

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

SECUENCIACIÓN DEL GEN DE LA
METILMALONIL-CoA MUTASA E
IDENTIFICACIÓN DE LAS MUTACIONES EN
PACIENTES MEXICANOS CON ACIDEMIA
METILMALÓNICA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

BIOL. SARA TERESA MÉNDEZ CRUZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARIA ELENA FLORES CARRASCO

MÉXICO, D. F.

MARZO, 2004





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 1 de diciembre de 2003, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) Méndez Cruz Sara Teresa, con número de cuenta 85323528, con la tesis titulada: "Secuenciación del gen de la metilmalonil-CoA mutasa e identificación de las mutaciones en pacientes mexicanos con acidemia metilmalonica.", bajo la dirección del(a) Dra. María Elena del Carmen Flores Carrasco.

Presidente:	Dr. Víctor Manuel Valdés López
Vocal:	Dra. María Teresa Tusié Luna
Secretario:	Dra. María Elena Flores Carrasco
Suplente:	Dra. Sara Frías Vázquez
Suplente:	Dra. María Alejandra Huerta Zepeda

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 29 de enero de 2004.

Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Este trabajo fue realizado con el apoyo de una beca de Maestría del CONACyT.

El comité tutorial estuvo integrado por las Doctoras Ma. Elena Flores Carrasco, Ma. Teresa Tusié Luna y Sara Frías Vázquez.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Ma. Elena Flores Carrasco y en la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto Nacional de Pediatría bajo la codirección de la Dra. Marcela Vela Amieva.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Antonio Velázquez Arellano por su colaboración y participación en este trabajo.

Al Dr. Pavel Petrosyan por su apoyo técnico y gran contribución para la realización de esta tesis.

Al Biólogo Saúl Cano Colín por su asesoramiento y apoyo técnico.

A la M. en C. Zazil Olivares por su colaboración en este trabajo.

A la M. en C. Isabel Ibarra por el asesoramiento en esta tesis.

A la nutrióloga Karin Arnold por su colaboración y apoyo.

Deseo expresar mi gratitud a las siguientes personas, cuya valiosa ayuda hizo posible la realización de este trabajo:

A la Dra. Ma. Elena Flores Carrasco por el gran apoyo que me proporcionó para realizar este trabajo.

A la Dra. Marcela Vela Amieva por su infinita confianza en que podría lograrlo.

Al Dr. Antonio Velázquez Arellano, por su comprensión y apoyo.

A los miembros del jurado, por sus comentarios y sugerencias.

Al técnico Pavel Petrosyan por su grandísima ayuda, comentarios y su amistad.

A los miembros del laboratorio de Biomédicas: Alfredo, Mónica, Toshiko, Paulina, Silvia, Doña Guille y Eduardo, por su grandiosa amistad.

Al los miembros de la Unidad de Genética de la Nutrición: Saúl, Nayeli, Angeles, Ma. Luisa, Dra. Fernández, José Luis, Alberto, Alonso, Zazil, Isabel, Karin, Lety Belmont, Marthita, Salvador, Joel, Ricardo, Violeta, Blanca, Daniel, Matias y a las nutriólogas, por hacerme sentir como en casa.

A Patricia de la Torre, por darle importancia a este trabajo.

A la Dra. Rocio Rodríguez y su familia, por su apoyo y hermandad.

A mis amigos que siempre nos recordamos aunque casi no nos veamos: Livia, Martha, David, Gaby, Andrea, Christian, Miguel Angel y Martín.

DEDICATORIA

Agradezco con toda mi alma a Dios por prestarme vida y permitirme llegar a este lugar y realizar este gran triunfo, lo hice con mucho amor a la vida.

Quiero dedicar este trabajo con todo mi corazón, cuerpo y alma a mis hijitos Miguel Angel y Raulito, por que son la razón de mi existencia y de mis triunfos, voy a luchar más por ustedes.

A mi esposo Rafael, por su amor infinito y su grandisísimo apoyo, y por que se que juntos lograremos grandes cosas como hasta ahora, por eso quiero decírtelo *A mi manera*: TE AMO.

A mi madre, por que es la mejor madre del mundo, por su amor, ayuda y apoyo. Mis logros son tuyos.

A mis hermanos, Carolina, Juan Carlos y en especial a Mario y Adolfo por su ayuda incondicional.

A Rubencito, por su alegría.

A Don Mario por su interés en nosotros.

A la familia Cruz, en especial a Juan y Viole.

Y a todas las personas que compartieron conmigo un minuto de su vida

GRACIAS

INDICE GENERAL

	Páginas
Índice de tablas y figuras.....	3
Lista de abreviaturas.....	5
Resumen.....	6
Introducción.....	8
Antecedentes	
Metabolismo de aminoácidos.....	11
Degradación de valina, treonina, isoleucina y metionina.....	14
Metabolismo del ácido propiónico.....	16
Metilmalonil-CoA mutasa.....	17
Metabolismo de la cobalamina.....	20
Errores Innatos del Metabolismo.....	25
Acidemia metilmalónica.....	27
Justificación.....	39
Objetivo general.....	40
Objetivos específicos.....	40
Metodología	
Población de estudio.....	41
Historia clínica de los pacientes.....	42
Obtención del DNA genómico.....	45
Oligonucleótidos para PCR.....	45
Estandarización del PCR.....	46
Purificación de los productos de PCR.....	47
Secuenciación.....	47
Análisis de secuencia.....	47
Resultados	
Aislamiento y purificación del DNA humano.....	48
Amplificación del gen de la MCM.....	48
Análisis de secuencia de los pacientes.....	52
Discusión.....	64
Conclusiones.....	70
Perspectivas.....	71
Bibliografía.....	72

Bibliografía.....	72
Apéndice	
Secuencia completa del exón 3 sentido del paciente 3.....	78
Secuencia completa del exón 3 sentido de la madre del paciente 3.....	79
Secuencia completa del exón 3 sentido del padre del paciente 3.....	80
Secuencia completa del exón 3 antisentido del paciente 3.....	81
Secuencia completa del exón 3 antisentido de la madre del paciente 3.....	82

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	Páginas
Fig. 1.- Catabolismo de los aminoácidos.....	12
Fig. 2.- Rutas degradativas de los 20 diferentes aminoácidos.....	12
Fig. 3.- Degradación de los aminoácidos valina, isoleucina,.....	15
Fig. 4.- Vía metabólica del propionato.....	16
Fig. 5.- Estructura del gen de la MCM en humanos.....	18
Fig. 6.- Estructura tridimensional de la MCM de <i>P. freudenreichii</i>	19
Fig. 7.- Representación gráfica de los diferentes dominios de la MCM en humanos.....	20
Fig. 8.- Estructura de la coenzima B ₁₂ (AdoCbl).....	22
Fig. 9.- Vía general de transporte en el compartimiento subcelular	24
Fig. 10.- Esquema del metabolismo de la cobalamina y señalización de las proteínas	25
Fig. 11.- Determinación del metilmalonato en una muestra de un Paciente con AMM por la técnica de CGEM.....	29
Fig. 12.- Secuencia de aminoácidos de la mutasa de humano.....	30
Fig. 13.- Alineamiento múltiple de la MCM de humano con diferentes organismos.....	35 y 36
Fig. 14.- Integridad del DNA purificado.....	49
Fig. 15.- Productos de PCR de cada uno de los exones amplificados.....	49
Fig. 16.- Secuencia de aa de la MCM	50
Fig. 17.- Traducción (<i>in silico</i>) de la secuencia de nt.....	51
Fig. 18.- Secuencia parcial del exón 12 del paciente 1.....	53
Fig. 19.- Secuencia parcial del exón 12 del paciente 2.....	55
Fig. 20.- Secuencia parcial del exón 12 del paciente 3.....	57

Fig. 21.- Secuencia parcial del exón 3 del paciente 3 y padre.....	58
Fig. 22.- Secuencia parcial del exón 3 del paciente 3 y madre.....	59
Fig. 23.- Secuencias de aa de la MCM normal y mutada.....	60
Fig. 24.- Fragmento de la secuencia del exón 11 de los pacientes 4 y 5.....	62
Tabla 1.- Ejemplos de algunas enfermedades genéticas causadas por alteraciones en el catabolismo de aminoácidos.....	13
Tabla 2.- Ejemplos de algunas enfermedades metabólicas.....	26
Tabla 3.- Lista de las mutaciones missense y nonsense reportadas en el gen de la MCM.....	32
Tabla 4.- Secuencia, tamaño del fragmento y temperatura de alineamiento de los diferentes exones	46
Tabla 5.- Condiciones finales para la amplificación por PCR.....	46
Tabla 6.- Análisis de los alelos en los diferentes exones.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
Adocbl	Adenosilcobalamina
AMM	Acidemia metilmalónica
B ₁₂	Vitamina B ₁₂
Cbl	cobalamina
CGEM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
EIM	Errores Innatos del Metabolismo
FI	Factor Intrínseco
HC	Haptocorrinas
HPLC	High performance liquid chromatography
I. M.	Intramuscular
MCM	Metilmalonil-CoA mutasa
nt	nucleótidos
OH-cbl	Hidroxicobalamina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCC	Propionil-CoA carboxilasa
RNAm	RNA mensajero
TCII	Transcobalamina

RESUMEN

La metilmalonil-CoA mutasa (MCM) es una enzima que participa en la vía de degradación de algunos aminoácidos y ácidos grasos, cuya deficiencia en humanos causa una enfermedad autosómica recesiva conocida como acidemia metilmalónica (AMM). Dicha deficiencia se puede deber a las distintas mutaciones presentadas en el gen que codifica para la mutasa, provocando alteraciones o pérdida en su actividad. En el humano, el gen de 35 Kb que codifica para esta enzima consta de 13 exones y se localiza en el cromosoma 6p12-p21.2. A la fecha se han reportado 53 mutaciones en el gen que codifica para la MCM. La mayoría de los estudios sobre la actividad de la mutasa se han realizado en extractos libres de células obtenidos a partir de cultivos de fibroblastos de pacientes con AMM. El número y la localización de las mutaciones en el gen que codifica para la MCM de pacientes con esta enfermedad hasta el momento no se han analizado en nuestro país, por lo que este estudio tiene la finalidad de hacer un análisis molecular de las mutaciones del gen de la MCM de pacientes mexicanos con AMM. En un principio se obtuvo el DNA genómico de muestras de sangre de sujetos normales para amplificar por PCR los exones del gen de la mutasa y comparar con la secuencia reportada en el GenBank. Además en este trabajo se analizaron las muestras de 6 pacientes con AMM y se obtuvo la secuencia de nucleótidos de diferentes exones del gen de la mutasa. Los resultados obtenidos mostraron que en 3 pacientes no relacionados se identificó la mutación V671I en el exón 12, la cual ya se encuentra reportada en el GenBank. Esta mutación consiste en un cambio de una guanina por una adenina, modificando el codón de valina por uno para isoleucina. En uno de los pacientes, hijo de padres consanguíneos, se encontró la mutación en forma homocigota; en otro paciente, hijo de padres no consanguíneos, se encontró la misma mutación de forma heterocigota. En el tercer paciente, hijo de padres no consanguíneos, se encontró esta misma mutación tanto en el hijo como en la madre de manera heterocigota. Al analizar la muestra de la madre y la de este paciente en el exón 3 se encontró una inserción de 8 nt en la posición 679, ambos de forma heterocigota, cambiando el marco de lectura a partir de este punto, dando como resultado una proteína truncada. También se localizó en la muestra del padre y del paciente, en el mismo exón 3, un cambio de forma heterocigota en el codón 228 de CGA a TGA, cambiando de arginina a un codón de término; ambas mutaciones no se encuentran aún reportadas. Entonces el paciente 3 se trata de un heterocigoto compuesto. En otros 2 pacientes hermanos se localizó una mutación homocigota en el exón 11 en el codón 616, cambiando una citosina por una timina, en la posición 1846, lo que provoca que se encuentre una cisteína en lugar de una arginina en la mutasa. Esta mutación tampoco ha sido reportada y la hemos denominado R616C. En ambos padres y en la hermana sana se localizó este mismo cambio de nucleótido de forma heterocigota. La última paciente es una niña con padres no consanguíneos; hasta la fecha se han

analizado los exones 3, 5, 6, 9, 11 y 12 y no se ha encontrado la mutación que causa la AMM.

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que los pacientes mexicanos con AMM analizados presentaron mutaciones nuevas o ya reportadas tal y como se ha observado en otras poblaciones.

