LS, et al. X-linked CT (SLC6A8) mutations in about 1% of males with mental retardation of unknown etiology. *Hum Genet* 2006;119:604-10.

Crim MC, Calloway DH, Margen S. Creatine metabolism in men: urinary creatine and creatinine excretions with creatine feeding. *J Nutr* 1975;105:428-438.

Dai WX, Vinnakota S, Qian XJ, Kunze DL, Sarkar HK. Molecular characterization of the human CRT-1 creatine transporter expressed in *Xenopus* oocytes. *Arch Biochem Biophys* 1999;361:75-84.

Dechent P, Pouwels PJ, Wilken B, Hanefeld F, Frahm J. Increase of total creatine in human brain after oral supplementation of creatine-monohydrate. *Am J Physiol* 1999;277:R698-R704.

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;8:134-141.

deGrauw TJ, Cecil KM, Byars AW, Salomons GS, Ball WS, Jakobs C. The clinical syndrome of creatine transporter deficiency. *Mol Cell Biochem* 2003;244:45-48.

Derave W, Marescau B, Vanden Eede E, Eijnde BO, De Deyn PP, Hespel P. Plasma guanidino compounds are altered by oral creatine supplementation in healthy humans. *J Appl Physiol* 2004;97:852-857.

Dezortova M, Jiru F, Petrsek J et al. ¹H MR spectroscopy as a diagnostic tool for cerebral creatine deficiency. *MAGMA* 2008;21:327-332.

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;112:96-105.

Dhar SU, Scaglia F, Li FY et al. Expanded clinical and molecular spectrum of guanidinoacetate methyltransferase (GAMT) deficiency. *Mol Genet Metab* 2009;96:38-43.

Gregor P, Nash SR, Caron MG, Seldin MF, Warren ST. Assignment of the creatine transporter gene (SLC6A8) to human chromosome Xq28 telomeric to G6PD. *Genomics* 1985;25:332-333.

Item CB, Stöckler S, Stromberger C et al. Arginine:glycine amidinotransferase (AGAT) deficiency: the third inborn error of creatine metabolism in humans. *Am J Hum Genet* 2001;69:1127-1133.

Item CB, Mercimek-Mahmutoglu S, Battini R et al. Characterization of seven novel mutations in seven patients with GAMT deficiency. *Hum Mutat* 2004;23:524.

Junge W, Wilke B, Halabi A, Klein G. Determination of reference intervals for serum creatinine, creatinine excretion and creatinine clearance with an enzymatic and a modified Jaffé method. *Clin Chim Acta* 2004;344:137-148.

Kleefstra T, Rosenberg EH, Salomons GS et al. Progressive intestinal, neurological and psychiatric problems in two adult males with cerebral creatine deficiency caused by an SLC6A8 mutation. *Clin Genet* 2005;68:379-381.

Koga Y, Takahashi H, Oikawa D, Tachibana T, Denbow DM, Furuse M. Brain creatine functions to attenuate acute stress responses through GABAergic system in chicks. *Neuroscience* 2005;132:65-71.

Lagae L. What's new in: "Genetics in childhood epilepsy". *Eur J Pediatr* 2008; 167:715-722.

Leuzzi V. Inborn errors of creatine metabolism and epilepsy: clinical features, diagnosis and treatment. *J Child Neurol* 2002;17:3S89-3S97.

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; 375:153-155.

Lion-Francois L, Cheillan D, Pitelet G et al. High frequency of creatine deficiency syndromes in patients with unexplained mental retardation. *Neurology* 2006;67:1713-1714.

Loike J, Zalutsky D, Daback E, Miranda A, Silverstein S. Extracellular creatine regulates creatine uptake in rat and human muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:807-811.

Lunardi L, Parodi A, Perasso L 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.

Mancardi MM, Caruso U, Schiaffino MC et al. Severe epilepsy in X-linked creatine transporter defect (CRTR-D). *Epilepsia* 2007;48:1211-1213.

Mercimek-Mahmutoglu S, Muehl A, Salomons GS et al. Screening for X-linked creatine transporter (SLC6A8) deficiency via simultaneous determination of urinary creatine to creatinine ratio by tandem mass-spectrometry. *Mol Genet Metab* 2009;96:273-275.

Morris AA, Appleton RE, Power B et al. Guanidinoacetate methyltransferase deficiency masquerading as a mitochondrial encephalopathy. *J Inher Metab Dis* 2007;30:100.

Nash SR, Giros B, Kingsmore SF et al. Cloning, pharmacological characterization, and genomic localization of the human creatine transporter. *Receptors Channels* 1994; 2:165-174.

Neu A, Neuhoff H, Trube G et al. Activation of GABA(A) receptors by guanidinoacetate: a novel pathophysiological mechanism. *Neurobiol Dis* 2002;11:298-307.

Newmeyer A, Cecil KM, Schapiro M, Clark JF, Degrauw TJ. Incidence of brain CT deficiency in males with developmental delay referred for brain magnetic resonance imaging. *J Dev Behav Pediatr* 2005;26:276-282.

Ohtsuki S, Tachikawa M, Takanaga H et al. The blood-brain barrier creatine transporter is a major pathway for supplying creatine to the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:1327-1335.

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;974:37-42.

Perasso L, Adriano E, Ruggeri P, Burov SV, Gandolfo C, Balestrino M. In vivo neuroprotection by a creatine-derived compound: phosphocreatine-Mg-complex acetate. *Brain Res* 2009;1285:158-163.

Póo P, Arias A, Vilaseca MA et al. X-linked creatine transporter deficiency in two patients with severe mental retardation and autism. *J Inherit Metab Dis* 2006;29:220-223.

Puusepp H, Kall K, Salomons GS et al. The screening of SLC6A8 deficiency among Estonian families with X-linked mental retardation. *J Inherit Metab Dis* 2009; short report on line.

Rosenberg EH, Almeida LS, Kleefstra T, et al. High prevalence of SLC6A8 deficiency in X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* 2004;75:97-105.

Rosenberg EH, Martinez-Muñoz C, Betsalel OT et al. Functional characterization of missense variants in the creatine transporter gene (SLC6A8): improved diagnostic application. *Hum Mutat* 2007;28:890-896.

Salomons GS, van Dooren SJM, Verhoeven NM et al. X-linked creatine-transporter gene (SLC6A8) defect: A new creatine deficiency syndrome. *Am J Hum Genet* 2001; 68:1497-1500.

Salomons GS, van Dooren SJM, Verhoeven NM et al. X-Linked creatine transporter defect: An overview. *J Inherit Metab Dis* 2003;26:309-318.

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;74:413-419.

Schulze A. Creatine deficiency syndromes. *Mol Cell Biochem* 2003;244:143-150.

Schulze A, Hoffmann GF, Bachert P et al. Presymptomatic treatment of neonatal guanidinoacetate methyltransferase deficiency. *Neurology* 2006;67:719-721.

Schulze A, Battini R. Pre-symptomatic treatment of creatine biosynthesis defects. *Subcell Biochem* 2007;46:167-181.

Sedel F, Gourfinkel-An I, Lyon-Caen O, Baulac M, Saudubray JM, Navarro V. Epilepsy and inborn errors of metabolism in adults: a diagnostic approach. *J Inherit Metab Dis* 2007;30:846-854.

Sempere A, Fons C, Arias A et al. Creatine transporter deficiency in two adult patients with static encephalopathy. *J Inherit Metab Dis* 2009; short report on line

Sempere A, Fons C, Arias A et al. Cerebral creatine deficiency: First Spanish patients harbouring mutations in GAMT gene. *Med Clin (Barc)* 2009;133:745-749.

Sparrow SS, Balla DA, Cicchetti D. Vineland Adaptive Behavior Scales. Pearson Assessments, Bloomington, MN, Interview edition, 1984

Spillane M, Schoch R, Cooke M et al. 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.

Stead LM, Au KP, Jacobs RL, Brosnan ME, Brosnan JT. Methylation demand and homocysteine metabolism: effects of dietary provision of creatine and guanidinoacetate. *Am J Physiol* 2001;281:E1095-E1100.

Stöckler S, Holzbach U, Hanefeld F. Creatine deficiency in brain: a new treatable inborn error of metabolism. *Pediatr Res* 1994;36:409-413.

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;58:914-922.

Stöckler S, Schutz PW, Salomons GS. Cerebral creatine deficiency syndromes: clinical aspects, treatment and pathophysiology. *Subcell Biochem* 2007;46:149-166.

