



## Defectos Genéticos en la biosíntesis y transporte de la Creatina

### Genetic Defects in the biosynthesis and transport of Creatine

Martínez Lidia Dora<sup>1,2</sup>, Raquel Dodelson de Kremer<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Odontología. Cátedra "B" de Biología Celular.

<sup>2</sup>Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Médicas. Hospital de Niños. Centro de Estudio de las Metabolopatías Congénitas (CEMECO).

#### Abstract

Creatine Deficiency Genetic Defect (CDGD) constitute a new chapter in Medical Genetics; this refers to a group of genetic pathologies in the metabolism of creatine synthesis: deficiency in the arginine:glycine amidinotransferase (dAGAT), deficiency in guanidinoacetate methyltransferase (dGAMT) and creatine transport deficiency (dCRTR). Both dAGAT and dGAMT are inherited in autosomal recessive form, while transmission of dCRTR is bound to the X chromosome. The most frequent clinical manifestations include mental retardation, epilepsy, language alteration, autism and hypotony. The integrated research protocol consists of: I- selection of compatible patients, II- biochemical analyses, III- proton magnetic resonance spectroscopy, IV- enzymatic activity dosage in dAGAT, dGAMT and the functionality of the transporter in dCRTR, V- molecular analysis. The purpose of this review is to update the biochemical, enzymatic and molecular studies to enable the identification and characterization of these severe neurological diseases, irreversibly evolutionary if undiagnosed, and not as yet described in our environment. The methodology used for the detection of DGDCs consists of clinical procedures of selection; mensuration of guanidinoacetate, creatine by gas chromatography and creatinine; enzymatic activity dosage in dAGAT, dGAMT and the functionality of the transporter in dCRTR. Experience indicates that the extraordinary clinical heterogeneity and biochemical complexity requires research programmed within a specific protocol, justified by the serious neurological compromise involved and the therapeutic management possible in dAGAT and dGAMT.

**KEY WORDS:** guanidinoacetate methyltransferase, glycine: arginine amidinotransferase, creatine transporter, saliva, neurometabolic disease.

#### Resumen

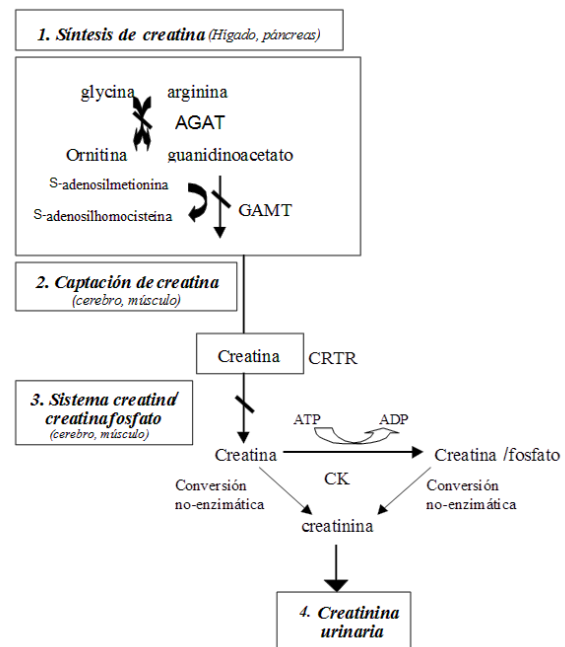
Los defectos genéticos de deficiencia de creatina (DGDC), constituyen un capítulo de la Genética Médica que refiere a un grupo de patologías genéticas del metabolismo en la biosíntesis y transporte de la creatina; comprende deficiencias en dos enzimas: arginino:glicino amidinotransferasa (d-AGAT), y guanidinoacetato metiltransferasa (d-GAMT) y la deficiencia en el transportador de la creatina (d-CRTR). Las d-AGAT y d-GAMT se heredan ambas en forma autosómica recesiva, mientras que la d-CRTR es de transmisión ligada al cromosoma X. Las manifestaciones clínicas más frecuentes incluyen, retardo mental, epilepsias, sugiriendo mayor compromiso de la sustancia gris cerebral, alteración del lenguaje, autismo e hipotonía. Un parámetro químico común de los DGDC es la deficiencia de creatina cerebral que se demuestra por espectroscopía de resonancia magnética protónica "in vivo" (ERM H<sup>1</sup>). El propósito de este trabajo es realizar una actualización de los estudios bioquímicos, enzimáticos y moleculares, que permitan la identificación y caracterización de estas severas enfermedades neurológicas, irreversiblemente evolutivas si no son diagnosticadas, además se pretende realizar un análisis de la saliva en el estudio de los DGDC en forma complementaria con el plasma y la orina. La metodología utilizada para la detección de los DGDC consta en esencia: I-