INTRODUCCIÓN

Durante la ingesta diaria de proteínas, los aminoácidos toman diferentes rutas catabólicas, siendo una de ellas la del propionato, en donde la treonina, metionina, isoleucina y valina así como colesterol y ácidos grasos de cadena impar se transforman a propionato, luego a metilmalonato, después a succinato y posteriormente entran al ciclo de los ácidos tricarbóxicos para su oxidación. En esta ruta de degradación participan diferentes enzimas; una de ellas es la Metilmalonil-CoA Mutasa (MCM) la cual se encarga de transformar al metilmalonil-CoA en succinil-CoA. Esta enzima de la matriz mitocondrial está codificada por un gen único, localizado en el humano en el brazo corto del cromosoma 6 (6p12p-p21.2) abarcando 35 Kb, consta de 13 exones y un RNA mensajero de 2,700 nucleótidos aproximadamente. Cuando la actividad de esta enzima se encuentra disminuída o es nula, provoca una enfermedad autosómica recesiva denominada acidemia metilmalónica (AMM); esta alteración de la actividad enzimática se puede deber a mutaciones localizadas en regiones específicas del gen y dependiendo de la mutación que se presenta puede producir 2 fenotipos bioquímicos bien establecidos: *mut⁰* que implica ausencia de la actividad de la enzima y el *mut⁻*, en el que hay una actividad enzimática residual y que en muchos casos se ve reestablecida con dosis farmacológicas de su cofactor, la adenosilcobalamina también conocida como vitamina B₁₂. Existen otras formas alternas de AMM que se presentan cuando existe una falla en la síntesis de la vitamina B₁₂ y dependiendo del sitio del

bloqueo se encuentra además de la elevación del metimalonato, un incremento anormal de homocisteína; a estos fenotipos se les conoce como *cbl* que van de sus formas A a la F. Midiendo los niveles de homocisteína se pueden distinguir los fenotipos *mut* y *cbl*.

El cuadro clínico de las formas neonatales graves de la AMM suelen presentarse en las primeras semanas de vida; se caracterizan por rechazo al alimento, acidosis metabólica, coma e incluso la muerte. Los niños con formas intermedias presentan falla en el crecimiento, letargia, hipotonía, cuadros de apnea, vómitos constantes usualmente precipitados por episodios catabólicos debidos a infecciones interrecurrentes y a una ingesta rica en proteínas. Esto se debe a que los niveles de metilmalonato en sangre, orina y fluido cerebroespinal son altamente tóxicos.

La mayoría de los estudios mutacionales del gen de la MCM se han realizado en el DNA obtenido de cultivos de fibroblastos de los pacientes, aunque también se puede obtener de leucocitos de sangre total. Actualmente se tienen reportadas 55 mutaciones en este gen. Se estima que en promedio a nivel mundial la incidencia de esta enfermedad oscila entre 1:29,000 a 1:60,000 nacimientos y se desconoce la prevalencia en nuestro país. Debido a que muchos niños con AMM fallecen en la primera semana de vida por cetoacidosis o hiperamonemia, la frecuencia de este padecimiento probablemente sea mayor. En algunas poblaciones se ha podido establecer que existen mutaciones con una mayor incidencia.

Cuando existe sospecha de la enfermedad, además de exámenes generales y clínicos, se realiza la confirmación por medio de la detección de ácido metilmalónico en orina por cromatografía de gases acoplada a espectometría de masas (CGEM) además de un tamiz neonatal ampliado; desafortunadamente este último se realiza en nuestro país sólo en algunas maternidades privadas.

De todas las acidemias orgánicas detectadas en la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto Nacional de Pediatría, la AMM ocupa el primer lugar. Aunque el diagnóstico y manejo de la enfermedad se llevan adecuadamente en este centro de recepción, en México no se realizan estudios bioquímicos ni moleculares de ésta y muchas otras enfermedades metabólicas, inclusive las de mayor incidencia como hipotiroidismo y fenilcetonuria, por lo que el objetivo primordial de este trabajo es realizar el análisis molecular del gen de la MCM en pacientes mexicanos con AMM para conocer el tipo y frecuencia de las mutaciones que se encuentren en los niños afectados así como en los padres y hermanos.

ANTECEDENTES

METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS

Los aminoácidos, derivados principalmente de las proteínas de la dieta o por la degradación de las proteínas intracelulares, son una de las biomoléculas cuya oxidación contribuye de manera significativa a la generación de energía, la cual varía mucho con el tipo de organismo y con la situación metabólica en la cual se encuentra un organismo (Stryer, 1990).

Las vías de degradación de los aminoácidos son muy similares en la mayoría de los organismos y como en el caso de las vías catabólicas de azúcares y ácidos grasos, los procesos de degradación de los aminoácidos convergen en las vías catabólicas centrales para el metabolismo del carbono. Los esqueletos de carbono de los aminoácidos generalmente se incorporan en el ciclo del ácido cítrico, en donde son oxidados para producir energía química o canalizados hacia gluconeogénesis (Fig. 1).

Al existir 20 aminoácidos con estructuras químicas diferentes, existen también 20 rutas catabólicas que convergen para formar sólo cinco productos, los cuales se incorporan al ciclo del ácido cítrico o a la vía glucolítica (Fig. 2). En estas rutas de degradación, como primer paso debe llevarse a cabo la desaminación de los mismos y generar el esqueleto carbonado que posteriormente se oxida.

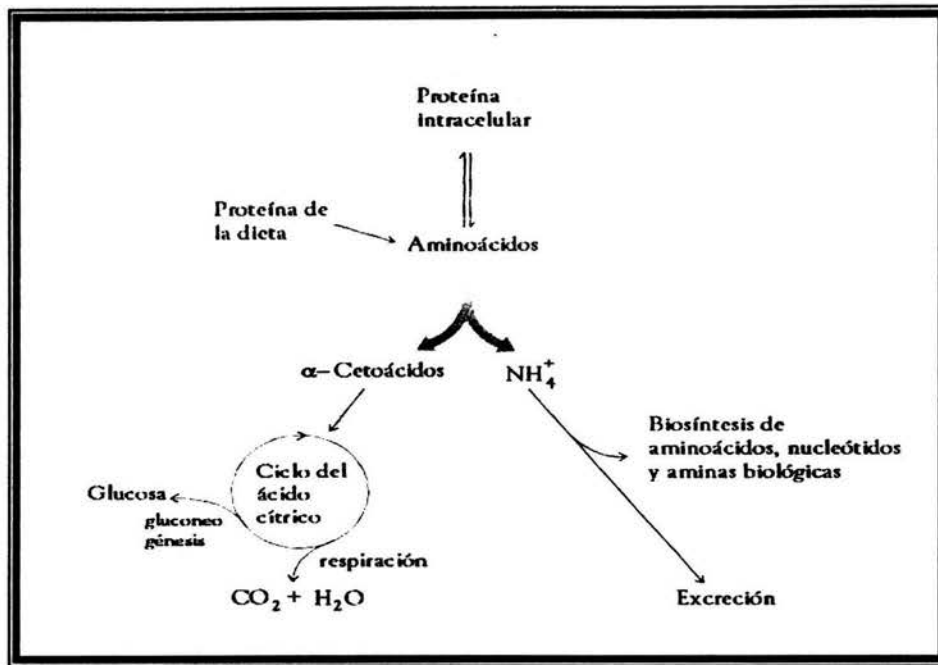


Fig 1. Catabolismo de los aminoácidos (Tomado de Lehninger *et. al.*, 1993)

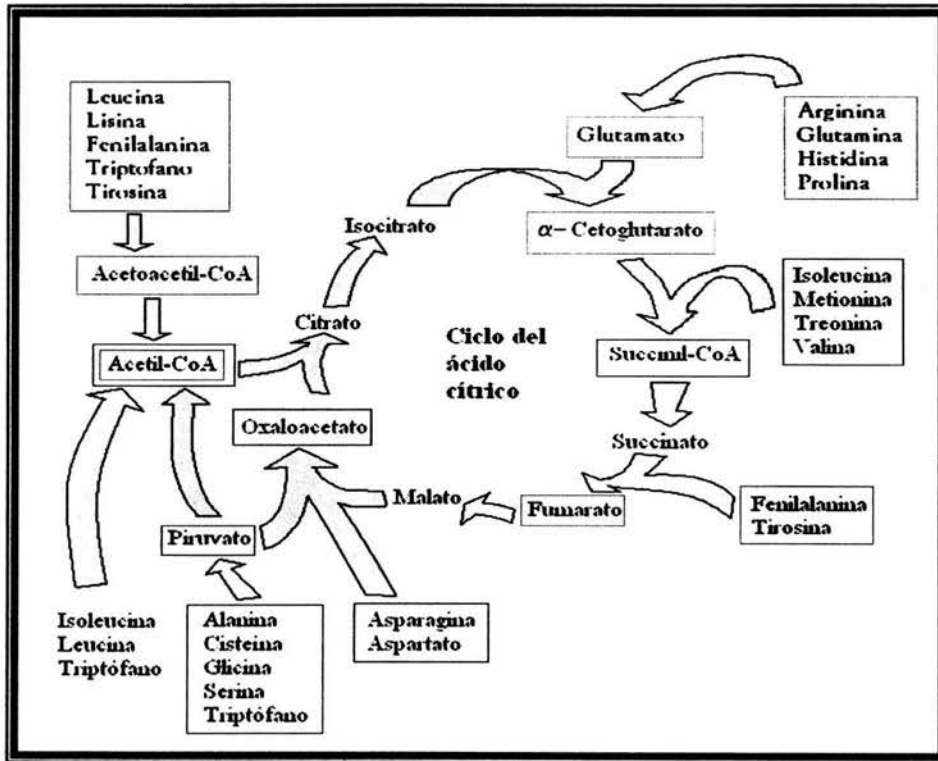


Fig. 2. Rutas degradativas de los 20 diferentes aminoácidos (Tomado de Lehninger *et. al.*, 1993).

En el humano se han identificado diferentes defectos genéticos en el metabolismo de los aminoácidos. Algunos de los más importantes son la fenilcetonuria, la acidemia arginosuccínico, la acidemia metilmalónica, la acidemia propiónica, la alcaptonuria y el albinismo, entre otros (Tabla 1). En todos estos casos se presenta un defecto en un paso enzimático que causa la acumulación de un determinado intermediario, generando un rompimiento en la homeostasis del cuerpo y causando una enfermedad que puede tener consecuencias graves.

Condición médica	Incidencia aproximada (por 100,000 nacimientos)	Proceso defectuoso	Enzima defectuosa	Síntomas y efectos
Albinismo	3	Síntesis de melanina a partir de tirosina	Tirosinasa	Falta de pigmentación, piel rosada, cabello blanco
Alcaptonuria	0.4	Degradación de tirosina	Homogentisato 1,2-dioxygenasa	Pigmento oscuro en la orina, artritis
Argininemia	0.5	Síntesis de urea	Arginasa	Retraso mental
Fenilcetonuria	8	Conversión de fenilalanina en tirosina	Fenilalanina hidroxilasa	Vómito neonatal, retraso mental
Acidemia metilmalónica	0.05	Conversión de metilmalonil-CoA en succinil-CoA	Metilmalonil-CoA mutasa	Vómitos, convulsiones, retraso mental, muerte temprana
Homocistinuria	0.5	Degradación de metionina	Cistationina β -sulfitasa	Retraso mental, mal desarrollo de huesos
Enfermedad de jarabe de arce	0.4	Degradación de valina, isoleucina y leucina	Deshidrogenasa de α -cetoácidos de cadena ramificada	Vómitos, retraso mental y muerte temprana

Tabla 1. Ejemplo de algunas enfermedades genéticas causadas por alteraciones en el catabolismo de aminoácidos.

DEGRADACIÓN DE LA VALINA, TREONINA, ISOLEUCINA Y METIONINA.

Los aminoácidos metionina, isoleucina, treonina y valina se degradan por una vía común originando finalmente propionil-CoA, el cual a su vez se transforma en succinil-CoA, un intermediario del ciclo del ácido cítrico (Fig. 3). En primer lugar, la metionina dona un grupo metilo a través de la S-adenosilmetionina a uno de los diversos aceptores posibles, mientras que 3 de los 4 carbonos restantes de su esqueleto carbonado se convierten en propionil-CoA. La isoleucina se transamina y el α -cetoácido resultante se descarboxila oxidativamente. El esqueleto pentacarbonado restante vuelve a oxidarse produciendo acetil-CoA y propionil-CoA. En células eucariontes, la treonina se convierte a propionil-CoA después de varios pasos enzimáticos. La oxidación de la valina sigue una ruta similar a la de los otros 3 aminoácidos, ya que sufre una transaminación, una descarboxilación y posteriormente una serie de reacciones que la transforman en propionil-CoA. De estos 3 aminoácidos, el propionil-CoA resultante se convierte a succinil-CoA por medio de 2 reacciones que se describirán más adelante (Lehninger *et. al.*, 1993).

En los mamíferos no rumiantes, incluyendo a los humanos, la mayor proporción de ácido propiónico se forma además del catabolismo de los aminoácidos valina, isoleucina, metionina y treonina, de la degradación de timina, uracilo, colesterol y de ácidos grasos de número impar de átomos de carbono a través de la β -oxidación (Jansen *et. al.*, 1989).