Stromberger C, Bodamer OA, Stöckler S. Clinical characteristics and diagnostic clues in inborn errors of creatine metabolism. *J Inherit Metab Dis* 2003;26:299-308.

Verbruggen KT, Sijens PE, Schulze A et al. Successful treatment of a guanidinoacetate methyltransferase deficient patient: findings with relevance to treatment strategy and pathophysiology. *Mol Genet Metab* 2007;91:294-296.

Verhoeven NM, Salomons GS, Jakobs C. Laboratory diagnosis of defects of creatine biosynthesis and transport. *Clin Chim Acta* 2005;361:1-9.

Walker JB. Creatine: biosynthesis, regulation, and function. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1979;50:177-242.

Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isozymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the "phosphocreatine circuit" for cellular energy homeostasis. *Biochem J* 1992;281:21-40.

Wu G, Morris SM Jr. Arginine metabolism: Nitric oxide and beyond. *Biochem J* 1998; 336:1-17.

Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatine metabolism. *Physiol Rev* 2000;80:1107-1213.

Anexo

(Otras publicaciones relacionadas con el tema, comunicaciones científicas a congresos)

- **Defectos del transportador de creatina. Respuesta al tratamiento con Arginina. Póster.** VII Congreso Nacional de la Asociación Española para el Estudio de los Errores Congénitos del Metabolismo (AECOM). Sevilla, Octubre 2007.
- o ñola para el Estudio de los Errores Congénitos del Metabolismo (AECOM). Sevilla, Octubre 2007.
- **Epilepsy spectrum in cerebral creatine transporter deficiency. Genotype correlation. Póster.** SSIEM Annual symposium. Lisboa, 2-5 September 2008
- **Response to creatine analogs supplementation in creatine transporter deficiency. Comunicación oral.** 37ème Reunión de la Societé Europeenne de Neurologie Pediatrique. Madrid, 3-4 Abril 2009.
- **Respuesta a la suplementación con análogos de la creatina en pacientes con defectos del transportador de creatina. Comunicación oral.** XXXIV Reunión anual de la Sociedad Española de Neurología Pediátrica. Bilbao, 28-29 Mayo de 2009.
- Sempere A, Fons C, Arias A, Rodríguez Pombo P, Colomer Artigas R, Merinero B, Alcaide P, Capdevila A, Ribes A, Artuch R, Campistol J. **Creatine transporter deficiency in two adult patients with static encephalopathy.** J Inherit Metab Dis 2009: en prensa
- Sempere A, Fons C, Arias A, Rodríguez Pombo P, Merinero B, Alcaide P, Capdevila A, Ribes A, Duque R, Eirís J, Poo P, Fernández Álvarez E, Campistol J, Artuch R. **Deficiencia cerebral de creatina: primeros pacientes españoles con mutaciones en el gen GAMT.** Med Clin (Barc) 2009: en prensa

Creatine transporter deficiency in two adult patients with static encephalopathy

A. Sempere · C. Fons · A. Arias ·
P. Rodríguez-Pombo · R. Colomer ·
B. Merinero · P. Alcaide · A. Capdevila ·
A. Ribes · R. Artuch · J. Campistol

Received: 24 October 2008 / Submitted in revised form: 27 January 2009 / Accepted: 29 January 2009 / Published online: 25 March 2009
© SSIEM and Springer 2009

Summary Creatine transporter deficiency is a recently identified X-linked inborn error of metabolism. The natural course of the disease is not well delineated since clinical data from adult patients have scarcely been reported. A progressive course of the disease has been noted in a few described cases. We report the first two Spanish adult patients with creatine transporter deficiency and compare their clinical phenotype and the evolution of the disease with those of other published cases. The two brothers were identified in a study of a cohort of 610 mentally handicapped male patients. The disease was detected by biochemical studies and confirmed by DNA studies. The most

significant clinical features were mental retardation, epilepsy and autistic behaviour, and these symptoms did not worsen, in contrast to other reports. They did not present gastrointestinal problems or movement disorders. Creatine transporter deficiency could be an underdiagnosed metabolic disorder and should be considered in adult patients with mental retardation. Clinical presentation of this disorder showed marked differences among adult patients and the course of the disease was static in our cases. Detection of additional adult patients might allow better understanding of the phenotypic outcome at a later age.

Abbreviations

¹H-MRS proton magnetic resonance spectroscopy
CRTR creatine transporter
DP direct punctuation
HPLC high-performance liquid chromatography

Communicating editor: Sylvia Stockler-Ipsiroglu

Competing interests: None declared

References to electronic databases: Creatine transporter (CRTR): OMIM 300036. X-linked Cr transporter deficiency: OMIM 300352

A. Sempere · C. Fons · R. Colomer · J. Campistol
Pediatric Neurology, Hospital Sant Joan de Déu,
and Centro de Investigación Biomédica en Red de
Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Esplugues, Spain

A. Arias · A. Ribes
Division of Inborn Errors of Metabolism (IBC),
Department of Biochemistry and Molecular Genetics,
Hospital Clínic and Centro de Investigación Biomédica en
Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII,
Barcelona, Spain

P. Rodríguez-Pombo · B. Merinero · P. Alcaide
Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares,
Departamento de Biología Molecular CBM-SO,
Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma and Centro de
Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras
(CIBERER), ISCIII, Madrid, Spain

A. Capdevila
Radiology Department, Hospital Sant Joan de Déu,
and Centro de Investigación Biomédica en Red de
Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII,
Esplugues, Spain

R. Artuch
Clinical Biochemistry, Hospital Sant Joan de Déu,
and Centro de Investigación Biomédica en Red de
Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII,
Esplugues, Spain

R. Artuch (✉)
Hospital Sant Joan de Déu,
Departamento de Bioquímica Clínica,
Passeig Sant Joan de Déu, 2,
08950 Esplugues, Barcelona, Spain
e-mail: rartuch@hsjdbcn.org

MS/MS	tandem mass spectrometry
SLC6A8	creatine transporter gene
TM	transmembrane
VABS	Vineland's adaptative behavioural scale

Introduction

Creatine transporter (CRTR; OMIM 300036) deficiency is a recently identified X-linked inborn error of metabolism and is caused by mutations in the creatine transporter gene (*SLC6A8*) (Salomons et al 2001). The clinical hallmarks of CRTR deficiency are mental retardation, epilepsy, autistic behaviour and language disorders (Rosenberg et al 2004), but there are marked differences among patients and the clinical spectrum of this disorder has not yet been well established.

Since the description of the first patient, more than 50 cases (Almeida et al 2004; Anselm et al 2006; Battini et al 2007; Campistol et al 2007; Clark et al 2006; deGrauw et al 2003; Kleefstra et al 2005; Lion-Francois et al 2006; Mancini et al 2005; Mancardi et al 2007; Newmeyer et al 2005; Póo-Argüelles et al 2006; Rosenberg et al 2004; Salomons et al 2003; Schiaffino et al 2005; Stromberger et al 2003) with CRTR deficiency have been reported worldwide, suggesting that the frequency of this disease might be relatively high in

selected populations (Arias et al 2007; Clark et al 2006; Lion-Francois et al 2006; Newmeyer et al 2005; Rosenberg et al 2004). However, only three families with adult patients have been described hitherto (DeGrauw et al 2003; Hahn et al 2002; Kleefstra et al 2005). Here we report the clinical, biochemical and molecular data of the first two Spanish adult patients with CRTR deficiency and compare their clinical phenotype and evolution of the disease with those of other published cases.