seleccionar pacientes con compatibilidad fenotípica, II- analizar el perfil bioquímico, a través de la medición del guanidinoacetato, que permite diferenciar entre d-GAMT (alta concentración), la d-AGAT (baja concentración) y la d-CRTR (concentración normal), creatina y creatinina en plasma, orina y saliva, III- efectuar la ERM H<sup>1</sup>, IV- definición del probable defecto genético mediante el ensayo de la específica actividad enzimática en saliva, V- realizar el análisis molecular del gen correspondiente. La importancia estimada de cumplimentar el algoritmo diagnóstico estriba en la disponibilidad de una terapia eficaz para las d-GAMT y d-AGAT, el circunscribir las familias involucradas y brindar el correcto asesoramiento genético. Resulta importante además, el desarrollo de un área genética no explorada con anterioridad en nuestro medio y de gran impacto asistencial y académico.

**PALABRAS CLAVE:** guanidinoacetato metiltransferasa, arginina:glucina amidinotransferasa, transportador de creatina, saliva, enfermedad neurometabólica.

## Introducción

La creatina (Cr), también denominada  $\alpha$  metil guanidino- acético, es un compuesto nitrogenado del grupo de las aminos no esencial. En el organismo humano, el 50 % es obtenido exógenamente a través de los alimentos tales como la carne roja, pescado y otros productos de origen animal y el otro 50 % se sintetiza endógenamente. La biosíntesis de Cr tiene lugar mayoritariamente en el hígado, el páncreas y los riñones. En la biosíntesis de Cr están involucrados tres aminoácidos, arginina, glicina, metionina y además, participan dos enzimas; L-arginino:glucino amidinotransferasa (AGAT), S-adenosil-L-metionina:N-guanidinoacetato metiltransferasa (GAMT) y el transportador de creatina (TCr) (Fig.1). La AGAT cataliza la transaminación reversible del grupo guanidino de la arginina a la glicina produciendo guanidinoacetato (GAA) y ornitina. El GAA es metilado por acción de la GAMT, siendo el donante del grupo metilo la S-adenosil-L-metionina para producir Cr y S-adenosil-L-homocisteína. La Cr llega al músculo y al cerebro a través de un sistema de transporte activo en el que participan proteínas transportadoras dependientes de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>. Las células de los tejidos arriba mencionados contienen una actividad alta de creatina kinasa (CK). La enzima CK cataliza la fosforilación de Cr a creatina fosfato (CrP), a través del sistema ATP/ADP, de esta manera se provee un sistema buffer fosfato de alta energía durante la síntesis y utilización del ATP; la Cr y CrP se degrada intracelularmente en forma no-enzimática a creatinina (Crn) <sup>1-3</sup>.



**Figura 1.** Vías Metabólicas de la Creatinina/Creatinina-Fosfato AGAT, arginino:glucino amidinotransferasa; GAMT, guanidinoacetato metiltransferasa; CRTR, transportador de creatina; CK, creatina kinasa.

El sistema Cr/CrP/CK, juega un rol esencial en el almacenamiento y transmisión de fosfatos de alta energía. Por ende, la síntesis y el transporte de Cr constituyen una parte integral del metabolismo energético general <sup>4</sup>. En el SNC, la Cr está involucrada en el crecimiento neuronal, en la elongación axonal, en la actividad Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa, en el mantenimiento del potencial de membranas, teniendo función neuromoduladora <sup>5,6</sup>.