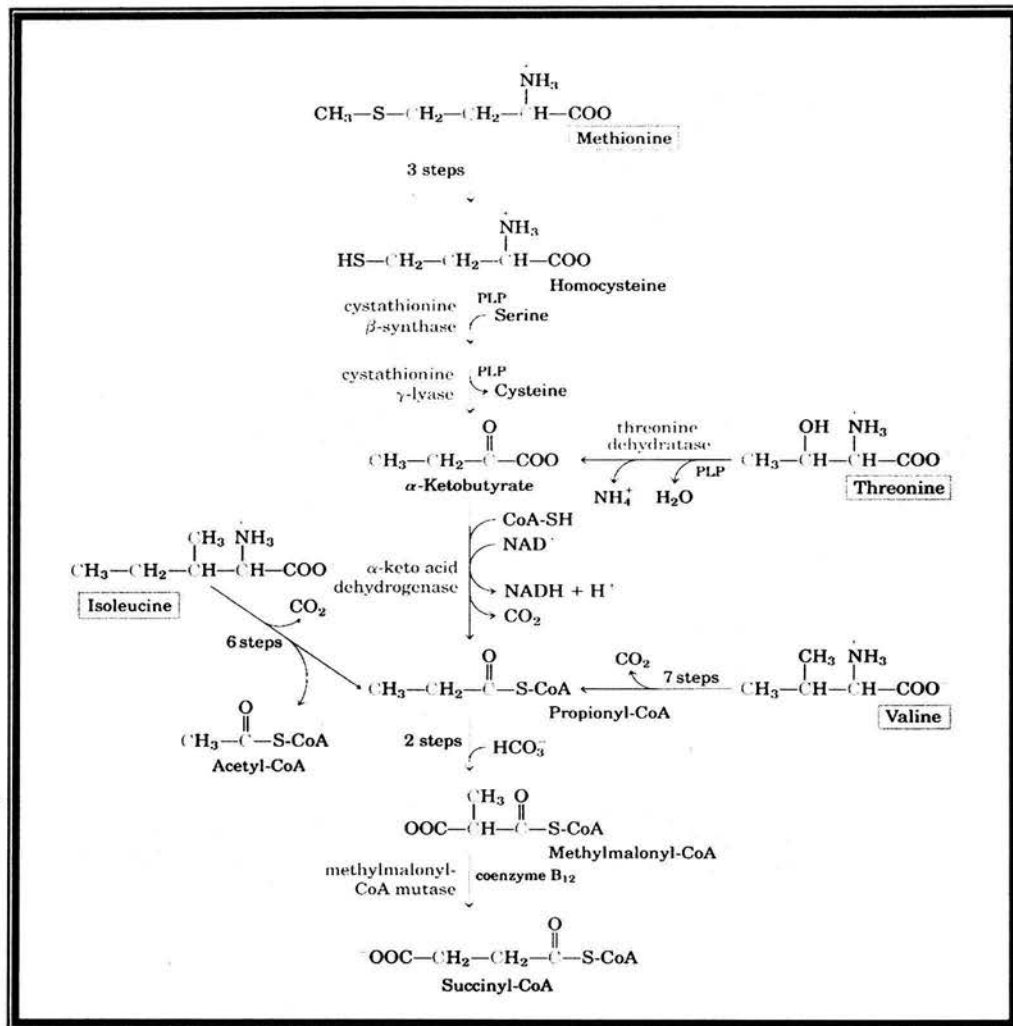


Figura 3. Degradación de los aminoácidos valina, isoleucina, treonina y metionina en la vía del propionato (Tomado de Lehninger, 1993).

Finalmente, la síntesis de propionato por las bacterias gastrointestinales es un factor importante en las enfermedades del metabolismo del propionato (Ogier *et. al.*, 1990).

METABOLISMO DEL ÁCIDO PROPIÓNICO

Como ya se mencionó, el propionil-CoA es un producto clave de la degradación de ciertos aminoácidos, el cual tiene que ser transformado hasta succinil-CoA para su completa oxidación.

En esta vía metabólica (Fig. 4) intervienen 3 reacciones importantes: la primera involucra la carboxilación del propionil-CoA para formar S-metilmalonil-CoA, catalizada por la propionil-CoA carboxilasa (PCC; EC 6.4.1.3). La segunda reacción es la conversión del isómero D o S del metilmalonil-CoA al isómero R o L por la metilmalonil-CoA racemasa (EC 5.1.99.1). Este último compuesto es transformado a succinil-CoA por la metilmalonil-CoA mutasa (MCM; EC 5.4.99.2).

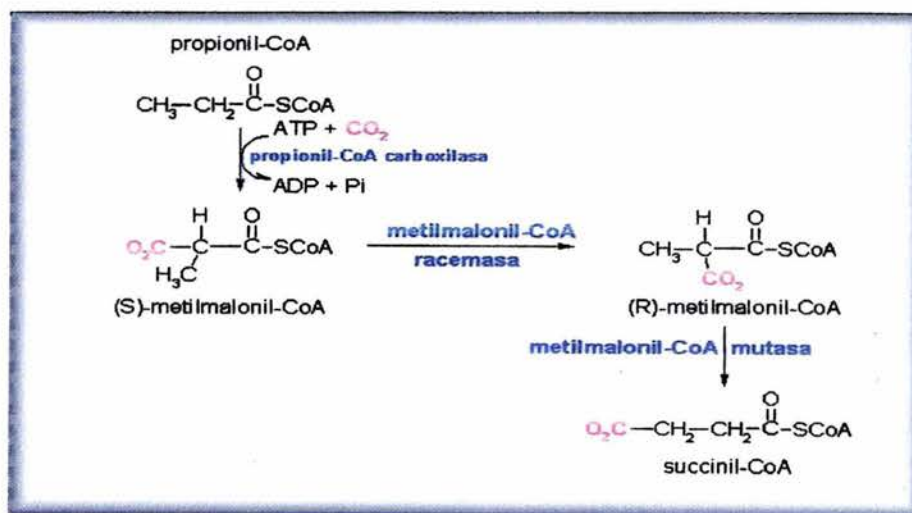


Figura 4. Vía metabólica del propionato (Tomado del www.ncbi.org)

Los defectos en la actividad de la propionil-CoA carboxilasa ó en la metilmalonil-CoA mutasa causan enfermedades como la acidemia propiónica o

la metilmalónica respectivamente, las cuales pueden ser letales (Scriver and Kaufman, 2001).

METILMALONIL-CoA MUTASA

La MCM es una enzima que se encuentra en una gran cantidad de organismos, desde bacterias, hongos y animales, incluyendo al humano. Su actividad fue descrita desde la década de los cincuentas, cuando Flavin *et. al.* (1955) y Katz y Chaikoff (1955), independientemente observaron la isomerización de metilmalonil-CoA a succinil-CoA, por extractos de riñón de ovejas e hígado de rata, respectivamente. Años más tarde, Barker y colaboradores (1958), demostraron que la cobalamina era una coenzima indispensable para que se llevara a cabo esta reacción.

La MCM ha sido purificada de placenta e hígados humanos a homogeneidad (Fenton *et. al.*, 2001; Kolhouse *et. al.*, 1988) y la enzima de ambas fuentes resultó ser un dímero (aproximadamente de 145 a 150 kDa) de subunidades idénticas de 72 a 77 kDa, la cual contiene 1 mol de adenosilcobalamina por mol de subunidad, que está fuertemente unida a la proteína en un sitio específico (Fenton *et. al.*, 1987).

El gen único que codifica para la MCM en humanos fue localizado en el cromosoma 6p12p-21.1, a través de técnicas de hibridación *in situ* en células somáticas; consta de 13 exones contenidos en una región de DNA de 35 kb (Nham *et. al.*, 1990) que codifican para un propéptido de 750 aminoácidos, de los cuales 32 aminoácidos corresponden a la secuencia líder, finalmente

quedando una enzima madura de 718 aminoácidos (Fig 5; Wilkemeyer *et. al.*, 1990). Una vez sintetizada, la enzima viaja por el citoplasma con ayuda de proteínas transportadoras hacia el interior de la mitocondria, específicamente a la matriz mitocondrial, en donde su secuencia líder se elimina y se convierte en la enzima madura.

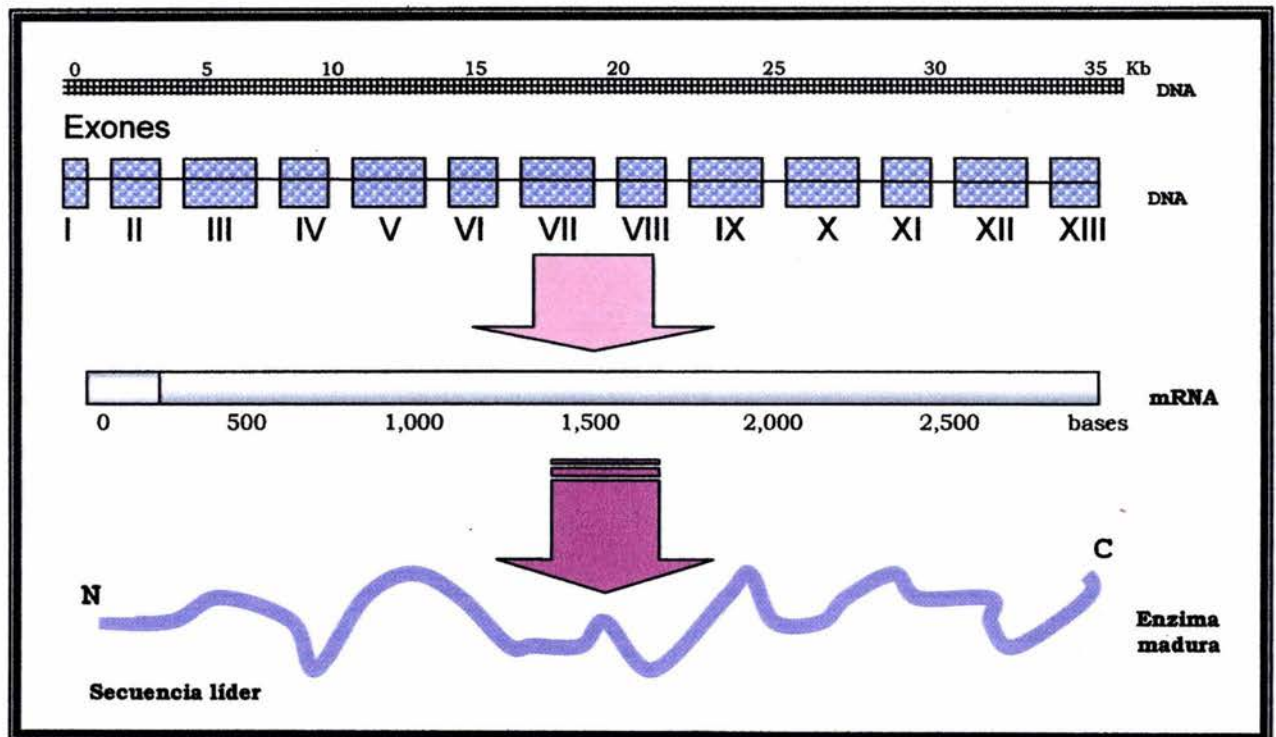


Figura 5. Esquema de la estructura del gen, mensajero y proteína de la MCM en humanos.

Tomando como base la estructura tridimensional obtenida por cristalografía de rayos X de la mutasa de *Propionibacterium freudenreichii* (antes *P. shermanii*), se han caracterizado los diferentes dominios de la mutasa de humano (Fig. 6; Mancía *et. al.*, 1999).