Patients

The patients were two male brothers, aged 27 and 40 years respectively (Fig. 1: cases II-1 and II-3), identified in institutions for mentally handicapped persons ($n = 610$ male patients). Their parents were consanguineous (first-degree cousins): The 66-year-old mother (I-2) had learning difficulties at the school, with normal physical examination now. The father (I-1) did not indicate any problem. They had seven children (5 male and 2 female). The brother (II-4) presented severe mental retardation, behaviour disturbances and refractory epilepsy from the first months of life. He died at 27 years of age in the course of an epileptic episode. The sister (II-2) also presented severe mental

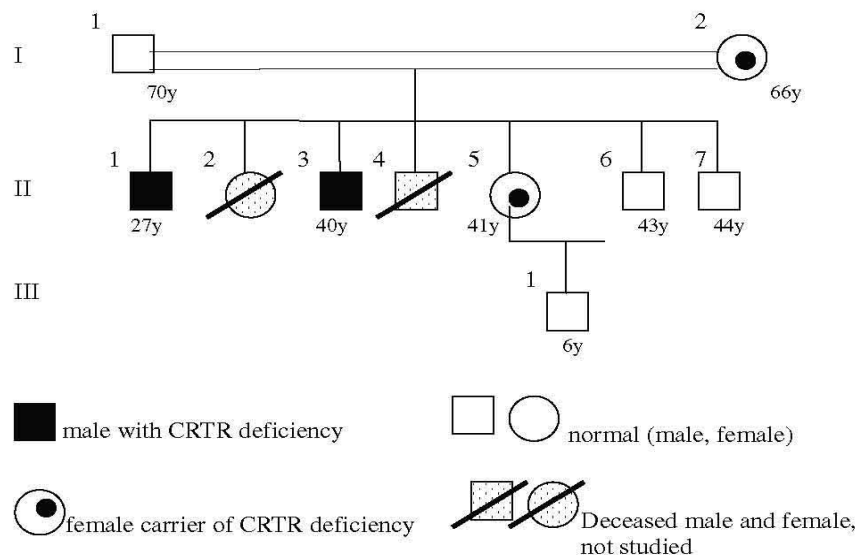


Fig. 1 Pedigree of the family. Patients 1 (II-1) and 2 (II-3) are the probands with creatine transporter deficiency (indicated by black squares). The mother (I-2) and the living sister (II-5) are

carriers (indicated by black circles). The deceased brother (II-4) was probably affected by CRTR deficiency, but the deceased sister (II-2) may be affected by another genetic disease

retardation and myelomeningocele, and deceased at 19 years of age of an unknown cause. No biochemical or genetic studies could be performed on these two siblings. Two further brothers (II-6, II-7), one sister (II-5) and her son (III-1) are at present healthy.

Pregnancy, delivery and neonatal period of our patients were uneventful. Their psychomotor development was retarded from the first months of life. They started to walk at 2 years of age, showed little interest in their surroundings, with behavioural disturbances in agreement with autistic disorder, and showed severely delayed language acquisition. Other physical, clinical and complementary examinations were normal. Both patients developed epilepsy. The first seizure appeared with fever in patient 1 (case II-1) at 17 months of age and in patient 2 (case II-3) at 23 months of age. After that, they suffered generalized tonic-clonic seizures and some epileptic status episodes until the age of 24 years in patient 1 and 4 years in patient 2, when they were controlled with antiepileptic drugs.

From infancy to adulthood, they improved in motor development, showing mild delay in acquisition. Language and social aspects evolved slowly, without acquisitions after the first years of life. At present, according to the results obtained with Vineland's adaptive behavioural scale (VABS), they have a profound mental retardation, with low results in four domains assessed: communication (direct points scored (DPS) = 24 in both patients), daily living skills (DP = 42 in both patients), socialization (DP = 34 in both patients) and motor skills (DP = 38 and DP = 39 respectively). They have not developed spoken language, having only 5–6 referential words and with poor communicative interest. They can understand only very simple instructions, they are not able to communicate using signs or gestures and they exhibit an autistic-like disorder with hyperactive behaviour. Neither gastrointestinal problems nor movement disorders were present. The clinical course has been static and our patients did not develop new symptoms after infancy. Patient 1 shows flat malar region with a

normal head circumference (55 cm; 10–25th centile) and patient 2 has microcephaly (52 cm; <3rd centile). Height, weight and other physical examination of both patients are normal.

Patients and methods

Patient information

A group of 610 unrelated male patients with mental retardation, based on DSM-IV criteria, of unknown cause from institutions for mentally handicapped persons were screened for creatine deficiency syndromes. Legal consent was obtained from all families that participated in the study. Biochemical and genetic investigations were performed following diagnostic protocols approved by the Ethics Committee of Hospital Sant Joan de Déu (Barcelona).

Biochemical analysis

Urine creatine analysis was performed by HPLC-MS/MS (Waters-Micromass, Manchester, UK, model Quatro micro API), as previously reported (Arias et al 2006). Creatinine determination was assayed with the Jaffé Kinetic procedure (A11A00060, ANX Diagnostic, Montpellier, France).

Creatine uptake by cultured fibroblasts was measured according to a previously reported procedure (Salomons et al 2001) with some modifications. Briefly, fibroblasts were incubated for 24 h in medium containing physiological and supraphysiological creatine concentrations (25 and 500 $\mu\text{mol/L}$, respectively). After trypsinization, the pellet was washed three times with saline solution and sonicated three times for 10 seconds each, and the supernatant was analysed by HPLC-MS/MS as previously reported (Arias et al 2006). The determinations were performed in triplicate. Protein concentration was measured by the method of Lowry.

Table 1 Biochemical enzymatic and molecular data of the two patients with CRTR deficiency

Biochemical and molecular studies	Patient 1	Patient 2	Reference values mean (interval) <i>n</i> (number of samples)
Creatine/creatinine ratio in urine	3.0	2.6	0.25 (0.02–1.2); <i>n</i> =59
Creatine uptake in fibroblasts ($\text{pmol}/\mu\text{g}$ protein)	25 $\mu\text{mol/L}$ creatine 500 $\mu\text{mol/L}$ creatine	Not done Not done	25 (15–49); <i>n</i> =24 36 (20–60); <i>n</i> =24
Mutation	c.1079- 1081delTCT	c.1079- 1081delTCT	
Effect on protein	p.Phe360del	p.Phe360del	

Genetic analysis

Genomic DNA from blood was used for samples. We designed primers to specifically amplify the *SLC6A8* exons and adjacent intronic sequences (GenBank reference NT_025965); these are available on request. Direct cycle sequencing of PCR fragments was performed with BigDye terminator v. 3.1 mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and analysed on an ABI Prism 3700 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Mutation nomenclature was in accordance with the Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>); cDNA numbering was based on +1 being the A of the initiation codon for GenBank sequence number NM 005629.1.

Neuroimaging studies

Cerebral creatine content in brain was measured by proton magnetic resonance spectroscopy (^1H -MRS), as previously reported (Newmeyer et al 2005).

Results

Biochemical findings from both patients are summarized in Table 1. Urinary creatine/creatinine ratio was increased, suggesting the diagnosis of CRTR deficiency. Brain ^1H -MRS revealed severely reduced creatine peak in the whole brain, indicating a creatine deficiency syndrome in both cases (Fig. 2).

Creatine uptake was studied in fibroblasts from patient 2. Results showed a value of 10% of controls. Mutation analysis of the *SLC6A8* gene in both patients identified a novel mutation consisting of a deletion of three nucleotides c.1079_1081delTCT in exon 7, which at the protein level predicts a deletion of a phenylalanine residue at position 360 (p.Phe360del). The deleted residue fulfilled several criteria to be considered as pathogenic on the basis of its predicted location in the putative transmembrane (TM) VII domain of CRTR (Swiss-Prot P48029), important for the protein function, and the high conservation of this region among the human Na^+ -dependent neurotransmitter transporters and other orthologous CRTR (Rosenberg et al 2004).

Urinary creatine/creatinine ratio was normal in the other brothers, the sister, the nephew and the mother. The creatine uptake was normal in fibroblasts from the mother. Segregation pattern of the nucleotide change

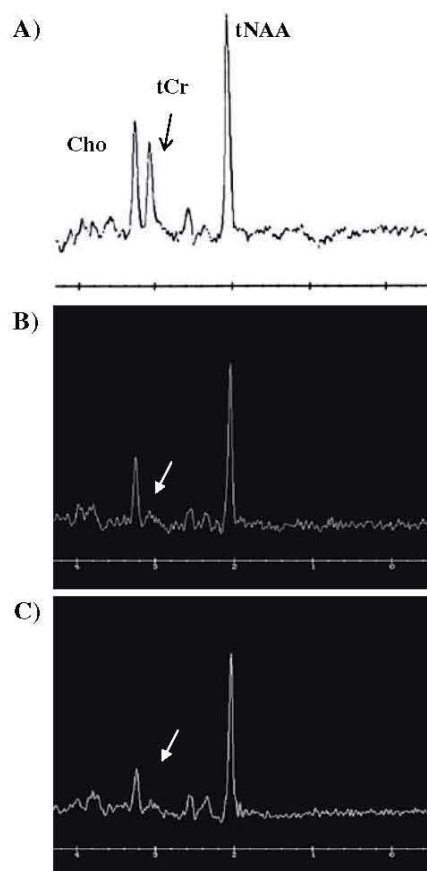


Fig. 2 Proton magnetic resonance spectroscopic imaging. A normal spectrum (A) is given for comparison: the peaks of choline (Cho: 3.2 ppm), creatine (tCr: 3.02 ppm) and *N*-acetylaspartate (NAA: 2.02 ppm) are indicated. Brain ^1H -MRS from patient 1 (B) and from patient 2 (C) shows a severely reduced creatine peak

(p. Phe360del) in living family members revealed that only the mother and the sister were heterozygous for the same variation (Fig. 1).