En la actualidad, se conocen tres desórdenes metabólicos que provocan los Defectos Genéticos de Deficiencia de Creatina (DGDC), presentando una característica común en estas patologías genéticas, la falta de Cr/CrP en el cerebro<sup>7</sup>. Los dos primeros desórdenes identificados afectan, por un lado, la biosíntesis y por el otro la proteína transportadora de Cr, cuya función es trasladar la Cr al interior de las células. La primera patología hereditaria detectada en humanos relacionada a la biosíntesis de Cr fue la *deficiencia en GAMT* (d-GAMT)<sup>8-11</sup>, bioquímicamente caracterizada por presentar ausencia de Cr y acumulación de GAA en fluidos biológicos y cerebro, cuya concentración lo torna un compuesto neurotóxico<sup>12, 13</sup>. La enzima GAMT se expresa en hígado, riñón y páncreas, en menor proporción en cerebro, linfocitos, fibroblastos y otros tejidos, se hereda en forma autosómica recesiva<sup>4</sup>. El gen en humanos fue mapeado en el cromosoma 19p13.3, tiene un tamaño de ~ 5 kb, con seis exones que codifican para una proteína de 237 aminoácidos<sup>14</sup>.

El segundo defecto genético descrito es la *deficiencia en CTR* (d-CTR), causado por defectos en el *transportador del Cr*. Dos transportadores de Cr se han identificado, ambos son miembros de la familia de proteínas transportadoras de neurotransmisores; la herencia es recesiva ligada al cromosoma X; en las portadoras se han encontrado problemas de aprendizaje y/o de comportamiento<sup>15, 16</sup>. El gen que codifica para la proteína transportadora de la Cr, conocido como *SLC6A8*, ha sido mapeado en el Xq28; contiene 13 exones que codifican para una proteína de 635 aminoácidos con 12 dominios transmembrana, se expresa en la mayoría de los tejidos, en altos niveles en el músculo esquelético, riñón y baja actividad en colon, cerebro, corazón y próstata<sup>17</sup>.

El tercer defecto genético reportado en la biosíntesis capaz de producir alteraciones en el metabolismo de la Cr es: *deficiencia en AGAT* (d-AGAT), que cataliza el primer paso en la biosíntesis de Cr. Bioquímicamente se caracteriza por una baja concentración de Cr y GAA en fluidos biológicos<sup>18</sup>, el tipo de herencia es autosómica recesiva<sup>17</sup>, el gen se localiza en el cromosoma 15q21.1, contiene nueve exones<sup>20, 21</sup>.

El reconocimiento temprano de pacientes con DGDC es de gran importancia para la estimación de las frecuencias alélicas en nuestra población, para comprender las variaciones fenotípicas y

principalmente las estrategias de tratamiento a seguir en cada caso en particular. La dGAMT y dAGAT son patologías tratables que tienen terapia eficaz con la administración de Cr oral, siendo tratamientos de muy bajo costo<sup>22-26</sup>, por lo tanto, es importante destacar la importancia de ser diagnosticadas en los primeros meses de vida, de lo contrario llevan a una discapacidad psicomotora-emocional invalidante, que genera implicancias económicas y sociales. En la D-CTR se utilizan terapias que mejoran los síntomas musculares pero no las alteraciones cognitivas y las manifestaciones psiquiátricas<sup>27-29</sup>.

Las comunicaciones de pacientes con DGDC pertenecen a EEUU, Reino Unido y otros países europeos. En nuestra población y de acuerdo a nuestro conocimiento en el resto de Latinoamérica no se encontraron trabajos previos sobre DGDC; por ende, este trabajo representa el primer abordaje a un nuevo capítulo de la Genética Neuro-metabólica de implicancias directas en la práctica asistencial como así mismo en su contenido académico.

El diagnóstico de los primeros pacientes con DGDC se realizó mediante espectroscopia protónica por resonancia magnética *in vivo* (ERM-H1), procedimiento costoso y no siempre disponible en la práctica clínica<sup>11</sup>. Para arribar al diagnóstico del sujeto involucrado se debe cumplimentar con el algoritmo de los DGDC (Fig. 2)<sup>30</sup>, para ello, la estrategia de selección de pacientes está basada en el fenotipo clínico, este debe incluir un amplio espectro de síntomas entre ellos; retraso mental leve a severo, epilepsias en ciertos casos no responsivos a los anticonvulsivantes convencionales en especial en d-GAMT, autismo, retraso en el desarrollo y en el lenguaje, trastorno del movimiento e hipotonía entre otros (Tabla 1)<sup>13, 31</sup>. Posteriormente se debe analizar el perfil bioquímico de los presuntos sujetos involucrados, mediante la determinación de los metabolitos Cr, Crn y GAA en diferentes fluidos biológicos entre ellos orina, plasma y recientemente en saliva<sup>32, 33, 34</sup>, que permita identificar a los pacientes en los que se deberá confirmar la ausencia de Cr y CrP en cerebro mediante ERM H<sup>1</sup> *in vivo*<sup>35, 36, 37</sup>. Los procedimientos bioquímico más utilizados en la aproximación diagnóstica de estas enfermedades se basan en la cromatografía de gases<sup>34, 38</sup>, cromatografía de gases/espectrometría de masa