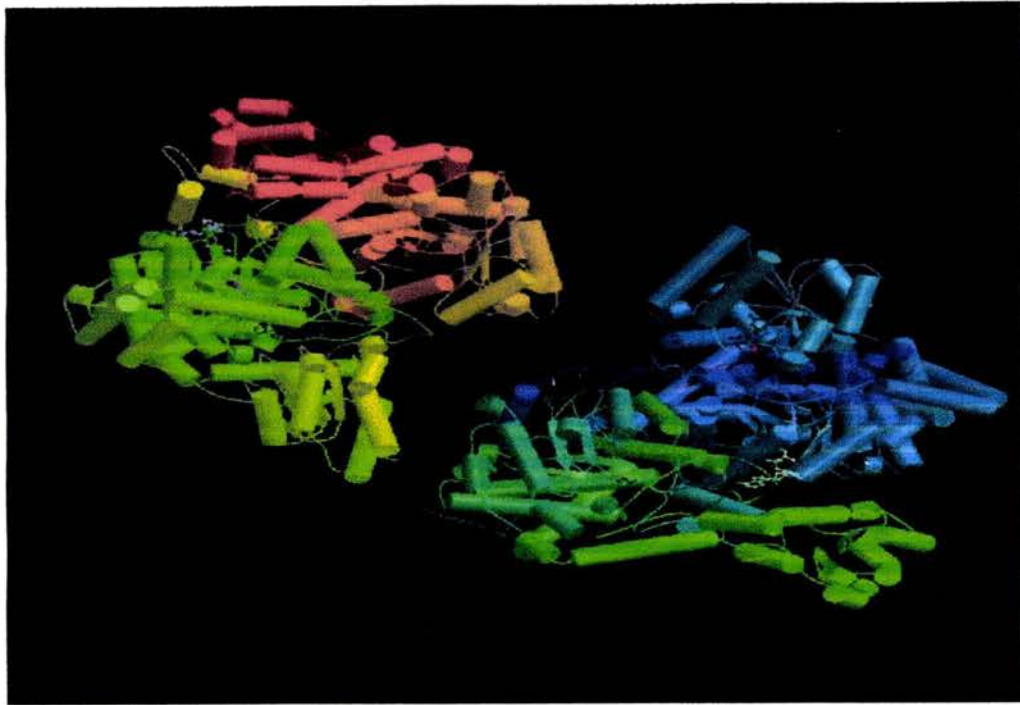


Figura 6. Estructura tridimensional de la MCM de *Propionibacterium freudenreichii* (NCBI).

Se ha observado que los residuos 1-32 en el dominio N-terminal corresponden a la secuencia señal que tiene como blanco la matriz mitocondrial. Entre los residuos 32 a 87 se encuentra la región involucrada en la dimerización de los 2 monómeros de la MCM y los residuos del 87 a 416 forman un barril de $(\beta/\alpha)_8$ que contiene el dominio de unión a la CoA y en el extremo C-terminal, de los residuos 578-750, se encuentra un dominio barril β/α_5 , donde se localiza el sitio de unión al cofactor (cobalamina). Una región de 162 aminoácidos (416-578) conectan el dominio de unión a la CoA con el dominio C-terminal (Fig 7; Fuchshuber *et. al.*, 2000).

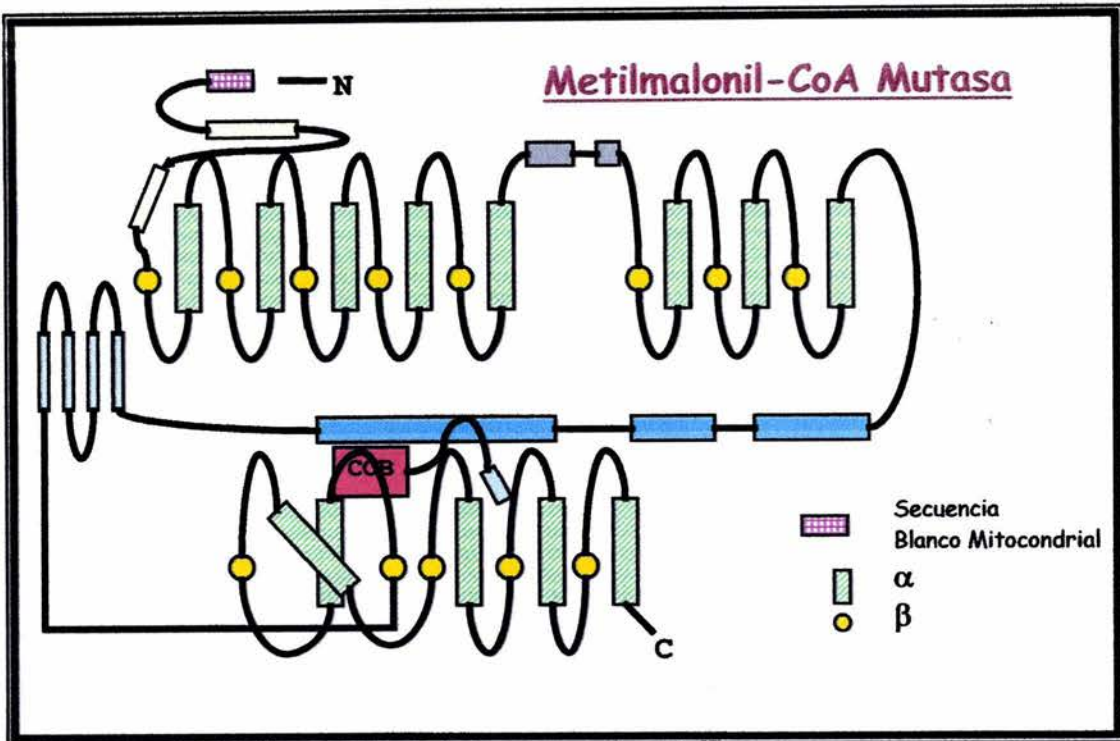


Fig 7. Representación gráfica de los diferentes dominios de la MCM en humanos

METABOLISMO DE LA COBALAMINA

En 1926, Minot y Murphy trataban padecimientos como la anemia perniciosa con extractos crudos de hígados y hasta 1948 se pudo aislar el factor que podía prevenir este mal a partir de hígado y riñón y lo denominaron “vitamina B₁₂”.

La coenzima B₁₂ es la forma de cofactor de la vitamina B₁₂, la cual es única entre todas las vitaminas ya que contiene no sólo una molécula orgánica compleja, sino también un átomo de cobalto, un elemento traza esencial (Neil and Marsh, 1997).

La estructura tridimensional de la cobalamina (Cbl) se obtuvo por medio de técnicas de cristalografía de rayos X; está compuesta por un átomo central de cobalto rodeado por un anillo planar corrino, el cual es un complejo de la cadena extendiéndose por debajo del plano de la corrina consistiendo en un grupo fosforibo-5,6-dimetilbenzimidazolil. Uno de los carbonos del grupo benzimidazol está unido al átomo de cobalto por coordinación en la posición axial α inferior. La molécula se completa por coordinación en la posición axial β superior de varios radicales diferentes. La vitamina B₁₂ usualmente es llamada cianocobalamina debido a que contiene un grupo ciano unido al cobalto en la sexta posición de coordinación. En la 5'-desoxiadenosilcobalamina (AdoCbl), el cofactor para la MCM, el grupo ciano es reemplazado por el grupo 5'-desoxiadenosil, covalentemente unido a través del C-5' al cobalto (Fig. 8; Scriver and Kaufman, 2001).

La vitamina B₁₂ se encuentra tanto en arqueobacterias y eubacterias como también en células eucariontes; sólo en plantas no parece ser utilizada esta vitamina.

Esta vitamina participa como coenzima en varias reacciones metabólicas en diferentes organismos. Como adenosilcobalamina está involucrada en la conversión de metilmalonil-CoA a succinil-CoA y como metilcobalamina participa en la metilación de homocisteína a metionina en células de mamífero. *Clostridium tetanomorphum* es un microorganismo que requiere de la adenosilcobalamina como cofactor de la glutamato mutasa (Barker *et. al.*, 1958); otras enzimas también requieren de la participación de la vitamina B₁₂,

tales como la glicerol deshidratasa, etanolamina amonio-liasa y la ribonucleótido reductasa. Además, la metilcobalamina participa en la formación de metano y ácido acético y en la fermentación de lisina en bacterias (Scriver and Kaufman, 2001).

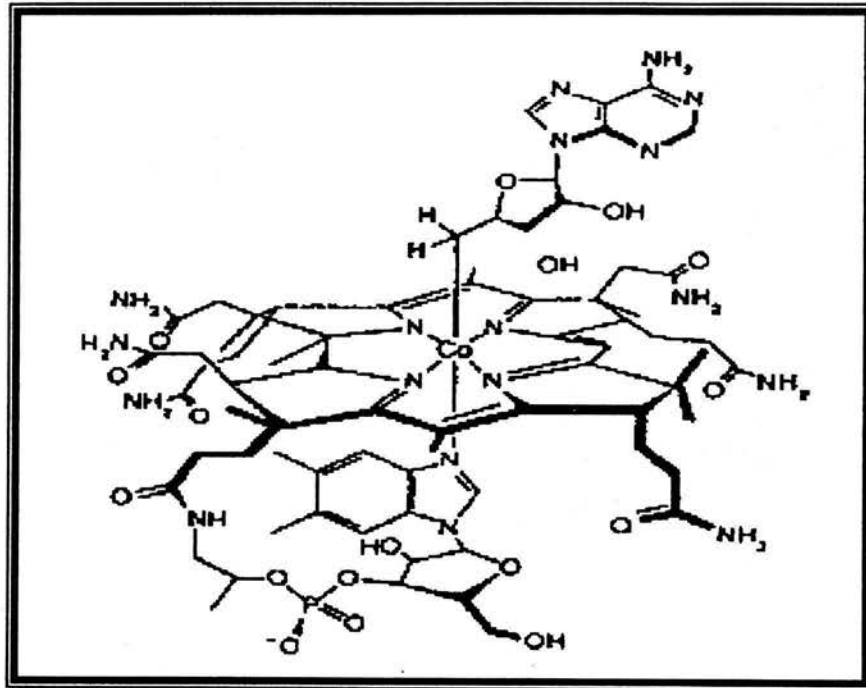


Fig. 8. Estructura de la coenzima B12 (AdoCbl; Neil and Marsh, 1997).

El humano obtiene esta vitamina por medio de la dieta como OH-Cbl (hidroxicobalamina) o CN-Cbl (cianocobalamina), ya que sólo se sintetiza por los microorganismos anaerobios encontrados en el rumen e intestino de animales (Scriver and Kaufman, 2001).

Décadas atrás se describió el mecanismo de transporte de la Cbl obtenida a partir de la dieta, durante la absorción del intestino y hasta el interior de la

célula. La Cbl se libera de las proteínas de la dieta por los ácidos estomacales en donde se une a otras proteínas de origen salivar y estomacal llamadas haptocorrinas (HC). Luego, las proteasas pancreáticas rompen esta unión liberando a la Cbl en la porción superior del intestino delgado; ahí se une con una glucoproteína de origen gástrico llamada factor intrínseco (FI) formando un complejo. Subsecuentemente, este complejo FI-Cbl interactúa con otra proteína llamada cubilina en presencia de iones calcio, la cual se reconoce por receptores en las células de la última porción del intestino delgado (íleon) y entra a ellas por el mecanismo de endocitosis. El complejo se disocia y la vitamina se transporta a través de la membrana basal (Rosenblatt and Fenton, 1999) hasta llegar al torrente sanguíneo en donde se une a una proteína transportadora llamada transcobalamina II (TC II); cuando la Cbl se une a ésta, desaparece del plasma en pocas horas y se transporta a diferentes tipos celulares *in vivo*: hígado, riñón, corazón, bazo, intestino delgado, pulmón y también *in vitro* en cultivos celulares tales como fibroblastos, células L de ratón, células de linfoma y células CHO (Sennett *et. al.*, 1981).

Debido a que la AdoCbl es la coenzima indispensable para el funcionamiento de la metilmalonil-CoA mutasa en la matriz mitocondrial, mientras que la Me-Cbl lo es para la metionina sintetasa en el citoplasma, para el transporte hacia el interior de la célula, la TC II unida a la OH-Cbl es internalizada a la célula, donde los lisosomas liberan la OH-Cbl. Una β -ligando transferasa la convierte a Cbl^{III} donde toma 2 vías: en la primera, que se realiza en el citoplasma, la Cbl pierde una valencia y se transforma en Cbl^{II}, que a su

vez pierde la última valencia (Cbl^{I}). Por una MS reductasa se transforma en MeCbl uniéndose a su sustrato, la metionina sintetasa, que cataliza la conversión de la homocisteína en metionina. En la segunda vía, la Cbl^{III} pierde una valencia y se internaliza en la matriz de la mitocondria, donde por acción de una reductasa se transforma en Cbl^{I} . Por último, una adenosiltransferasa le agrega el grupo adenosil convirtiéndola en AdoCbl , uniéndose a la mutasa. Estas vías de transporte se representan en la figura 9 (Scriver and Kaufman, 2001).