Discussion

Most reported cases of CRTR deficiency are children and only seven adult patients, from three families, have previously been documented (DeGrauw et al 2003; Hahn et al 2002; Kleefstra et al 2005). The clinical spectrum of this disease seems to be broader than was initially appreciated. Epilepsy in some cases was more pronounced, presenting with epileptic status (Anselm et al 2006) as occurred in our patients. In some cases,

microcephaly (Anselm et al 2006; Campistol et al 2007; DeGrauw et al 2003; Lion-Francois et al 2006; Schiaffino et al 2005), present in patient 2, and dysmorphic features with malar hypoplasia (Anselm et al 2006; Hahn et al 2002; Kleefstra et al 2005; Mancini et al 2005), as in patient 1, have been described. Other symptoms such as failure to thrive, height and weight less than the 3rd centile, hypotonia, weakness, myopathy and movement disorders previously reported in adults or patients with severe clinical phenotype (Anselm et al 2006; Hahn et al 2002; Kleefstra et al 2005) were not present in our cases.

Psychomotor development was delayed from the first months of life in all adult cases reported (DeGrauw et al 2003; Hahn et al 2002; Kleefstra et al 2005) as in our cases. Our patients evolved to severe mental retardation with expressive language difficulties and behavioural disturbances. However, there are some differences between clinical manifestations and clinical course in adults, since various characteristics such as myopathic facies, hyperextensible joints, soft skin and gastrointestinal problems (Hahn et al 2002; Kleefstra et al 2005) were not present in younger patients. Some authors (Kleefstra et al 2005) hypoth-

esize that the disease is progressive and gives rise to additional features at a later age. However, our adult patients did not have these clinical features. In the same way, in one previously reported family with older patients (Kleefstra et al 2005) the clinical course worsened at a later age and in another patient imaging studies suggested progressive atrophy of the brain. (DeGrauw et al 2003). However, our patients did not develop new symptoms after the first years of life and the course of the disease has been static to date. Although we do not have confirmatory data, the deceased brother (II-4) may have been affected with CRTR deficiency syndrome but with a much more severe evolution and outcome. Clinical data of our patients and comparison with the other reported adult patients are summarized in Table 2.

Female carriers of CRTR deficiency may present mild mental retardation with behavioural and learning problems (DeGrauw et al 2003; Hahn et al 2002; Mancini et al 2005; Salomons et al 2003), like the mother of our patients. However, the healthy sister, carrier of the mutation, did not exhibit behavioural or learning difficulties. The deceased sister (II-2) presented severe mental retardation and spina bifida, clinical

Table 2 Summary of clinical symptoms in adult male patients with CRTR deficiency

Features	DeGrauw et al (2003)	Hahn et al (2002)	Kleefstra et al (2005)	Present family	Total (%)
<i>General</i>					
Number of adult patients (per family)	1	4	2	2	9
Age at examination (years)	20	35–66	64, 68	27, 40	
<i>Neurological</i>					
Degree of mental retardation	Severe (1/1)	Severe (4/4)	Severe (2/2)	Severe (2/2)	Severe 9/9 (100)
Expressive language difficulties	1/1	4/4	2/2	2/2	9/9 (100)
Hypotonia	0/1	2/2	2/2	0/2	4/7 (57)
Seizures	1/1	4/4	0/2	2/2	7/9 (77)
Movement disorder: spastic/dystonic/ataxic	0/1	2/4	0/2	0/2	2/9 (22)
<i>Physical examination</i>					
Short stature	1/1	0/4	2/2	0/2	3/9 (33)
Low weight	0/1	0/4	1/2	0/2	1/9 (11)
Microcephaly	0/1	0/4	0/2	1/2	1/9 (11)
Midface hypoplasia/flat malar area	0/1	3/4	1/2	1/2	5/9 (55)
Myopathic facies	0/1	1/3	1/2	0/2	2/8 (25)
Ptosis	0/1	1/3	2/2	0/2	3/8 (37)
Stub thumb	0/1	3/4	0/2	0/2	3/9 (33)
Simian crease	0/1	0/4	1/2	0/2	1/9 (11)
Soft skin	0/1	3/3	1/2	0/2	4/8 (50)
Hyperextensible joints	0/1	3/3	1/2	0/2	4/8 (50)
<i>Other</i>					
Gastrointestinal problems	0/1	4/4	2/2	0/2	6/9 (66)
Behaviour disturbance/mood disorder	1/1	4/4	1/2	2/2	8/9 (89)
<i>Effect on protein of mutation in SLC6A8 gene</i>	p. Phe107del	p.Gly381Arg	p.Cys337Trp	p.Phe360del	

features not reported in female carriers, suggesting that she may be affected by another genetic disease, probably due to the parents' consanguinity.

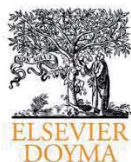
In all adult patients previously reported with CRTR deficiency, cerebral creatine content measured by ^1H -MRS showed absence/near-absence of the creatine peak, as we found in our patients. Minor and non-specific abnormalities such as hyperintense signal in white matter, thin corpus callosum, atrophy and delay of myelination have been reported (Anselm et al 2006; DeGrauw et al 2003; Lion-Francois et al 2006; Mancini et al 2005; Póo-Argüelles et al 2006; Salomons et al 2003; Schiaffino et al 2005), but were not present in our patients.

In conclusion, CRTR deficiency should be considered in adult patients with mental retardation, especially in those with epilepsy and autistic behaviour. Clinical presentation of this disorder shows marked differences among adult patients and might present a static evolution (as in the present cases) as well as progressive cases (DeGrauw et al 2003, Kleefstra et al 2005). A better clinical description of creatine transporter deficiency at adult age is important for the counselling of families in whom creatine transporter-deficient patients are being diagnosed. The identification and the clinical characterization of additional adult creatine transporter deficient patients are needed.

Acknowledgements We thank the patients' family and the institutions for mentally handicapped persons for their collaboration. The study was financially supported by grants FIS 05/1200, FIS PI051180 and CAIXA GIRONA. The groups are founded by the Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII.

References

- Almeida LS, Vearhoeven NM, Roos B, et al (2004) Creatine and guanidinoacetate: diagnostic markers for inborn errors in creatine biosynthesis and transport. *Mol Genet Metab* **82**: 214–219. doi:10.1016/j.ymgme.2004.05.001.
- Anselm IA, Alkuraya FS, Salomons GS, et al (2006) X-linked creatine transporter defect: A report on two unrelated boys with a severe clinical phenotype. *J Inherit Metab Dis* **29**: 214–219. doi:10.1007/s10545-006-0123-4.
- Arias A, Ormazabal A, Moreno J, et al (2006) Methods for the diagnosis of creatine deficiency syndrome: a comparative study. *J Neurosci Methods* **156**: 305–309. doi:10.1016/j.jneumeth.2006.03.005.
- Arias A, Corbella M, Fons C, et al (2007) Creatine transporter deficiency: prevalence among patients with mental retardation and pitfalls in metabolite screening. *Clin Biochem* **40**: 1328–1331. doi:10.1016/j.clinbiochem.2007.07.010.
- Battini R, Chilosi A, Mei D, et al (2007) Mental retardation and verbal dyspraxia in a new patient with de novo creatine transporter (*SLC6A8*) mutation. *Am J Med Genet A* **143A**: 1771–1774. doi:10.1002/ajmg.a.31827.
- Campistol J, Arias-Dimas A, Póo P, et al (2007) Deficiencia del transportador de creatina cerebral: una enfermedad neuro-metabólica infradiagnosticada. *Rev Neurol* **44**: 343–347.
- Clark AJ, Rosenberg EH, Almeida LS, et al (2006) X-linked creatine transporter (*SLC6A8*) mutations in about 1% of males with mental retardation of unknown etiology. *Hum Genet* **119**: 604–610. doi:10.1007/s00439-006-0162-9.
- deGrauw TJ, Cecil KM, Byars AW, Salomons GS, Ball WS, Jakobs C (2003) The clinical syndrome of creatine transporter deficiency. *Mol Cell Biochem* **244**: 45–48.
- Hahn KA, Salomons GS, Tackels-Horne D, et al (2002) X-linked mental retardation with seizures and carrier manifestations is caused by a mutation in the creatine transporter gene (*SLC6A8*) located in Xq28. *Am J Hum Genet* **70**: 1349–1356.
- Kleefstra T, Rosenberg EH, Salomons GS, et al (2005) Progressive intestinal, neurological and psychiatric problems in two adult males with cerebral creatine deficiency cause by an *SLC6A8* mutation. *Clin Genet* **68**: 379–381.
- Lion-Francois L, Cheillan D, Pitelet G, et al (2006) High frequency of creatine deficiency syndromes in patients with unexplained mental retardation. *Neurology* **67**: 1713–1714.
- Mancardi MM, Caruso U, Schiaffino MC, et al (2007) Severe epilepsy in X-linked creatine transporter defect (CRTR-D). *Epilepsia* **48**: 1211–1213.
- Mancini GM, Catsman-Berreoets CE, De Coe IF, et al (2005) 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**: 288–295.
- Newmeyer A, Cecil KM, Schapiro M, Clark JF, Degrauw TJ (2005) Incidence of brain creatine transporter deficiency in males with developmental delay referred for brain magnetic resonance imaging. *J Dev Behav Pediatr* **26**: 276–282.
- Póo-Argüelles P, Arias A, Vilaseca MA, et al (2006) X-linked creatine transporter deficiency in two patients with severe mental retardation and autism. *J Inherit Metab Dis* **29**: 220–223.
- Rosenberg EH, Almeida LS, Kleefstra T, et al (2004) High prevalence of *SLC6A8* deficiency in X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* **75**: 97–105.
- Salomons GS, Van Dooren SJ, Verhoeven NM, et al (2001) X-linked creatine transporter gene (*SLC6A8*) defect: a new creatine deficiency syndrome. *Am J Hum Genet* **68**: 1497–1500.
- Salomons GS, Van Dooren SJ, Verhoeven NM, et al (2003) X-linked creatine transporter defect: an overview. *J Inherit Metab Dis* **26**: 309–318.
- Schiaffino MC, Bellini C, Costabello L, et al (2005) X-linked creatine transporter deficiency: clinical description of a patient with a novel *SLC6A8* gene mutation. *Neurogenetics* **6**: 165–168.
- Stromberger C, Bodamer OA, Stockler-Ipsiroglu S (2003) Clinical characteristics and diagnostic clues in inborn error of creatine metabolism. *J Inherit Metab Dis* **26**: 299–308.