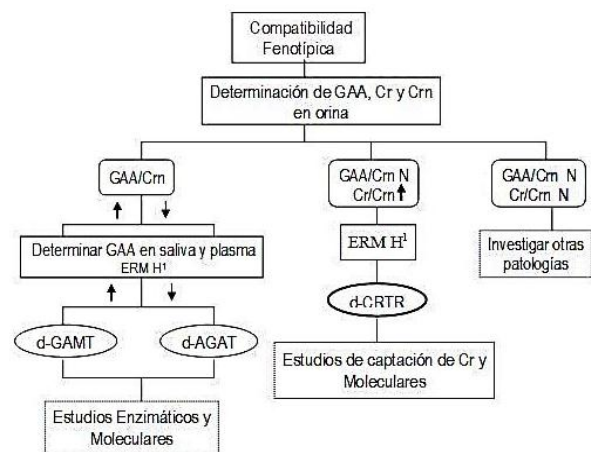
(CG/MS)<sup>33-40</sup>, cromatografía líquida de alta resolución (CL-MS/MS)<sup>32, 42</sup> y espectrometría de masa de triple cuadrupolo con ionización por electrospray (HPLC-MS/MS)<sup>43</sup>, posteriormente se realiza la determinación de las actividades enzimáticas de AGAT<sup>44</sup> y GALT<sup>42, 45</sup>; la medición de la funcionalidad del transportador TCr a partir de cultivo de fibroblastos, a través de la incorporación de Cr en cultivo de fibroblastos<sup>46</sup>. La confirmación del diagnóstico del probando y la identificación de portadores se realiza a través del análisis molecular del gen pertinente al tipo de DGDC identificado en linfoblastos y/o fibroblastos<sup>24, 47- 49</sup>.

La saliva es un biofluido ampliamente reconocido como potencial medio de diagnóstico de desórdenes orales y enfermedades sistémicas de diferente etiología. La presencia en la saliva de biomarcadores específicos, proteómicos y genómicos que se encuentran íntimamente asociados a los procesos de salud-enfermedad, permite ser utilizada para la detección precoz de algunas enfermedades entre ellas el cáncer oral, el Síndrome de Sjögren, fibrosis quística, hiperlipemias y disfunciones hormonales<sup>50, 51</sup>. El desarrollo tecnológico actual ha influenciado extraordinariamente sobre el avance en la utilización de la saliva como biofluido diagnóstico, que permite discriminar en forma rápida los biomarcadores, analizar muestras pequeñas (microfluido), de alta sensibilidad y especificidad, de fácil manejo y bajo costo<sup>52</sup>, a su vez medir y comparar con los valores de los componentes séricos<sup>53</sup>. Estudios realizados recientemente en algunas patologías de atesoramiento lisosomal diagnosticadas en el Centro de Estudios de las Metabolopatías Congénitas de Córdoba, a como la Lipofuscinosis Neuronal Ceroidea<sup>54, 55</sup> y la expansión de estos hallazgos en los DGDC<sup>34</sup>, indicaron la factibilidad de separar, identificar y cuantificar los compuestos involucrados en el metabolismo de la Cr en saliva, con las obvias connotaciones de utilizar un procedimiento no invasivo, de fácil obtención, que permite el reconocimiento precoz de los DGDC en nuestro medio.

**Tabla 1.** Características clínicas de los defectos genéticos de deficiencia de creatinina

	d-GALT	d-AGAT	d-CRTR
Tipo de herencia	AR	AR	Ligada-
Retraso desarrollo	+	+	X
Retardo mental	+	+	+
Conducta autista	+	-	+
Retraso en el lenguaje	+	+	+
Convulsiones	+	+	+
Hipotonía	+	+	+
Signos piramidales y extrapiramidales	+	-	+
Incremento circunferencia cefálica	-	-	-
IMR: Señal anormal en ganglios basales (Globus pallidus)	+	-	+
EEG: baja actividad	-	-	-

Ref.: presencia (+), ausencia (-). Abreviaturas: d-AGAT: deficiencia en arginino:glicino amidinotransferasa; d-GALT: deficiencia en guanidinoacetato metiltransferasa; d-CRTR: deficiencia en el transportador de creatina, AR: autosómica recesiva.