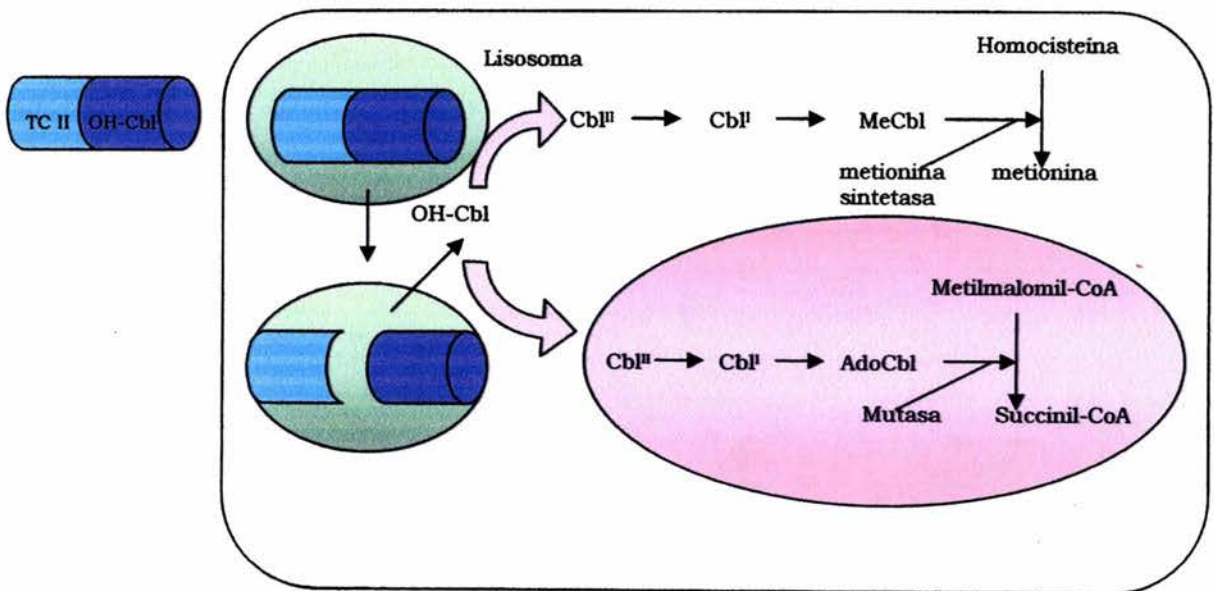


Fig.9. Vía general de transporte de la cobalamina en el compartimiento subcelular y distribución intracelular de su síntesis enzimática

La deficiencia de Cbl en humanos, ya sea porque no se ingiere en la dieta o porque alguna de las proteínas que intervienen en su metabolismo está afectada, se refleja en anomalías bioquímicas que se detectan en el plasma

y la orina. Esto se debe a que se afecta la actividad de las enzimas dependientes de esta coenzima. Además existen otras clases de fenotipos dependiendo de la deficiencia en la síntesis de adenosilcobalamina: *cblA*, *cblB*, *cblC*, *cblD* y *cblF* (Scriver and Kaufman, 2001; Fig. 10).

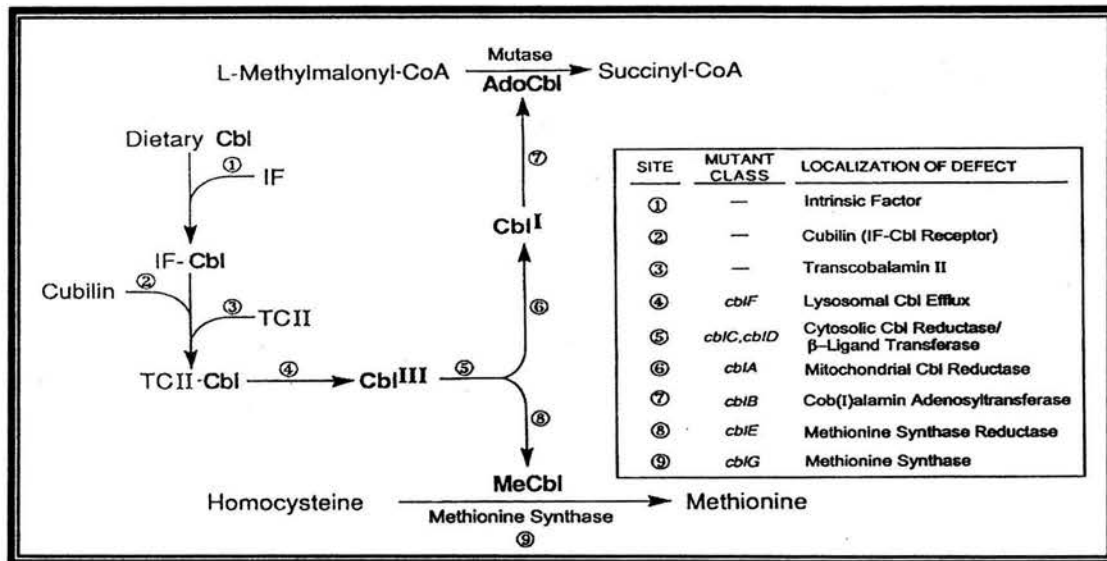


Figura 10. Esquema del metabolismo de la cobalamina y señalización de las proteínas que pueden afectar su transporte y función.

ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO

Los errores innatos del metabolismo (EIM) son un grupo de padecimientos heterogéneos, de origen genético, descritos inicialmente por Sir Archibald Garrod a principios del siglo XX. Este tipo de defectos son segregados en forma mendeliana o monogénica y también se conocen como enfermedades metabólicas hereditarias. Más del 95% de los EIM se heredan de forma autosómica recesiva; en estos casos los heterocigotos, portadores de un alelo

mutante son clínicamente sanos ya que a pesar de que poseen sólo el 50% de actividad enzimática, muestran un fenotipo normal. En homocigotos recesivos es hasta después del nacimiento, cuando el neonato comienza a ingerir alimentos, que aparece la alteración química que posteriormente dará origen al daño orgánico. Sin embargo, en algunos pacientes con EIM, donde se afecta la producción y utilización de energía por las células, existe ya algún daño prenatal (Vela *et. al.*, 1998).

Los EIM son causados por mutaciones en un gen específico en cualquiera de los 46 cromosomas del humano y son enfermedades individualmente raras pero colectivamente numerosas. En la actualidad existen nuevas herramientas tanto para el diagnóstico como para su tratamiento. Es muy importante recalcar que el tratamiento oportuno de algunos EIM puede prevenir el retraso mental o la muerte del paciente (Vela *et. al.*, 1998).

Como se mencionó anteriormente, existen una serie de enfermedades causadas por mutaciones en algunos de los genes que participan en la degradación de diversos aminoácidos (Tabla 2).

Hiperplasia suprarrenal congénita
Fenilcetonuria
Galactosemia: Clásica
Clásica/Duarte
Deficiente cinasa
Enfermedad de orina de jarabe de maple
Acidemia propiónica
Acidemia metilmalónica
Acidemia isovalérica
Deficiencia de biotinidasa

Tabla 2. Ejemplos de algunas enfermedades metabólicas

En México, el estudio de los EIM se inició en la década de los 70's y el diagnóstico se puede realizar mediante un tamiz metabólico que consiste en el análisis bioquímico de líquidos corporales accesibles, tales como la sangre, el suero ó la orina y que tiene por objeto descubrir alteraciones en el metabolismo de los aminoácidos, de los carbohidratos y de los ácidos orgánicos. Además del diagnóstico de los pacientes con EIM sintomáticos, recientemente se comenzó la búsqueda masiva de estos defectos metabólicos en forma presintomática mediante el tamiz neonatal (Vela, 2002).

ACIDEMIA METILMALÓNICA

En 1967, Oberholzer *et. al.* y Stokke *et.al.* describieron la presencia de altas concentraciones de ácido metilmalónico en la sangre, orina y fluido cerebroespinal de niños con cetoacidosis metabólica (Matsui *et. al.*, 1983). Posteriormente se observó que este incremento de ácido metilmalónico se debía a una deficiencia en la actividad de la metilmalonil-CoA mutasa, provocando una enfermedad autosómica recesiva denominada acidemia metilmalónica (AMM). Esta enfermedad puede deberse a deficiencias en la actividad de la MCM o por deficiencias en el metabolismo o baja ingesta de la vitamina B₁₂.

La AMM se manifiesta usualmente durante el primer año de vida y los niños sufren vómitos constantes, letargia, deshidratación, hipotonía muscular, acidosis metabólica, retraso mental e incluso pueden morir por la acumulación de metilmalonato en el plasma ya que es muy tóxico. Por eso mismo, el pH en la sangre baja a 7.0, mientras que el valor normal es de 7.4. Cuando a los niños

se les detectan estos síntomas se debe controlar la dieta, disminuyendo la ingesta de proteínas. Algunos pacientes logran una buena recuperación cuando se les administran altas dosis de vitamina B₁₂ por vía parenteral, restaurándose el pH arterial y disminuyendo la excreción de metilmalonato. Ésto se debe a que presentan una deficiencia de Cbl y por lo tanto una excesiva excreción de homocisteína, que se revierte rápidamente con la administración farmacológica de la vitamina (Hollowell *et. al.*, 1969) permitiendo que estos niños pueden sobrevivir hasta una edad adulta. Por el contrario, si no reciben tratamiento oportuno y adecuado, la enfermedad resulta letal ya que se presentan complicaciones, tales como falla crónica renal, pancreatitis y osteopenia (Ledley *et. al.*, 1984; Stryer, 1990). Los pacientes con alteraciones en el metabolismo del metilmalonil-CoA no responden a dosis grandes de cobalamina, lo que generalmente representa un fenotipo letal.

Cuando existe sospecha clínica de la enfermedad (además de la exhaustiva revisión médica) se debe realizar un tamiz ampliado (el cual se realiza en México pero en instituciones privadas) en donde se detectan niveles anormales de ácidos orgánicos y otros metabolitos. Existen diferentes técnicas para realizarlos, una de ellas es por medio de HPLC en donde se detecta la presencia y cantidad de la molécula en una muestra. Otra técnica que también se puede utilizar para la determinación de metilmalonato en orina es la cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (CGEM) detectándose altos niveles de ácido metilmalónico en la orina de los pacientes (Fig. 11; Kikuchi *et. al.*, 1989).

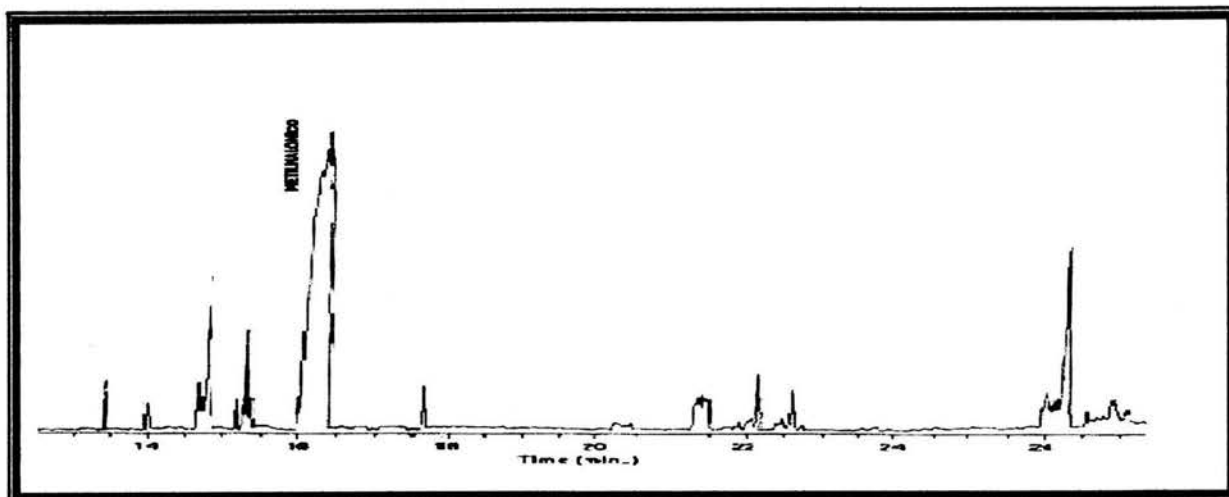


Fig. 11. Determinación del metilmalonato en la muestra de un paciente con AMM por la técnica de CGEM.

En niños normales y adultos, la cantidad de ácido metilmalónico que aparece en sangre y orina es menos de 0.04 mmol (5 mg) diarios. Los niños con AMM excretan de 2.1 a 49 mmol (240 a 5,700 mg) por día o más (Rosenblatt and Fenton, 2001).

Varios grupos han estudiado la relación entre la proteína o la carga de aminoácidos de la dieta y la acumulación del metilmalonato en algunos pacientes. Sin excepción, la administración de proteína o aminoácidos conocidos como precursores del propionato y metilmalonato, tales como la metionina, treonina, valina o isoleucina, ha resultado en un incremento en la acumulación del metilmalonato y, en algunos casos, de cetosis o acidosis (Scriver and Kaufman, 2001).

El genotipo y fenotipo de esta enfermedad varía mucho y ha sido estudiado por técnicas bioquímicas, genéticas y de biología molecular. Se han diagnosticado dos fenotipos clásicos de esta enfermedad: el fenotipo *mut⁰*, en

donde la actividad enzimática de MCM no se detecta y el fenotipo *mut⁻* (Ledley *et. al.*, 1990), en el cual la actividad de la enzima es mucho más dependiente de la concentración de la cobalamina (Crane *et. al.*, 1992b). Algunos niños con fenotipo *mut⁻* no presentan una respuesta a la suplementación con cobalamina pero responden al tratamiento con una restricción de proteínas en la dieta.