Nota clínica

Deficiencia cerebral de creatina: primeros pacientes españoles con mutaciones en el gen *GAMT*

Ángela Sempere^a, Carmen Fons^a, Ángela Arias^b, Pilar Rodríguez-Pombo^c, Begoña Merinero^c, Patricia Alcaide^c, Antoni Capdevila^d, Antonia Ribes^b, Rosario Duque^e, Jesús Eiris^f, Pilar Poo^a, Emilio Fernández-Álvarez^a, Jaume Campistol^a y Rafael Artuch^{g,*}

^aNeuropediatría, Hospital Sant Joan de Déu y Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Esplugues de Llobregat, Barcelona, España

^bDivisión de Errores Congénitos de Metabolismo (IBC), Departamento de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clínico y Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Barcelona, España

^cCentro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares, Departamento de Biología Molecular CBM-SO, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma y Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Madrid, España

^dRadiología, Hospital Sant Joan de Déu y Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Esplugues de Llobregat, Barcelona, España

^eServicio de Neurología Infantil, Hospital Universitario Nuestra Señora de La Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, España

^fServicio de Neurología Infantil, Hospital Clínico Universitario, Santiago de Compostela, España

^gBioquímica Clínica, Hospital Sant Joan de Déu y Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Esplugues de Llobregat, Barcelona, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 2 de abril de 2009

Aceptado el 25 de junio de 2009

Palabras clave:

Deficiencia de creatina
Epilepsia
Guanidinoacetato metiltransferasa
Resonancia magnética espectroscópica
Retraso mental

RESUMEN

Fundamento y objetivo: Los síndromes de deficiencia cerebral de creatina (Cr) constituyen un grupo de enfermedades neurometabólicas caracterizadas por deficiencia o ausencia de Cr en el cerebro. Cursan con retraso del desarrollo/mental y trastornos del lenguaje, y puede asociarse a epilepsia o a trastornos del movimiento. Se conocen 3 defectos: 2 de la síntesis —deficiencia de guanidinoacetato metiltransferasa (*GAMT*) y argininoglicina amidinotransferasa (*AGAT*)— y uno del transporte (*CRTR*). En este trabajo presentamos los 3 primeros pacientes españoles con deficiencia de *GAMT* y comparamos su fenotipo clínico y respuesta al tratamiento con otros casos publicados.

Pacientes y método: Los pacientes presentan retraso mental, epilepsia y conducta autista. La paciente 1 asocia corea grave.

El diagnóstico se realizó mediante estudios bioquímicos para cuantificar metabolitos específicos y actividad enzimática y genéticos del gen *GAMT*.

Resultados: En orina y plasma se detectó aumento de guanidinoacetato. La resonancia magnética con espectroscopia reveló reducción marcada de Cr cerebral. Los estudios enzimáticos mostraron disminución de la actividad *GAMT* en fibroblastos y el estudio molecular reveló mutaciones en el gen *GAMT*. Tras el diagnóstico, se inició tratamiento con suplemento de Cr, y se asoció en los pacientes 2 y 3 una dieta restringida en arginina y suplemento de ornitina, con mejoría parcial.

Conclusiones: Los pacientes con deficiencia de *GAMT* presentan un fenotipo inespecífico pero relativamente constante. Deben buscarse los síndromes de deficiencia cerebral de Cr en pacientes con retraso mental/psicomotor de etiología desconocida, especialmente si se acompañan de trastornos del movimiento y epilepsia. Es importante el diagnóstico precoz en casos tratables como la deficiencia de *GAMT*.

© 2009 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Cerebral creatine deficiency: First Spanish patients harbouring mutations in *GAMT* gene

A B S T R A C T

Keywords:

Creatine deficiency
Epilepsy
Guanidinoacetate methyltransferase
Magnetic resonance spectroscopy
Mental retardation

Background and objective: Brain creatine (Cr) deficiencies are a group of inborn errors of metabolism that are characterized by an absence or severe reduction of brain Cr. Clinically, these patients can display psychomotor/mental retardation and language disorders, commonly associated with epilepsy or movement disorders. Three metabolic defects are known: two affect synthesis – guanidinoacetate methyltransferase (*GAMT*) and glycine amidinotransferase (*AGAT*) deficiencies– and one affect the Cr transporter (*CRTR*). We present the first three Spanish patients with *GAMT* deficiency, and we compare their clinical phenotype and treatment response with other published cases.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: rartuch@hsjdbcn.org (R. Artuch).

Patients and method: The three patients presented mental retardation, epilepsy and autistic behaviour. Patient 1 also had severe chorea. Diagnosis was done by biochemical and genetic procedures (guanidinoacetate quantification, determination of GAMT activity and mutation analysis in the GAMT gene).

Results: An increase of guanidinoacetate was detected in urine and plasma. Brain magnetic resonance spectroscopy revealed low Cr levels. Enzymatic studies revealed a decreased GAMT activity in fibroblasts. Molecular analysis detected pathogenic mutations in the GAMT gene.

After the deficiency was confirmed, the patients started treatment with Cr. In addition, patient 2 and 3 received an arginine-restricted diet and ornithine supplements. All them showed a partial improvement.

Conclusions: Patients with GAMT deficiency have an unspecific but relatively constant clinical presentation. Brain Cr deficiency should be considered in patients with mental retardation of unknown aetiology, specially in those with movement disorders or epilepsy. Early diagnosis is important in cases with known treatment such as GAMT deficiency.

© 2009 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Los síndromes de deficiencia cerebral de creatina (Cr) constituyen un nuevo grupo de enfermedades neurometabólicas hereditarias que afectan a la síntesis y al transporte de Cr y se caracterizan por un defecto o ausencia de Cr y de Cr-fosfato en el cerebro.

La Cr se ingiere a través de los alimentos como carne y pescado, aunque también existe una síntesis endógena en el riñón, el hígado y el páncreas^{1,2}. En la biosíntesis de Cr están involucradas 2 enzimas: arginín-glicina amidinotransferasa (AGAT), que convierte arginina y glicina en ornitina y guanidinoacetato (GAA), y guanidinoacetato metiltransferasa (GAMT), que convierte GAA en Cr. Posteriormente, la Cr se transporta a los tejidos mediante el transportador de Cr³. La Cr desempeña un papel esencial en el almacenamiento y transmisión de fosfato de alta energía², participa en el crecimiento neuronal y en la elongación axonal⁴, actúa como neuroprotector⁵ y como neuromodulador⁶. Se conocen 3 defectos metabólicos que dan lugar a la deficiencia cerebral de Cr: 1) la deficiencia de la enzima AGAT (OMIM 602360; gen AGAT)⁷; 2) la deficiencia de la enzima GAMT (OMIM 601240; gen GAMT)⁸, que se heredan con patrón autosómico recesivo, y 3) el defecto en el transportador de Cr (OMIM 300352; gen transportador de Cr SLC6A8)⁹ con herencia ligada al cromosoma X.