**Figura 2.** Algoritmo correspondiente a los Desórdenes de Deficiencia Cerebral de Creatina (DGDC). Adaptado de Verhoeven et al. 2005 (Clin. Chim. Acta. 362: 1-9) y modificado. Símbolos GAA: guanidinoacetato, Cr: creatina, Crn: creatinina, d-GALT: deficiencia en guanidinoacetato metiltransferasa, d-AGAT: deficiencia en arginino:glicino amidinotransferasa, d-CRTR: deficiencia transportador de creatina.

La presente revisión bibliográfica es inédita en nuestro medio y en el país y pretende contribuir al reconocimiento, tratamiento y correcto

asesoramiento genético del paciente y de las familias involucradas. La falta de diagnóstico o diagnóstico equivocado de estas enfermedades tienen implicancias enormes no sólo médicas sino socio-económicas por la invalidez permanente que provocan.

### Agradecimientos

Subsidio de Secretaria de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Cod. 05/H258.

*Todos los autores declaran que no existen conflictos potenciales de interés con respecto a la autoría y / o publicación de este artículo.*

*All authors declare no potential conflicts of interest with respect to the authorship and/or publication of this article*

### References

- Andres AH, Ducray AD, Schlattner U, Walliman T. Functions and effects of creatine in the central nervous system. *Brain Research Bulletin* 2008; 76: 329- 343.
- Verhoeven NM, Salomons GS, Jakobs C. Laboratory diagnosis of defects of creatine biosynthesis and transport. *Clin Chim Acta* 2005; 361: 1-9.
- Nabuurs CI, Choe CU, Veltien A, Kan HE, van London LJC, Rodenburg RJT, Matschke J, Wieringa B, Kemp GJ, Isbrandt D, Heerschap A. Disturbed energy metabolism and muscular dystrophy caused by pure creatine deficiency are reversible by creatine intake. *J Physiol* 2013; 591: 571- 592.
- Wyss M, Kaddurak-Daouk R. Creatine and Creatinine Metabolism. *Physiol Rev* 2000; 80(3):1107-1213.
- 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.
- Van de Kamp JM, Jacobs C, Gibson KM, Salomons GS. New insights into creatine transporter deficiency: the importance of recycling creatine in the brain. *J Inherit Metab Dis*. 2013; 155- 156.
- Schulze A. Creatine deficiency syndromes. *Mol Cell Biochem* 2003; 244: 143- 150.
- Stöckler S, Holzbach U, Hanefeld F, Marquardt I, Helms G, Reuquart M, Hänicke W, Frahm J. Creatine deficiency in the brain: a new, treatable inborn error of metabolism. *Pediatr Res* 1994; 36: 409-413.
- Stockler S, Marescau B, De Deyn PP, Trijbels JMF, Hanefeld F. Guanidino compounds in guanidinoacetate methyltransferase deficiency, a new inborn error of creatine synthesis. *Metabolism*. 1997. 45 (10): 1189-1193.
- Von Figura K, Hanefeld F, Isbrandt D, Stockler-Ipsiroglu S. Guanidinoacetate methyltransferase deficiency. In: Scriver: C. R. Scriver, A. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle (eds). *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. Mac Graw Hill, New York, 2000; 1897- 1908.
- Verhoeven N M, Guerland WS, Struys EA, Bouman AA, Van Der Knaap MS, Jakobs C. Plasma creatinine assessment in creatine deficiency: A diagnostic pitfall. *J Inherit Metab Dis*, 2000; 23: 835- 840.
- Schulze A, Hess T, Wevers R, Mayatepek E, Bachert P, Marescau B, Knopp MV, De Deyn PP, Bremer HJ, Rating D. Creatine deficiency syndrome caused by guanidinoacetate methyltransferase deficiency: Diagnostic tools for a new inborn error of metabolism. *J pediatr* 1997; 131: 626- 631.
- Schulze A, Bachert P, Schlemmer H, Harting I, Polster T, Salomons GS, Verhoeven NM, Jakobs C, Fowler B, Hoffmann G F, Mayatepek E. Lack of creatine in muscle and brain in an adult with GAMT deficiency. *Ann Neurol* 2003; 53: 248- 251.
- Chae YJ, Chung CE, Kim BJ, Lee MH, Lee H. The gene encoding guanidinoacetate methyltransferase (GAMT) maps to human chromosome 19 at band p13.3 and to mouse chromosome 10. *Genomics* 1998; 49:162-164.
- Salomons GS, Van Dooren SJM, Verhoeven NM, Cecil KM, Ball WS, Degrauw TJ, Jakobs C. X-linked creatine-transporter gene (SLC6A8) defect: a new creatine deficiency syndrome. *Am J Hum Genet* 2001b; 68: 1497-1500.
- Salomons GS, Van Dooren SJM, Verhoeven NM, Marsden D, Schwartz C, Cecil K. M, Degrauw TJ, Jakobs C. X-linked creatine transporter defect: An overview. *J. Inherit Metab Dis* 2003; 26: 309- 318.
- 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*. 1995; 25: 332- 333.
- Stromberger C, Bodamer OA, Stockler- Ipsiroglu S. Clinical characteristics and diagnostic clues in inborn errors of creatine metabolism. *J Inherit Metab Dis* 2003; 26: 299- 308.
- Bianchi MC, Tosetti M, Fornai F, Alessandri MG, Cipriani P, DeVito G, Canapicchi R. Reversible brain creatine deficiency in two sisters with normal blood creatine level. *Ann. Neurol* 2000; 47: 511- 513.
- Item C, Stromberger C, Muhl A, Stockler-Ipsiroglu S. Mutation analysis in 5 patients with guanidinoacetate methyltransferase (GAMT) deficiency by a DGGE