Para poder determinar si se trata de fenotipos *mut* o *cbl*, al paciente se le miden los niveles de homocisteína para saber si están elevados, ya que éstos aumentan cuando existe un defecto en el metabolismo de la cobalamina. Diversos estudios realizados con líneas celulares han permitido la identificación de varios haplotipos dentro del fenotipo *mut⁻* (Ledley *et. al.*, 1988) y una gran variedad de mutaciones asociadas a los fenotipos *mut⁰* y *mut⁻* (Fig. 12).

```

1 mlraknqlfl lsphylrQvk essgsrliqq rllhqqqplh pewaalakkq lkgKnpedli
61 whtpegisik plyskrdtmd lpeElpgvkp ftrGpyptmy tfrpWtiRqy agfstvEesn
121 kfykdnikag qqglsvAfdl athrgydsdn prlrgDvGma gvaidtvedt kilFdgiple
181 kmsvsmtmng AvipvlAnfi vtGeeqgvpk ekltgtiQNd ilkefmvRnt Yifppdpsmk
241 iiadifeyta khmpkfnsis isgyhmqeag adafwswayt ladgleysrt glqagltide
301 faprlsffwg iGmnfhmeia kmragrrlwa hliekmfqpks nskslllrah cqtsgwslte
361 qdpynniVRt aieamaAvfg gtqslhtnsf dealglptvk saRiarntqi iiqueesgipk
421 vadpwggsym mecltndvyd aalklineie emggmakava egipklRiee caarrqarid
481 sgsevivgvn kyqlekedAv evlatdntsv rnrqigklkk ikssrdqala eHclAaltec
541 aasgdgnila lavdasrarc tvgeitdalk kvfgehkanr rmvsgayrqe ygeskeitsa
601 ikrvhkfmer egrrrPrllva KmGqdGHdrG akViatgfad lgfdvdiGpl fqtprevaqq
661 avdadvhaVg VstlaagHkt lvpeLikeln slgRpdilvm cgGvippqdy eflfevGvsn
721 vfgpgetripk aavqvlddie kclekkqqsV

```

Figura 12. Secuencia de aa de la mutasa de humano, indicando en mayúsculas los aa que cambian por mutación.

Algunos autores han descrito algunos pacientes con AMM con fenotipos *mut⁻* que presentan una forma benigna de la enfermedad con pocos episodios de descompensación. En contraste, otros pacientes con formas fulminantes de AMM se encuentran íntimamente relacionados con el fenotipo *mut⁰*. Hasta el

momento se han registrado 55 mutaciones diferentes que provocan esta enfermedad en las bases de datos (<http://uwcmmlls.uwcm.ac.uk/mg/search/120204.html>), predominando las denominadas *missense* que se refieren a una sustitución de nucleótidos cambiando un aminoácido por otro y las *nonsense* que implican el cambio de un nucleótido generando un codón de término. También se incluyen algunas inserciones o deleciones de uno ó más bases. (Tabla 3; Adjalla *et. al.*, 1998a; Benoist *et. al.*, 2001; Crane *et. al.*, 1992a; Fuchshuber *et. al.*, 2000; Ledley and Rossenblat, 1997; Mikami *et. al.*, 1999; Nham *et. al.*, 1990; Peters *et. al.*, 2002; Touraine *et. al.*, 1995).

Se han realizado análisis moleculares de las mutaciones más frecuentes en diferentes grupos étnicos y en la población japonesa se encontró una mutación prevalente (E117X en el exón 2) y otras 3 mutaciones *missense* ya descritas (V368D, R369H en el exón 6 y V669E en el exón 12). En esta última, el cambio esta íntimamente relacionado con la alteración de un residuo del dominio de unión a la adenosilcobalamina en el extremo C terminal (Mikami *et. al.*, 1999). En el 2003, Champattanachai y colaboradores realizaron un estudio en un solo paciente tailandés con AMM encontrando 2 nuevas mutaciones de manera heterocigota, una heredada del padre y otra de la madre. Así mismo, se encontró un tercer cambio denominado como el polimorfismo A499T, ya que se encontró en este paciente en forma heterocigota y en su madre, pero al realizar un análisis en 100 sujetos tailandeses sanos, encontraron este polimorfismo en

el 8% de los alelos (16 de 200 alelos). Esto indica que este polimorfismo es un alelo frecuente en la población normal tailandesa.

Exon	# de codon	codón	Aminoácido	Referencia
2	18	CAG-TAG	Gln-Term	Ledley, 1990.
2	54	AAA-TAA	Lys-Term	Fuchshuber, 2000.
2	84	GAA-TAA	Glu-Term	Ogasawara, 1994.
2	93	CGT-CAT	Arg-His	Raff, 1991.
2	94	GGA-GTA	Gly-Val	Janata, 1997.
2	105	TGG-CGG	Trp-Arg	Jansen, 1990.
2	108	CGC-CAC	Arg-His	Acquaviva, 2001.
2	117	GAA-TAA	Glu-Term	Ogasawara, 1994.
3	137	GCC-GTC	Ala-Val	Fuchshuber, 2000.
3	156	GAT-AAT	Asp-Asn	Benoist, 2001.
3	158	GGA-GTA	Gly-Val	Acquaviva, 2001.
3	174	TIT-ICT	Phe-Ser	Fuchshuber, 2000.
3	191	GCA-GAA	Ala-Glu	Adjalla, 1998a.
3	197	GCA-ACA	Ala-Thr	Ogasawara, 1994.
3	203	GGA-AGA	Gly-Arg	Fuchshuber, 2000.
3	218	CAA-CAC	Gln-His	Fuchshuber, 2000.
3	219	AAT-TAT	Asn-Try	Acquaviva, 2001.
3	228	CGA-CAA	Arg-Gln	Adjalla, 1998a.
3	231	TAC-AAC	Try-Asn	Ledley, 1997.
5	312	GGA-GTA	Gly-Val	Adjalla, 1998a.
6	368	GTC-GAC	Val-Asp	Mikami, 1999.
6	369	CGT-CAT	Arg-His	Mikami, 1999.
6	377	GCA-GAA	Ala-Glu	Jansen, 1990.
6	403	CGA-TGA	Arg-Term	Peters, 2002.
6	414	GAA-TTAA	Glu-Term	Berger, 2001.
7	467	CGA-TGA	Arg-Term	Peters, 2002.
8	499	GCC-ACC	Ala-Thr	Berger, 2001.
9	532	CAT-CGT	His-Arg	Crane, 1992b.
9	544	1706_1707delGGinsTA	Gly-Term	Champattanachai, 2003.
9	535	GCT-CCT	Ala-Pro	Fuchshuber, 2000.
11	615	CCA-ACA	Pro-Thr	Peters, 2002.
11	621	AAA-AAT	Lys-Asn	Benoist, 2001.
11	623	GGA-AGA	Gly-Arg	Qureshi, 1994.
11	626	GGC-TGC	Gly-Cys	Crane, 1994.
11	627	CAT-CGT	His-Arg	Fuchshuber, 2000.
11	630	GGA-GAA	Gly-Glu	Crane, 1994.
11	633	GTT-GGT	Val-Gly	Adjalla, 1998a.
11	648	GGC-GAC	Gly-Asp	Crane, 1994.
12	669	GTG-GAG	Val-Glu	Mikami, 1999.
12	671	GTA-ATA	Val-Ile	Crane, 1992b.
12	678	CAT-CGT	His-Arg	Ledley, 1997.
12	685	CTC-CGC	Leu-Arg	Adjalla, 1998a.
12	694	CGG-TGG	Arg-Trp	Crane, 1994.
12	703	GGG-CGG	Gly-Arg	Qureshi, 1994.
13	717	GGT-GTT	Gly-Val	Crane, 1992b.

Tabla 3. Lista de las mutaciones *misense* y *nonsense* reportadas en el gen de la MCM.

En pacientes caucásicos descendientes de franceses y turcos con AMM, se ha localizado una mutación que se presenta con alta frecuencia, la mutación

missense N219Y, la cual está involucrada con la pérdida de la actividad enzimática, lo que fue demostrado por mutagénesis dirigida utilizando un oligonucleótido diseñado para generar el cambio y creando un sitio de restricción para *NdeI* en donde se localizó la mutación. Posteriormente el gen fue clonado y la proteína expresada para medir su actividad. Por otro lado, también se ha reportado que un 1% de la población francesa es portadora de esta mutación (Acquaviva *et. al.*, 2001).

En la población afro-americana, la mutación G717V con fenotipo *mut⁻*, es la que se ha encontrado con mayor frecuencia. Esta mutación genera el cambio de un residuo de glicina, el cual está involucrado en la unión al cofactor haciendo que la K_m por el sustrato sea 1000 veces mayor que en la enzima normal (Adjalla *et. al.*, 1998b; Crane & Ledley, 1994).

En la población australiana se han encontrado nuevas mutaciones, de las cuales 2 de ellas codifican para codones de término, R403stop y R467stop; otras 2 son pérdidas de nucleótidos, 497delG y 208delG y una por sustitución, P615T, la cual ocurre en el dominio de unión al cofactor, ya que la prolina que cambia por treonina, es importante para el plegamiento de la proteína, por lo que esta mutación afecta directamente la función de la actividad enzimática (Peters *et. al.*, 2002).

Habría que mencionar que se ha reportado que ciertas mutaciones puntuales resultan ser muy críticas para la actividad de la enzima, por ejemplo a través de la mutación H627N se demostró que un residuo de histidina está coordinado directamente con el átomo de cobalto en el dominio de unión al

cofactor, ya que la sustitución de la His627 por otro aminoácido resultó en la pérdida total de la actividad (Fuchshuber et. al., 2000).

La AMM también se puede clasificar en formas benignas, intermedias y fulminantes, dependiendo de su respuesta al tratamiento con vitamina B₁₂, aunque algunas de ellas aún siendo del fenotipo *mut⁻* no responden clínicamente al cofactor (Adjalla et. al., 1998b).

En mamíferos, la mutasa es una proteína formada por un homodímero codificado por un gen único, mientras que en microorganismos, tales como *Streptomyces cinnamonensis* (Birch et. al., 1993) o *Propionibacterium freudenreichii* (Roy and Leadley, 1992), la MCM es una proteína heterodimérica formada por una subunidad menor de 616 aminoácidos y 65 KDa y una subunidad mayor de 733 aminoácidos y 79 Kda. En un estudio previo (Luz-Madrigal et. al., 2004) se realizó un alineamiento múltiple de la MCM de humano con la subunidad mayor de la mutasa de microorganismos, mostrando que tienen un alto porcentaje de identidad. Esto indica que las mutasas que ya han sido secuenciadas de diversas fuentes se encuentran altamente conservadas (Fig 13).

También del alineamiento se puede inferir que existen varias regiones que se encuentran en todas las MCM de diferentes organismos. Una de ellas es la secuencia RIARNT, que está conservada desde bacterias hasta el humano, pero que no tiene asignada alguna función en la MCM. En 1994, Drenan et. al. identificaron el motivo de unión a la vitamina B₁₂ (D-X-H-X-X-G-, S-X-L, GG y

G; Drenan *et. al.*, 1994; Ludwig *et. al.*, 1996; Neil and Marsh, 2000), el cual también se encuentra conservado.