Durante la pasada década se han iniciado los estudios diagnósticos de los síndromes de deficiencia de Cr cerebral en varios países. El defecto del transportador es el más frecuente¹⁰, tal y como se ha publicado previamente también en nuestro país¹¹. Respecto a los defectos de la síntesis, hasta el momento se han detectado 3 pacientes con deficiencia de GAMT y no se han diagnosticado deficiencias de AGAT en España. Presentamos los datos clínicos, bioquímicos y moleculares de estos 3 primeros pacientes españoles identificados con deficiencia de GAMT y comparamos su fenotipo clínico, la evolución de la enfermedad y la respuesta al tratamiento con otros casos publicados. Se diagnosticó a uno de los pacientes a los 45 años, este es el caso publicado de mayor edad. La descripción de este paciente aporta datos sobre el curso natural de esta enfermedad.

Pacientes y método

Pacientes

Paciente 1

Niña de 13 años, segunda hija de padres sanos, no consanguíneos, procedentes de las Islas Canarias. Refieren 2 familiares paternos con retraso mental.

Desde los primeros meses de vida presenta retraso psicomotor, con conducta dentro del espectro autista. Se escolariza en educación especial y alcanza autonomía en alimentación e

higiene. A los 7 años inicia crisis epilépticas parciales, que se controlan parcialmente con antiepilépticos. A los 12 años presenta movimientos involuntarios, inicialmente descritos por los padres como temblor de manos, desarrolla posteriormente una corea generalizada. A los 13 años se ingresa a la paciente por estatus epiléptico y corea grave generalizada que interfiere incluso el sueño, y requiere sonda nasogástrica para la alimentación. En la exploración destaca somatometría normal, sinofridia, hiperreflexia generalizada con reflejo cutáneo plantar extensor izquierdo y escoliosis dorsolumbar leve con marcha torpe. Su lenguaje es escaso, con palabras ininteligibles. Se realiza un electroencefalograma que muestra una actividad de fondo escasamente organizada con paroxismos de muy alta amplitud relacionados con movimientos clónicos de la extremidad superior izquierda, y ocasionalmente puntas-ondas atípicas en áreas posteriores. Se prueban diversos fármacos (carbameceptina, haloperidol, corticoides, etc.), pero sólo el tratamiento con midazolam muestra un ligero beneficio, y reaparecen los movimientos anormales a las horas de su suspensión.

Paciente 2

Niña de 10 años, hija única de padres sanos, no consanguíneos. El hijo previo del padre tiene retraso mental grave y síndrome de Lennox-Gastaut.

Tras un desarrollo inicialmente normal, a los 6 meses de vida comienza con sacudidas del tronco diarias, se diagnostica a los 14 meses de epilepsia mioclónica, con descargas bilaterales de polipunta y punta-onda en el electroencefalograma, que se controlan mediante la combinación de diferentes antiepilépticos (lamotrigina, clobazam, etosuximida y prednisona). A los 26 meses presenta retraso psicomotor con marcha aún inestable, manipulación torpe, lenguaje escaso con jerga incomprensible, pobre interés por comunicarse, sólo obedece órdenes muy simples y asocia inquietud motriz. A los 6 años inicia múltiples crisis de ausencias con mala respuesta al tratamiento antiepiléptico y asocia regresión en el desarrollo psicomotor. A los 10 años presenta retraso mental grave, con lenguaje escaso (palabras aisladas) y dificultades de conducta con rasgos dentro del espectro autista. Su crecimiento (talla, peso y perímetro craneal) es normal.

Paciente 3

Varón de 45 años, diagnosticado en el curso de un cribado de síndromes de deficiencia cerebral de Cr en una cohorte de 944 pacientes con retraso mental institucionalizados. Es el segundo hijo de padres sanos, no consanguíneos.

Refieren que presenta desde los primeros meses de vida retraso en el desarrollo psicomotor, y que adquiere sedestación a los 9 meses, marcha a los 2 años, con escasas palabras en el lenguaje expresivo y dificultades en las habilidades sociales. A los 2,5 años inicia crisis parciales, algunas con generalización secundaria, controladas parcialmente con antiepilépticos. Durante los años

siguientes se establece un cuadro de retraso mental profundo, con mayor afectación del lenguaje y un trastorno dentro del espectro autista.

A la edad de 45 años presenta un lenguaje expresivo limitado a 3–4 palabras y es incapaz de comprender palabras u órdenes simples. No muestra interés por el entorno ni por comunicarse, con conducta inquieta. Asocia crisis diarias (ausencias atípicas y crisis astáticas, cada pocos minutos), sin mejoría, con tratamiento antiepiléptico y precisa silla de ruedas para evitar las frecuentes caídas provocadas por estas crisis. En la exploración física destacan rasgos dismórficos, como hipoplasia malar y occipital plano, y escoliosis dorsolumbar izquierda sin otros hallazgos. Su perímetro craneal, peso y talla son normales.

Método

Información de los pacientes

Se ha obtenido el consentimiento informado de las familias de los 3 pacientes. El Comité Ético del Hospital Sant Joan de Déu (Barcelona) aprobó los estudios bioquímicos y genéticos que se realizaron según los protocolos diagnósticos.

Análisis bioquímico y genético

El análisis de Cr y GAA en orina se realiza mediante espectrometría de masas de triple cuádrupolo con ionización por electrospray (HPLC-MS/MS) (Waters-Micromass, Manchester, United Kingdom, modelo Quatro micro[®] API)¹². La actividad de GAMT se mide en fibroblastos según un procedimiento previamente publicado¹³. Se aísla ADN genómico a partir de sangre total o de fibroblastos de piel cultivados. Se diseñan oligonucleótidos para amplificar los exones y secuencias intrónicas adyacentes del gen *GAMT*. La nomenclatura utilizada sigue las recomendaciones de la Human Genome Variation Society (URL: <http://www.hgvs.org/mutnomen>). La numeración de la mutación se basa en la referencia de secuencia de ADN complementario (ADNc) (GenBank NM_000156.4).

Estudios de neuroimagen

El pico cerebral de Cr se determina mediante resonancia magnética (RM) con espectroscopia de protones (¹H-RMS)¹⁴. El equipo utilizado es 1.5 T Signa HD (General Electric, Milwaukee, Wisconsin, EE. UU.), con un posproceso mediante PROBE[®] (General Electric) con adquisiciones STEAM (30/1500) i PRESS (135/1500).

Resultados

En los estudios bioquímicos de orina y plasma se detectan concentraciones claramente aumentadas de GAA en plasma y orina, que indican el diagnóstico de deficiencia de GAMT (tabla 1).

La ¹H-RMS cerebral revela una reducción muy importante en el pico de Cr, y apoya el diagnóstico de síndrome de deficiencia de Cr cerebral en los 3 casos (fig. 1), mientras que la RM estructural es normal en todos estos casos.

La confirmación del diagnóstico se realiza mediante estudios enzimáticos, que muestran una disminución de la actividad GAMT en fibroblastos de los 3 pacientes. El estudio molecular revela las mutaciones causantes de la deficiencia de GAMT (tabla 1).

Tratamiento

Tras el diagnóstico de deficiencia de GAMT, los 3 pacientes inician un tratamiento con suplemento de Cr monohidrato oral (dosis de 400–500 mg/kg/día); los pacientes 2 y 3 reciben además una dieta restringida en arginina (15 mg/kg/día) y dosis bajas de ornitina (100 mg/kg/día), según protocolos previamente establecidos^{15,16}. En la paciente 1 desaparece la corea generalizada, aunque persisten, en ocasiones, distonias de las extremidades superiores. En los 3 pacientes ceden las crisis epilépticas y mejora también la conducta de forma paulatina: se muestran más atentos y colaboradores, y son capaces de realizar tareas simples. La paciente 2 es la que muestra mayor mejoría clínica con mejor atención, desarrollo de habilidades sociales, desarrollo de lenguaje con el uso de nuevas palabras e incluso frases simples y comprensión de órdenes sencillas, con lo que consigue desarrollar una autonomía parcial. Sin embargo, en los pacientes 1 y 3 persiste la ausencia de lenguaje expresivo, los rasgos autistas y el retraso mental profundo.