- screening method. *J Inherit Metab Dis* 2001a; 24 (Supplement 1): 120.
21. Item CB, Stockler-Ipsiroglu S, Stromberger C, Muhl A, Alessandri MG, Bianchi MC, Tosetti M, Fornai F, Cioni G. Arginine:Glycine amidinotransferase deficiency: The third inborn error of creatine metabolism in humans. *Am J Hum Genet* 2001b; 69: 1127- 1133.
  22. Ensenauer R, Thiel T, Schwab KO, Tacke U, Stockler-Ipsiroglu S, Schulze A, Hennig J, Lehnert W. Guanidinoacetate methyltransferase deficiency: differences of creatine uptake in human brain and muscle. *Mol Genet Metab* 2004; 82: 208- 213.
  23. Battini R, Alessandri MG, Leuzzi V, Moro F, Tosetti M, Bianchi MC, Cioni G. Arginine:glycine amidinotransferase (AGAT) deficiency in a newborn: early treatment can prevent phenotypic expression of the disease. *J Pediatric* 2006; 148: 828-830.
  24. Edvardson S, Korman SH, Livne A, Shaag A, Saada A, Nalbandian R, Allouche-Arnon, Gomori M, Katz-Brull R. L-arginine:glycine amidinotransferase (AGAT) deficiency: clinical presentation and response to treatment in two patients with a novel mutation. *Mol Genet Metab* 2010; 101: 228- 232.
  25. Ashok V. Arginine:glycine amidinotransferase deficiency: a treatable metabolic encephalomyopathy. *Neurology*. 2010; 75: 186- 188.
  26. Viau KS, Ernst SL, Pasquali M, Botto LD, Hedlund G, Longo N. Evidence-based treatment of guanidinoacetate methyltransferase (GAMT) deficiency. *Mol Genet Metab*. 2013; 110: 255- 262.
  27. Trotier- Faurion A, Passirani C, Béjaud J, Dézard S, Valayannopoulos V, Taran F, de Lonlay P, Benoit JP, Mabondzo A. Dodecyl creatine ester and lipid nanocapsule: a double strategy for the treatment of creatine transporter deficiency. *Nanomedicine*. 2015. 10 (2): 185- 191.
  28. Valayannopoulos V, Boddaert N, Chabli A, Barbier V, desguerre I, Philippe A, Afenjar A, Mazzuca M, Cheillan D, Munnich A, de Keyzer Y, Jakobs C, Salomons GS, de Lonlay P. treatment by oral creatine, L-arginine and L-glycine in six severely affected patients with creatine transporter defect. *J Inherit Metab Dis*. 2012; 35: 151- 157.
  29. Dunhar M, Jaggumantri S, Sargent M, Stockler-Ipsiroglu S, van Karnebeek CDM. Treatment of x-linked creatine transporter (SLC6A8 deficiency: systematic review of the literature and three new cases. *Mol Genet Metab*. 2014. 112 (4): 259- 274.
  30. Stöckler S, Stromberger C, Item C, Muhl A. Disorders of creatine metabolism. En: Blau N, Duran M, Blaskovics ME, Gibson KM (Eds). *Physician's Guide to the Laboratory diagnosis of Metabolic Diseases*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany, 2003.