De la estructura cristalina de la MCM de *P. freudenreichii* fue localizada una región importante en el dominio N-terminal de la proteína que está relacionada con la unión a la CoA (Mancia *et. al.*, 1996). Por otro lado los aminoácidos HisA244, ArgA207 y TirA89 de la enzima de *P. freudenreichii* y que son importantes para la unión al sustrato, también se encuentran en la MCM de humano (Mancia *et. al.*, 1999). Es posible que los residuos altamente conservados entre las MCM puedan resultar en mecanismos catalíticos muy similares si no es que idénticos (Luz, 2002).

```

Humano MIRAELI---DLPFLSTHYLRVVEEESGSLIQQRLNHOCCFLMPECAALSNKCLGEEI---ECCILNMTTSCIEIIFLLEPERITLMLI---E---ELPGVTFPTGPTFTTHVTFEP
Houde MIRAELI---DLPFLSTHYLRVVEEESGSLIQQRLNHOCCFLMPECAALSNKCLGEEI---ECCILNMTTSCIEIIFLLEPERITLMLI---E---ELPGVTFPTGPTFTTHVTFEP
E.c -----HETIPEDEIILHAGGG-----ISGAEQWRAAVVETSTES-----ECCILNMTTSCIEIIFLLEPERITLMLI---E---ELPGVTFPTGPTFTTHVTFEP
A.m -----HTIIEFASLGLTTS-----TGLRAGAGVAVETSTES-----PCALNMTTSCIEIIFLLEPERITLMLI---E---ELPGVTFPTGPTFTTHVTFEP
H.t MTKITP-----VIGIPEASPLMSEEA-----ACSTPEAAGHTVAVAAAGHTTPECLNMTTSCIEIIFLLEPERITLMLI---E---ELPGVTFPTGPTFTTHVTFEP
P.o -----MSTLRECSLMLHAI-----VADAAEFPELAAGETS-----SANTASQIIPSTLFINCVTKHMLD-----TIALIFSPVGLTAVGAFAPR
P.g -----MEKATPEIDIKLAGP-----VAEDATGAGSNGVVD-----SRITPQIHQVLLTIDCLQVHMLD-----TYSLLFELLEGTSQVHHEPS
E.c -----MHWVSEKCLAMHLSA-----E---EELTVSE-----LAKQVASCIAIDSLYTEKDLHMLD-----TISLLFELLEGTSQVHHEPS
E.e MTAHSH-----EITPEFASPLMSEEA-----TAPAGQVHLLATGVE-----ACALNMTTSCIEIIFLLEPERITLMLI---E---ELPGVTFPTGPTFTTHVTFEP
E.cc -----MLGEE-----HHTHTR-----ESESALPIETVSEKALHSEASL---LQENQITFTTSTHSHVTRPS
C.g -----MHS-----THSESDIATAEA-----AS-----ESHVDS-----EKNTEEDIDVETFCALDEKACAMPVLSLQCKEFGHPTFTTHVTFEP
C.c -----MSTIPTFLAFAR-----V-----LADPQ-----EASHTETQVAFAPASVGLFTL---EFGQVAFPTGPTFTTHVTFEP
H.1 MTRVDCVGCCEBRTTFFVAGSRLIIPDRTRV-----VAPPEAAVHTVTVASAGHTVTCQDNMTTSCIEIIFLLEPERITLMLI---E---ELPGVTFPTGPTFTTHVTFEP
H.e -----NSAAGSVAETPEE-----EES

```

```

Humano TIRQTAGSTVASENFTIIMIDNQQGLSVAFDLATREGLSINRVEYAGDQNGAVALLTVRQCIIFDQGITLENSVSHTRGAVIPVLAHPIVTCSSQVTEKELVTTIQNDILKEP
Houde TIRQTAGSTVASENFTIIMIDNQQGLSVAFDLATREGLSINRVEYAGDQNGAVALLTVRQCIIFDQGITLENSVSHTRGAVIPVLAHPIVTCSSQVTEKELVTTIQNDILKEP
E.c TIRQTAGSTVASENFTIIRHLAQQNGLSVAFDLATREGLSINRVEYAGDQNGAVALLTVRQCIIFDQGITLENSVSHTRGAVIPVLAHPIVTCSSQVTEKELVTTIQNDILKEP
A.m TIRQTAGSTVASENFTIIRHLAQQNGLSVAFDLATREGLSINRVEYAGDQNGAVALLTVRQCIIFDQGITLENSVSHTRGAVIPVLAHPIVTCSSQVTEKELVTTIQNDILKEP
H.t TIRQTAGSTVASENFTIIRHLAQQNGLSVAFDLATREGLSINRVEYAGDQNGAVALLTVRQCIIFDQGITLENSVSHTRGAVIPVLAHPIVTCSSQVTEKELVTTIQNDILKEP
P.o TIRQTAGSTVASENFTIIRHLAQQNGLSVAFDLATREGLSINRVEYAGDQNGAVALLTVRQCIIFDQGITLENSVSHTRGAVIPVLAHPIVTCSSQVTEKELVTTIQNDILKEP
P.g TIRQTAGSTVASENFTIIRHLAQQNGLSVAFDLATREGLSINRVEYAGDQNGAVALLTVRQCIIFDQGITLENSVSHTRGAVIPVLAHPIVTCSSQVTEKELVTTIQNDILKEP
E.c TIRQTAGSTVASENFTIIRHLAQQNGLSVAFDLATREGLSINRVEYAGDQNGAVALLTVRQCIIFDQGITLENSVSHTRGAVIPVLAHPIVTCSSQVTEKELVTTIQNDILKEP
E.e TIRQTAGSTVASENFTIIRHLAQQNGLSVAFDLATREGLSINRVEYAGDQNGAVALLTVRQCIIFDQGITLENSVSHTRGAVIPVLAHPIVTCSSQVTEKELVTTIQNDILKEP
E.cc TIRQTAGSTVASENFTIIRHLAQQNGLSVAFDLATREGLSINRVEYAGDQNGAVALLTVRQCIIFDQGITLENSVSHTRGAVIPVLAHPIVTCSSQVTEKELVTTIQNDILKEP
C.g TIRQTAGSTVASENFTIIRHLAQQNGLSVAFDLATREGLSINRVEYAGDQNGAVALLTVRQCIIFDQGITLENSVSHTRGAVIPVLAHPIVTCSSQVTEKELVTTIQNDILKEP
C.c TIRQTAGSTVASENFTIIRHLAQQNGLSVAFDLATREGLSINRVEYAGDQNGAVALLTVRQCIIFDQGITLENSVSHTRGAVIPVLAHPIVTCSSQVTEKELVTTIQNDILKEP
H.1 TIRQTAGSTVASENFTIIRHLAQQNGLSVAFDLATREGLSINRVEYAGDQNGAVALLTVRQCIIFDQGITLENSVSHTRGAVIPVLAHPIVTCSSQVTEKELVTTIQNDILKEP
H.e IIRTYAGSTVASENFTIIRHLAQQNGLSVAFDLATREGLSINRVEYAGDQNGAVALLTVRQCIIFDQGITLENSVSHTRGAVIPVLAHPIVTCSSQVTEKELVTTIQNDILKEP

```

```

Humano NHRITTYFFKFSRILSDIIPATYRQVRFPSISISYHQRGATLLELAYTLADGVTLEKSCGG---LTIKFAPELSEFFAGIQHFFVREVAELRAGELLSLHIDQFQHH
Houde NHRITTYFFKFSRILSDIIPATYRQVRFPSISISYHQRGATLLELAYTLADGVTLEKSCGG---LTIKFAPELSEFFAGIQHFFVREVAELRAGELLSLHIDQFQHH
E.c NHRITTYFFKFSRILSDIIPATYRQVRFPSISISYHQRGATLLELAYTLADGVTLEKSCGG---LTIKFAPELSEFFAGIQHFFVREVAELRAGELLSLHIDQFQHH
A.m NHRITTYFFKFSRILSDIIPATYRQVRFPSISISYHQRGATLLELAYTLADGVTLEKSCGG---LTIKFAPELSEFFAGIQHFFVREVAELRAGELLSLHIDQFQHH
H.t NHRITTYFFKFSRILSDIIPATYRQVRFPSISISYHQRGATLLELAYTLADGVTLEKSCGG---LTIKFAPELSEFFAGIQHFFVREVAELRAGELLSLHIDQFQHH
P.o NHRITTYFFKFSRILSDIIPATYRQVRFPSISISYHQRGATLLELAYTLADGVTLEKSCGG---LTIKFAPELSEFFAGIQHFFVREVAELRAGELLSLHIDQFQHH
P.g NHRITTYFFKFSRILSDIIPATYRQVRFPSISISYHQRGATLLELAYTLADGVTLEKSCGG---LTIKFAPELSEFFAGIQHFFVREVAELRAGELLSLHIDQFQHH
E.c NHRITTYFFKFSRILSDIIPATYRQVRFPSISISYHQRGATLLELAYTLADGVTLEKSCGG---LTIKFAPELSEFFAGIQHFFVREVAELRAGELLSLHIDQFQHH
E.e NHRITTYFFKFSRILSDIIPATYRQVRFPSISISYHQRGATLLELAYTLADGVTLEKSCGG---LTIKFAPELSEFFAGIQHFFVREVAELRAGELLSLHIDQFQHH
E.cc IACGTYFFKFSRILSDIIPATYRQVRFPSISISYHQRGATLLELAYTLADGVTLEKSCGG---LTIKFAPELSEFFAGIQHFFVREVAELRAGELLSLHIDQFQHH
C.g NHRITTYFFKFSRILSDIIPATYRQVRFPSISISYHQRGATLLELAYTLADGVTLEKSCGG---LTIKFAPELSEFFAGIQHFFVREVAELRAGELLSLHIDQFQHH
C.c NHRITTYFFKFSRILSDIIPATYRQVRFPSISISYHQRGATLLELAYTLADGVTLEKSCGG---LTIKFAPELSEFFAGIQHFFVREVAELRAGELLSLHIDQFQHH
H.1 NHRITTYFFKFSRILSDIIPATYRQVRFPSISISYHQRGATLLELAYTLADGVTLEKSCGG---LTIKFAPELSEFFAGIQHFFVREVAELRAGELLSLHIDQFQHH
H.e LKRCVTFKFAELSDIIPATYRQVRFPSISISYHQRGATLLELAYTLADGVTLEKSCGG---LTIKFAPELSEFFAGIQHFFVREVAELRAGELLSLHIDQFQHH

```

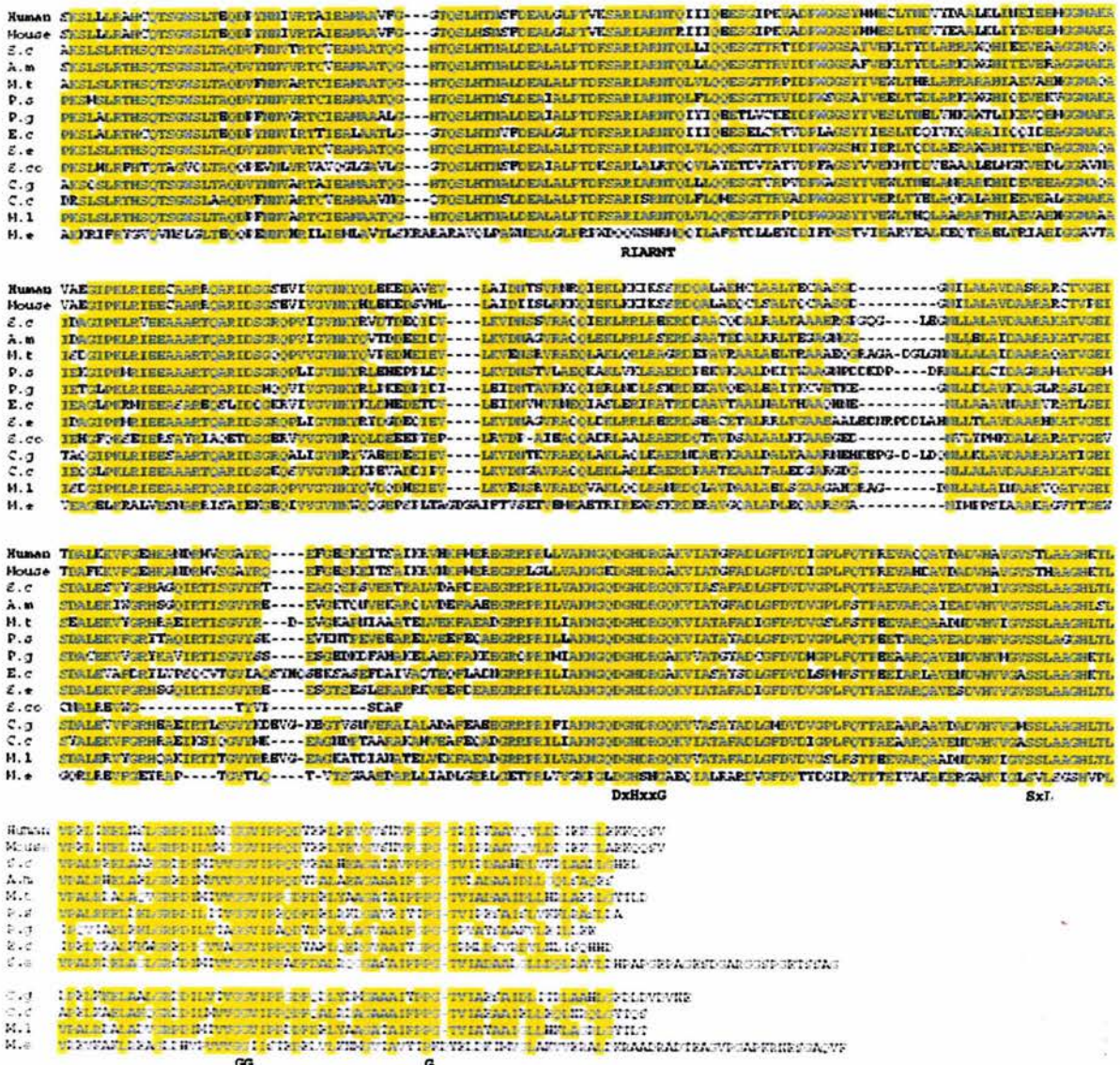



Fig 13. Alineamiento múltiple de la MCM de diferentes organismos, incluyendo la subunidad mayor de MCM de microorganismos. El alineamiento fue diseñado usando el programa ClustalW. Las posiciones conservadas en las proteínas están sombreadas. Humano (No. de acceso al GenBank M65131); Ratón (X51941); S.c, *Streptomyces cinnamonensis* (L10064); A.m, *Amycolatopsis mediterranei* (AF117980); M.t, *Mycobacterium tuberculosis* (Z79701); P.s, *Propionibacterium shermanii* (X14965); P.g, *Porphyromonas gingivalis* (L30136); E.c, *Escherichia coli* gen sbm (X66836); S.e, *Saccharopolyspora erythraea* CA340 (AY117133); S.co, *Streptomyces coelicolor* (AL939129); C.g, *Corynebacterium glutamicum* (AP005278); C.c, *Caulobacter crescentus* (AE005906); M.1, *Mycobacterium leprae* (AL583923); M.e, *Methylobacterium extorquens* (U28335); (Tomado de Luz-Madrigal, 2004).