En la paciente 1 se pudo realizar una ¹H-RMS cerebral tras iniciar el tratamiento y se observa un aumento del pico de Cr cerebral (fig. 1).

Discusión

Los síndromes de deficiencia cerebral de Cr constituyen una entidad poco frecuente y claramente infradiagnosticada hasta la actualidad. Clínicamente, todos cursan con retraso del desarrollo/mental, más o menos marcado, y trastornos del lenguaje, que se diagnostican habitualmente en la edad pediátrica¹⁷.

Los pacientes con deficiencia de GAMT presentan un fenotipo clínico más grave, debido probablemente al efecto epileptógeno de la acumulación de GAA¹⁸, la activación de receptores ácido gammaaminobutírico subtipo a (GABA_A) por el GAA¹⁹ y su efecto inhibitorio sobre bomba sodio-potasio adenin-tri-fosfatasa (Na/K-ATPasa) y creatinasa²⁰. El retraso mental es la manifestación más frecuente, habitualmente grave, con ausencia o escaso lenguaje expresivo. La segunda manifestación más habitual es la epilepsia, que suele iniciarse en los primeros años de vida, se presenta con diferentes tipos de crisis, que pueden ser refractarias al tratamiento antiepiléptico. Menos frecuentes son los trastornos del movimiento extrapiramidales, presentes en la mitad de los

Tabla 1
Datos bioquímicos, enzimáticos y moleculares de 3 pacientes con deficiencia de guanidinoacetato metiltransferasa

	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Valor de referencia (intervalo)
GAA en orina, (mmol/mol creatinina)	228/359	201	374	n=37 (9-97)
GAA en plasma, μmol/l	11	12	18	n=35 (1,2-3,6)
Actividad GAMT en fibroblastos, (pmol/h/mg proteína)	2,8	3,7	4,1	n=6 (100-195)
Cambio nucleotídico	c.59G>C c.521G>A	c.145deIT c.145deIT	c.316C>T c.407C>T	
Efecto en la proteína	p.Trp20Ser p.Trp174Ter	p.Tyr49fs P.Tyr49fs	p.Gln106stop p.Thr136Met	

GAA: guanidinoacetato; GAMT: guanidinoacetato metiltransferasa.

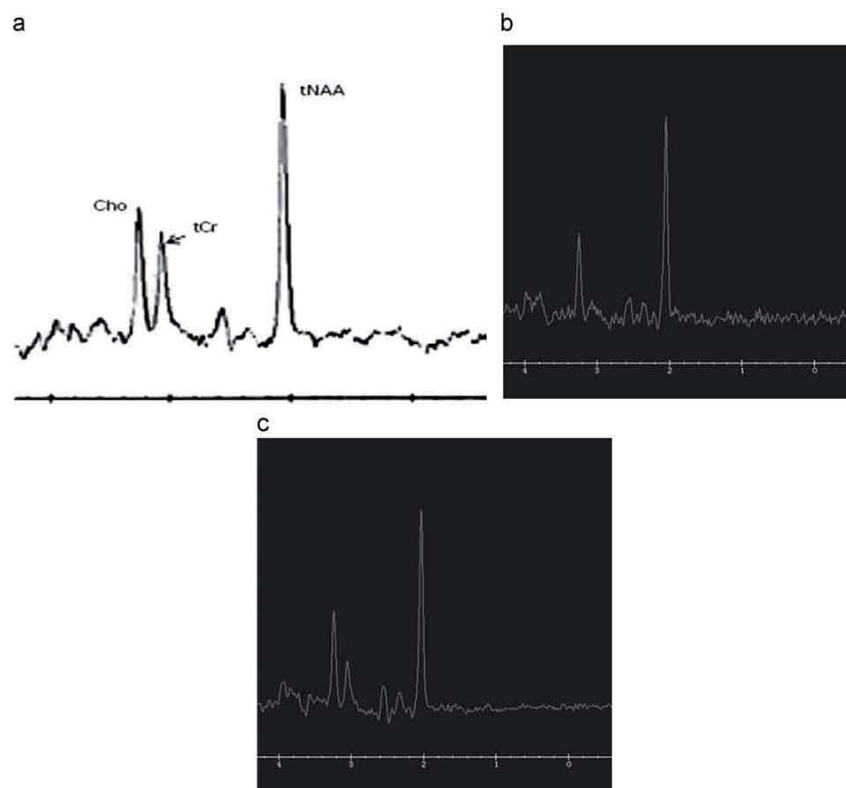


Figura 1. Resonancia magnética espectroscópica. a) Espectro normal: se indica el pico de colina (3,2 ppm), creatina (Cr: 3,02 ppm) y N-acetilaspártato (2,02 ppm). b) Muestra el pico de Cr reducido en el cerebro de la paciente 1, similar al encontrado en los pacientes 2 y 3. c) Aumento del pico de Cr cerebral tras inicio de tratamiento en la paciente 1.

pacientes y con evolución progresiva. Son frecuentes, también, la hiperactividad y los trastornos dentro del espectro autista^{15,16}.

Hasta ahora se han publicado alrededor de 40 pacientes con deficiencia de GAMT^{15,16,21-25}, la mayoría niños, por lo que el fenotipo clínico de este trastorno no está todavía bien definido y existe poca información de la evolución de la enfermedad. Clínicamente, nuestros pacientes son similares a los descritos previamente, presentan un fenotipo inespecífico pero relativamente constante entre los diferentes casos. Lo más interesante de nuestra casuística, además de ser los primeros pacientes diagnosticados en nuestro país, es que hemos podido diagnosticar el paciente de mayor edad (45 años) descrito hasta el momento. Sólo se han diagnosticado 10 pacientes mayores de 18 años¹⁵, por lo que nuestro caso puede permitir conocer mejor el curso natural de la enfermedad. Los pacientes adultos diagnosticados previamente presentan todos retraso mental, en la mayoría grave o profundo (9/10), al igual que en nuestro paciente 3. Además, presentan frecuentemente epilepsia (8/10), que, en ocasiones, como en nuestro caso, es refractaria al tratamiento antiepiléptico. Son frecuentes también los trastornos del movimiento extrapiramidales (6/10) que, por el contrario, no encontramos en nuestro paciente¹⁵. La evolución de estos pacientes puede ser estática o progresiva, como en nuestro paciente, en el que encontramos un empeoramiento progresivo, especialmente de la epilepsia, sin mejora hasta la instauración del tratamiento¹⁵.

Respecto al diagnóstico de la deficiencia de GAMT, éste se realiza mediante la determinación de GAA en plasma y orina, que muestra valores claramente aumentados respecto a los controles (tabla 1). Además, se observa una reducción intracerebral de la Cr mediante ¹H-RMS, si bien este hallazgo está presente en todos los defectos cerebrales de Cr¹⁷ y no permite el diagnóstico diferencial

entre las 3 enfermedades. En la RM craneal puede haber retraso de la mielinización y señales anormales en los ganglios de la base, especialmente en los globos pálidos^{15,16,24}. En otros casos la RM craneal es normal, incluso en pacientes adultos^{26,27}, al igual que en nuestros 3 pacientes.

La confirmación del diagnóstico de deficiencia de GAMT se realiza mediante estudios enzimáticos y moleculares^{13,28}. Se han descrito alrededor de 20 mutaciones en el gen *GAMT*^{15,16}, la más frecuente es c.59G>C^{15,22}, que está presente en heterocigosis en el paciente 1. Las 3 mutaciones (p.Tyr49fs, p.Gln106stop y p.Thr136Met) identificadas en los pacientes 2 y 3 son nuevas, y en ausencia de estudios de expresión su patogenicidad puede asumirse bien porque previsiblemente generarían un codón prematuro de parada de traducción y el consiguiente truncamiento de la proteína (p.Tyr49fs y p.Gln106stop), bien porque el cambio afecta a un residuo altamente conservado con otras proteínas ortólogas (p.Thr136Met). En cualquier caso, la presencia de estas mutaciones va asociada a una reducción drástica en la actividad enzimática (tabla 1) que apoya su patogenicidad. Se confirmó la herencia mendeliana en los padres del paciente 3, y en el caso del paciente 2 sólo se pudo confirmar la presencia de la mutación en la madre.