  31. Carducci C, Santagata S, Leuzzi V, Carducci C, Artiola C, Giovanniello T, Battini R, Antonozzi I. Quantitative determination of guanidinoacetate and creatine in dried blood spot by flow injection analysis-electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta*. 2006; 364: 180- 187.
  32. Carling RS, Hogg SL, Wood TC, Calvin J. Simultaneous determination of guanidinoacetate, creatine and creatinine in urine and plasma by un-derivatized liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ann. Clin. Biochem* 2008; 45: 575-584.
  33. Martínez LD, Bezard M, Brunotto M, R Dodelson de Kremer. Creatine metabolism: detection of creatine and guanidinoacetate in saliva of healthy subjects. *Acta Odontol Latinoam* 2016; 29: 53- 57.
  34. Cecil KM, Salomons GS, Ball WS, Wong B, Chuck G, Verhoven N M, Jakobs C, DeGrauw TJ. Irreversible brain creatine deficiency with elevated serum and urine creatine: a creatine transporter defect ?. *Ann Neurol*; 2001; 49: 401-404.
  35. Cecil KM, DeGrauw TJ, Salomons GS, Jakobs C, Egelhoff JC, Clark J F. Magnetic resonance spectroscopy in a 9-day-old heterozygous female child with creatine transporter deficiency. *J Comput Assist Tomogr* 2003; 27 (1): 44- 47.
  36. Bianchi MC, Tosetti M, Battini R, Leuzzi V, Alessandri MG, Carducci C, Antonozzi I, Gioni G. Treatment monitoring of brain creatine deficiency syndromes: A <sup>1</sup>H- and <sup>31</sup>P-MR. *Am J Neuroradiol* 2007; 28: 548- 554.
  37. Hunneman DH, Hanefeld F. GC-MS determination of guanidinoacetate in urine and plasma. *J Inherit Metab Dis*.1997; 20: 450- 452.
  38. Prieto JA, Andrade F, Martín S, Sanjurjo P, Elorz J, Aldámiz-Echevarría L. Determination of creatine and guanidinoacetate by GC-MS study of their stability in urine at different temperature. *Clin Chem* 2009; 42: 125- 128.
  39. Tsikas D, Wolf A, Mitschke A, Gutzki FM, Will W, Bader M. GC-MS determination of creatinine in human biological fluids as pentafluorobenzyl derivative in clinical studies and biomonitoring: inter-laboratory comparison in urine with Jaffé, HPLC and enzymatic assays. *J Chromatogr*. 2010; 2582- 2592.
  40. Nasrallah F, Feki M, Briand G, Kaabachi N. GC/MS determination of guanidinoacetate and creatine in urine: A routine method for creatine deficiency syndrome diagnosis. *Clin Biochem*. 2010; 1356- 1361.
  41. Haas D, Gan-Schreier H, Lanhans C, Anninos A, Haege G, Burgard P, Schulze A, Hoffmann GF, Okun JG. Diagnosis and therapeutic monitoring of inborn errors of creatine metabolism and transport using liquid chromatography-tandem mass spectrometry in urine, plasma and CSF. *Gene*. 2014; 538: 188- 194.
  42. Carducci C, Birarelli M, Leuzzi V, Carducci C, Battini R, Cioni G, Antonozzi I. Guanidinoacetate and creatine plus