El tratamiento de los defectos de GAMT consiste en aumentar la Cr y disminuir los valores de GAA en el sistema nervioso central mediante suplemento oral con Cr monohidrato y dieta restringida en arginina. Además, el suplemento con dosis bajas de ornitina (100 mg/kg/día) previene un déficit de arginina necesario para el funcionamiento del ciclo de la urea, mientras que dosis altas de ornitina (800 mg/kg/día) tienen un efecto adicional en la disminución de los valores de GAA debido a la acción de *feedback* negativo sobre la enzima AGAT^{15,16}. El tratamiento puede ser

monitorizado mediante la determinación de la concentración de Cr y GAA en orina y plasma, y mediante estudios de $^1\text{H-RMS}$. En el seguimiento de nuestros pacientes observamos una mejoría clínica global, ya que la epilepsia y los trastornos del movimiento desaparecieron, aunque los pacientes no llegaron a presentar un desarrollo normal, tal y como se ha descrito en otros casos^{15,16}. Además, se ha demostrado que el inicio temprano del tratamiento se asocia a una respuesta más favorable²⁵, hecho que se confirma por el desarrollo normal que presentó un paciente tratado desde la primera semana de vida²¹. Por lo tanto, la evolución y el pronóstico parecen estar ligados a la edad en la que se inicia el tratamiento, y existe la posibilidad de realizar el diagnóstico prenatal de esta enfermedad²⁹. En nuestro caso, es la paciente 2, de menor edad, la que respondió mejor al tratamiento, mientras que en los pacientes 1 y 3 persistieron el retraso mental profundo y la afectación marcada del lenguaje.

En conclusión, es necesario aplicar procesos de cribado para la identificación de las deficiencias cerebrales de Cr, que son especialmente importantes en los casos tratables, como la deficiencia de GAMT. Deben buscarse los síndromes de deficiencia cerebral de Cr mediante análisis de metabolitos en orina en pacientes con retraso mental/psicomotor y afectación del lenguaje de etiología desconocida, especialmente si se acompañan de trastornos extrapiramidales del movimiento o epilepsia. Es importante un diagnóstico y tratamiento precoces para mejorar el pronóstico de estos enfermos.

Conflicto de intereses

Este estudio está financiado parcialmente por CAIXA GIRONA y por la fundación Alicia Koplowitz. El CIBERER es una iniciativa del Instituto de Salud Carlos III.

Agradecimientos

A las familias y a las instituciones para pacientes con retraso mental por su colaboración.

Bibliografía

- Balsom PD, Soderlund K, Ekblom B. Creatine in humans with special reference to creatine supplementation. *Sports Med*. 1994;18:268–80.
- Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev*. 2000;80:1107–213.
- Dai WX, Vinnakota S, Qian XJ, Kunze DL, Sarkar HK. Molecular characterization of the human CRT-1 creatine transporter expressed in *Xenopus* oocytes. *Arch Biochem Biophys*. 1999;361:75–84.
- Wang YE, Esbensen P, Bentley D. Arginine kinase expression and localization in growth cone migration. *J Neurosci*. 1998;18:987–98.
- Braissant O, Henry H, Villard AM, Zurich MG, Loup M, Eilers B, et al. Ammonium-induced impairment of axonal growth is prevented through glial creatine. *J Neurosci*. 2002;22:9810–20.
- Almeida LS, Salomons GS, Hogenboom F, Jakobs C, Schoffmeier AN. Exocytotic release of creatine in rat brain. *Synapse*. 2006;60:118–23.
- Item CB, Stockler-Ipsiroglu S, Stromberg C, Muhl A, Alessandri MG, Bianchi MC, et al. Arginine: Glycine amidinotransferase deficiency: The third inborn error of creatine metabolism in humans. *Am J Hum Genet*. 2001;69:1127–33.
- Stöckler S, Holzbach U, Hanefeld F, Marquardt I, Helms G, Requart M, et al. Creatine deficiency in the brain: A new, treatable inborn error of metabolism. *Pediatr Res*. 1994;36:409–13.
- Salomons GS, Van Dooren SJ, Verhoeven NM, Cecil KM, Ball WS, Degrauw TJ, et al. X-linked creatine transporter gene (SLC6A8) defect: A new creatine deficiency syndrome. *Am J Hum Genet*. 2001;68:1497–500.
- Clark AJ, Rosenberg EH, Almeida LS, Wood TC, Jakobs C, Stevenson RE, et al. X-linked creatine transporter (SLC6A8) mutations in about 1% of males with mental retardation of unknown etiology. *Hum Genet*. 2006;119:604–10.
- Campistol J, Arias-Dimas A, Póo P, Pineda M, Hoffman M, Vilaseca MA, et al. Deficiencia del transportador de creatina cerebral: una enfermedad neurometabólica infradiagnosticada. *Rev Neurol*. 2007;44:343–7.
- Arias A, Ormazabal A, Moreno J, González B, Vilaseca MA, García-Villoria J, et al. Methods for the diagnosis of creatine deficiency syndromes: A comparative study. *J Neurosci Methods*. 2006;156:305–9.
- 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;58:914–22.
- 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;26:276–82.
- Mercimek-Mahmutoglu S, Stoeckler-Ipsiroglu S, Adami A, Appleton R, Araújo HC, Duran M, et al. GAMT deficiency: Features, treatment, and outcome in an inborn error of creatine synthesis. *Neurology*. 2006;67:480–4.
- Dhar SU, Scaglia F, Li FY, Smith L, Barshop BA, Eng CM, et al. Expanded clinical and molecular spectrum of guanidinoacetate methyltransferase (GAMT) deficiency. *Mol Genet Metab*. 2009;96:38–43.
- Stockler S, Schutz PW, Salomons GS. Cerebral creatine deficiency syndromes: Clinical aspects, treatment and pathophysiology. *Subcell Biochem*. 2007;46:149–66.
- 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;74:413–9.
- Neu A, Neuhoff H, Trube G, Fehr S, Ullrich K, Roeper J, et al. Activation of GABA (A) receptors by guanidinoacetate: A novel pathophysiological mechanism. *Neurobiol Dis*. 2002;11:298–307.
- Zugno AI, Scherer EB, Schuck PF, Oliveira DL, Wofchuk S, Wannmacher CM, et al. Intrastratial administration of guanidinoacetate inhibits Na^+ , K^+ -ATPase and creatine kinase activities in rat striatum. *Metab Brain Dis*. 2006;21:41–50.
- Schulze A, Hoffmann GF, Bachert P, Kirsch S, Salomons GS, Verhoeven NM, et al. Presymptomatic treatment of neonatal guanidinoacetate methyltransferase deficiency. *Neurology*. 2006;67:719–21.
- Almeida LS, Vilarinho L, Darmin PS, Rosenberg EH, Martínez-Muñoz C, Jakobs C, et al. A prevalent pathogenic GAMT mutation (c.59G>C) in Portugal. *Mol Genet Metab*. 2007;91:1–6.
- Vodopitzi J, Item CB, Häusler M, Korall H, Bodamer OA. Severe speech delay as the presenting symptom of guanidinoacetate methyltransferase deficiency. *J Child Neurol*. 2007;22:773–4.
- Morris AA, Appleton RE, Power B, Isherwood DM, Abernethy LJ, Taylor RW, et al. Guanidinoacetate methyltransferase deficiency masquerading as a mitochondrial encephalopathy. *J Inher Metab Dis*. 2007;30:100.
- Verbruggen KT, Knijff WA, Soorani-Lunsing RJ, Sijens PE, Verhoeven NM, Salomons GS, et al. Global developmental delay in guanidinoacetate methyltransferase deficiency: Differences in formal testing and clinical observation. *Eur J Pediatr*. 2007;166:921–5.
- Caldeira Araújo H, Smit W, Verhoeven NM, Salomons GS, Silva S, Vasconcelos R, et al. Guanidinoacetate methyltransferase deficiency identified in adults and a child with mental retardation. *Am J Med Genet A*. 2005;133A:122–7.
- Schulze A, Bachert P, Schlemmer H, Hartling I, Polster T, Salomons GS, et al. Lack of creatine in muscle and brain in an adult with GAMT deficiency. *Ann Neurol*. 2003;53:248–51.
- Verhoeven NM, Ross B, Struys EA, Salomons GS, Van der Knaap MS, Jakobs C. Enzyme assay for diagnosis of guanidinoacetate methyltransferase deficiency. *Clin Chem*. 2004;50:441–3.
- Cheillan D, Salomons GS, Acquaviva C, Boisson C, Roth P, Cordier MP, et al. Prenatal diagnosis of guanidinoacetate methyltransferase deficiency: Increased guanidinoacetate concentrations in amniotic fluid. *Clin Chem*. 2006;52:775–7.