- creatinine assessment in physiologic fluids: An effective diagnostic tool for the biochemical diagnosis of arginine:glycine amidinotransferase and guanidinoacetate methyltransferase deficiencies. *Clin Chem*; 2002; 48(10): 1772-1778.
43. Alessandri MG, Celati L, Battini R, Casarano M, Cioni G. Gas chromatography/mass spectrometry assay for arginine:glycine-amidinotransferase deficiency. *Anal Biochem* 2005; 343: 356- 358.
  44. Ilas J, Muhl A, Stockler-Ipsiroglu S. Guanidinoacetate methyltransferase (GAMT) deficiency: non-invasive enzymatic diagnosis of a newly recognized inborn error of metabolism. *Clin Chim Acta* 2000; 290: 179- 188.
  45. Alessandri MG, Celati L, Battini R, Baldinotti F, Item C, Leuzzio V, Cioni G. HPLC assay for guanidinoacetate methyltransferase. *Anal Biochem* 2004; 331: 189- 191.
  46. Salomons GS, Van Dooren SJM, Bunea D, Verhoeven NM, Degrauw TJ, Jakobs C. Creatine transporter deficiency: development of a new functional test for creatine uptake in cultured cells. *J Inher Metab Dis* 2001a; 24 (Supplement 1):119.
  47. Item CB, Mercimek-Mahmutoglu S, Battini R, Edlinger-Horvat C, Stromberger C, Bodamer O, Muhl A, Vilaseca MA, Korall H, Stockler-Ipsiroglu S. Characterization of seven novel mutations in seven patients with GAMT deficiency. *Hum Mutat* 2004; 23(5): 524
  48. Rosenberg EH, Almeida LS, Kleefstra T, deGrauw RS, Yntema HG, Bahi N, Moraine C, Ropers H, Fryns JP, deGrauw TJ, Jacobs C, Salomons GS. High prevalence of SLC6A8 deficiency in x-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* 2004; 75: 97-105.
  49. DesRoches C, Patel J, Wang P, Minassian B, Salomons GS, Marshall CR, Mercimek-Mahmutoglu S. Estimated carrier frequency of creatine transporter deficiency in females in the general population using functional characterization of novel missense variants in the SLC6A8 gene. *Gene*. 2015; 187- 191.
  50. Streckfus CF, Biger LR. Saliva Glands and Saliva. Saliva as a diagnostic fluid. *Oral Dis*. 2002; 8: 69- 76.
  51. Lee YH, Wong DT. Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases. *Am J Dent* 2009; 22: 241-248.
  52. Xie H, Rhodus N L, Griffin RJ, Carlis JV, Griffin TJ. A catalogue of human saliva proteins identified by free flow electrophoresis-based peptide separation and tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2005; 4: 1826-1830.
  53. Helmerhorst E. J. y Oppenheim FG. Saliva: a dynamic proteome. *J. Dent. Res.* 2007; 86: 680- 693.
  54. Kohan R, Noher de Halac I, Tapia V, Cismondi A, Oller Ramírez A, Paschini-Capra A, Dodelson de Kremer R. Palmitoyl protein thioesterase1 (PPT1) and tripeptidyl peptidase-I (TPP-I) are expressed in the human saliva. A reliable and non-invasive source for the diagnosis of infantile (CLN1) and Late infantile (CLN2) neuronal ceroid lipofuscinoses. *Clin. Biochem.* 2005; 38 (5): 492-494.
  55. Noher de Halac I, Dodelson de Kremer R, Kohan R, Tapia Anzolini V, Guelbert N, Oller de Ramírez A, Ghio A, Cismondi IA, Depetris-Boldini C, Paschini-Capra A, Giner-Ayala A. Evaluación del tamizado de las enzimas lisosomales PPT1 y TPP-I en saliva en Lipofuscinosis Ceroides Neuronales tipos Infantil (LCN-I) e Infantil Tardía (LCN-IT). En: *Neuronal Ceroid Lipofuscinoses (Batten Disease) in Latin America – an update*. Noher de Halac I, Dodelson de Kremer, R. Eds. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba; 2005: 194.

*Corresponding to/Correspondencia a:*

*Dr. Lidia Dora Martínez.*

*Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Odontología  
Departamento de Biología Bucal. Cat. "B" de Biología Celular*

*Haya de LaTorre s/n Ciudad Universitaria, CP 5000,*

*Córdoba, Argentina.*

*Tel.: +54 351 4333032.*

*E-mail/Correo electrónico: lidia.martinez@unc.edu.ar*