Como ya se mencionó, se han distinguido diferencias genotípicas y fenotípicas de esta enfermedad por medio de estudios bioquímicos, clínicos y genético moleculares (Ledley and Rosenblatt, 1997). En este sentido se han

demostrado variaciones significativas en la actividad de la MCM en extractos libres de células provenientes de fibroblastos cultivados *in vitro* de pacientes con AMM (Fenton *et. al.*, 1987; Janata *et. al.*, 1997). Por otro lado, Ledley *et. al.* (1988) demostraron que existe una disminución en la cantidad de RNAm de la MCM de líneas celulares deficientes en la actividad de la MCM, lo que se refleja también en una baja o nula producción de la enzima.

El cultivo de fibroblastos implica que hay que tomar muestras de piel (biopsias), lo que no siempre es posible. Por otro lado, existe un reporte de medición de la actividad enzimática en linfocitos extraídos de pacientes con AMM; aunque este método no radiométrico puede proporcionar varias ventajas, no se aplica rutinariamente (Kikuchi *et. al.*, 1989).

El DNA genómico utilizado para los estudios moleculares se ha obtenido también de fibroblastos cultivados *in vitro* (Sawada and Ledley, 1992) sin embargo, se ha reportado que el DNA obtenido de sangre fresca o congelada puede ser amplificado por el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sin problemas (Jansen *et. al.*, 1989). El DNA obtenido de los cultivos de fibroblastos se ha utilizado para amplificar los exones del gen de la mutasa (Adjalla *et. al.*, 1998a), estudiar la expresión (Crane *et. al.*, 1992b), localizar mutaciones por medio de vectores de expresión (Jansen and Ledley, 1990) siendo pocos los reportes en donde utilizan DNA genómico de sangre total (Champattanachai *et. al.*, 2003). Sin embargo, en estos estudios hay que invertir mucho tiempo y dinero, ya que hay que amplificar y secuenciar todos los exones de cada uno de los pacientes. Una alternativa para la localización de

mutaciones a lo largo de un gen, son las técnicas de análisis de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP) o el análisis de heterodúplex, las cuales son apropiadas para una búsqueda de mutaciones, pérdidas o inserciones de nucleótidos dentro de la molécula de DNA, ya que presentan la ventaja de detectar el cambio de una sola base por la conformación que toma la hélice de DNA, con una resolución hasta de un 98%. Sin embargo, se ha reportado un solo trabajo en la literatura donde se utiliza esta metodología para la búsqueda de mutaciones en el gen de la MCM (Fuchshuber *et. al.*, 2000).

Debido a que algunas formas de AMM pueden tratarse con cobalamina, mientras que otras no, se ha intentado restaurar la actividad de la MCM por transferencia de genes *in vivo* con el complejo DNA de mutasa-asialoglicoproteínas a células de hígado de ratón y se ha observado expresión de la actividad de MCM de humano (Chang *et. al.*, 1999).

Otra terapia alternativa que se ha propuesto es el uso de retrovirus recombinantes, a los cuales se les ha insertado el cDNA de MCM y su transferencia en cultivos de hepatocitos normales, aunque con resultados no muy satisfactorios (Sawada and Ledley, 1992).

JUSTIFICACIÓN

Aunque ya se tienen descritas algunas mutaciones en el gen que codifica para la MCM en distintas poblaciones, como en los japoneses y caucásicos, en México no se ha realizado ningún estudio similar en pacientes con AMM ó con cualquier otra enfermedad relacionada con errores innatos del metabolismo. Por esta razón resulta importante realizar estos estudios de secuenciación e identificación de las mutaciones encontradas en el gen de la MCM en pacientes mexicanos diagnosticados con AMM en el Instituto Nacional de Pediatría, como un primer intento para realizar este tipo de estudios en México.

OBJETIVO GENERAL

Secuenciar e identificar las mutaciones en el gen de la metilmalonil-CoA mutasa de pacientes mexicanos con AMM diagnosticada en el Instituto Nacional de Pediatría, utilizando DNA genómico obtenido a partir de sangre total.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar si las mutaciones en la población mexicana corresponden a las previamente reportadas en el mundo o si existen nuevas mutaciones.
- Definir el posible papel causal de los cambios de secuencia identificados a través de analizar a los padres y otros hermanos afectados y/o sanos.
- Establecer si los cambios encontrados en los pacientes están presentes en sujetos sanos no relacionados de la población mexicana.

METODOLOGÍA

POBLACIÓN DE ESTUDIO

En el siguiente estudio se utilizaron los siguientes criterios de inclusión en sujetos normales:

- 1) Ser clínicamente sanos
- 2) No estar relacionados con los pacientes

Criterios de inclusión para los pacientes con AMM:

- 1) Haber presentado niveles altos de ácido metilmalónico en orina mediante su detección por cromatografía de gases.
- 2) Haber presentado niveles altos de acilcarnitinas detectados a través del tamiz ampliado.
- 3) Haber sido diagnosticados clínicamente con AMM.

Criterio de exclusión:

- 1) Presentar nivel altos de homocisteína.

Al inicio del trabajo se tenían registrados 15 pacientes diagnosticados con AMM en la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto Nacional de Pediatría, 5 de los cuales dejaron de asistir a consulta en esta institución por diversas razones. De los 10 restantes se tienen registros completos pero hubo una defunción, sin embargo se descartaron cuatro, ya que presentaban altos niveles de homocisteína, lo que indicaba que se trataba de fenotipos *cbl*, es decir, un defecto en la síntesis de cobalamina. Por lo tanto se trabajaron las muestras de 6 pacientes.

HISTORIA CLÍNICA DE LOS PACIENTES

Paciente 1 (ETN):

Fecha de nacimiento 8/jul/00. Paciente masculino originario de León, Guanajuato. Padres consanguíneos (primos en 2º grado); antecedente de una hermana fallecida a los 8 meses de edad con el mismo diagnóstico. Los síntomas iniciaron a la edad de 3 meses con vómitos constantes, acidosis metabólica y letargia. La confirmación de la enfermedad se hizo a los 9 meses de edad presentando un moderado daño neurológico. Actualmente el paciente se encuentra con tratamiento de cobalamina (2 mg diarios), aunque no presenta gran avance psicomotriz debido a la detección tardía de la enfermedad. A principios del 2003 se le practicó una gastrostomía para proporcionarle una mejor alimentación, debido al deficiente estado nutricional que presentaba.

Paciente 2 (DGM):

Fecha de nacimiento 9/nov/01. Paciente masculino del Distrito Federal de padres no consanguíneos. La hermana mayor de 6 años es normal. El paciente comenzó con crisis de apnea y convulsiones a los dos meses de nacimiento. Se le practicó en dos ocasiones el tamiz neonatal ampliado en una institución privada, resultando normal; posteriormente se le diagnosticó la AMM en la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto Nacional de Pediatría, donde se le cuantificaron los ácidos orgánicos presentando altos niveles de metilmalonato (40 mg/ml) lo que implica que los resultados del tamiz

que se le practicó fueron falsos negativos. Los niveles de homocisteína fueron normales. El paciente tiene un retraso psicomotriz moderado. Al inicio del diagnóstico se le administró vía intramuscular 1 mg de hidroxicobalamina diario y después vía oral, posteriormente se aumentó la dosis a 2 mg diarios, respondiendo satisfactoriamente al nuevo tratamiento por lo que se le amplió la dieta. Actualmente el paciente se encuentra en terapia de estimulación; metabólicamente se encuentra estable.

Paciente 3 (AJAZ):

Fecha de nacimiento 26/feb/03. Paciente masculino originario del Distrito Federal de padres no consanguíneos. Tiene el antecedente de un hermano fallecido con la misma afección a los 9 días de nacido. Presentó letargias, vómitos constantes e intolerancia a la leche materna desde los 4 días. Tuvo varias crisis metabólicas hasta los 4 meses aproximadamente cuando se le diagnosticó la enfermedad e inició el tratamiento con vitamina B₁₂ (2 mg/diarios I.M.) y se le proporcionó una dieta libre de proteínas. Actualmente presenta retraso psicomotriz moderado y se encuentra estable metabólicamente, aunque no responde satisfactoriamente al tratamiento con vitamina B₁₂.

Pacientes 4 y 5 (GLP) (MJLP):

Fechas de nacimiento 20/sep/00 y 29/dic/01, respectivamente. Pacientes masculino y femenino originarios de una rancharía en el estado de

San Luis Potosí. Embarazos normales. Hijos 3° y 4° de padres no consanguíneos. Hermana mayor de 6 años normal; el 2° hijo falleció con diagnóstico de AMM a los 15 meses, presentándose en los 3 hermanos letargia, vómitos, deshidratación e intolerancia a la leche materna desde el tercer día de nacimiento. Ambos presentaron retraso psicomotriz moderado pero respondieron a estímulos. Al niño se le administró por un tiempo hidroxicoalamina y respondió moderadamente; la niña no tuvo medicación hasta los 6 meses de edad. En febrero del 2003 la niña falleció repentinamente. Actualmente el niño se encuentra con dieta y con tratamiento con hidroxicoalamina de 1 mg diario.

Paciente 6 (ALBM):

Fecha de nacimiento 3/ene/00. Paciente del sexo femenino originaria de Michoacán de padres consanguíneos (primos en 2° grado). Diagnosticada con AMM a los 3 meses cuando presentó una acidosis metabólica severa y retraso psicomotriz. La paciente se encuentra desde entonces con una estricta dieta. En agosto del 2002 se le practicó una gastrostomía debido a su deficiente alimentación, la cual se retiró en el 2003 ya que su estado nutricional había mejorado. Mediante el tamiz ampliado se le detectó la presencia de acilcarnitinas que es un indicador de acidemias orgánicas.

OBTENCIÓN DEL DNA GENÓMICO

En la mayor parte de los trabajos realizados en la búsqueda de mutaciones en el gen de la MCM en pacientes con AMM, el DNA o DNAC se ha obtenido a partir de los cultivos de fibroblastos, lo que no siempre es posible debido a que no hay disponibilidad de las muestras, por lo que este trabajo se realizó a partir de la purificación del DNA proveniente de leucocitos de sangre total de los pacientes.

Se obtuvieron de 1-5 ml de sangre total de individuos normales y pacientes y se congeló en viales con EDTA hasta su utilización. La extracción del DNA genómico se realizó por los métodos ya reportados (Lin and Floros, 2000), utilizando la técnica de extracción con fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y posterior digestión con Proteinasa K (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y RNasa (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Se determinó la concentración del DNA por espectrofotometría y la pureza por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% (Sambrook *et. al.*, 1989).

OLIGONUCLEÓTIDOS PARA EL PCR.

Para la amplificación de los exones correspondientes a la MCM se utilizaron los oligonucleótidos mostrados en la tabla 4. Cabe destacar que la secuencia de éstos se encuentra en la región intrónica, muy cercana al inicio de cada exón. La mezcla de reacción para la amplificación del DNA por PCR se muestra en la tabla 5.

Oligonucleótido	Fragmento	Tm	Ref.
Exon 3A: 5' CCA GAC TCT TGA ATC TTA CAT 3' 3B: 5' CAA GGA ACT ATA GAA AAA C 3'	449 pb	54°C	Adjalla, 1998a.
Exon 5A: 5' AAT TAA ATT CTG GAC CTA 3' 5B: 5' ACT TTA TTA AAA TTC TAC AT 3'	246 pb	50°C	Adjalla, 1998a.
Exon 6A: 5' CAT ATC TAT CAC CGT TCT TGA G 3' 6B: 5' CTA TAA ATC TGA AAA CAA AGT T 3'	337 pb	56°C	Fuchshuber, 2000, Modificado.
Exon 9A: 5' CAA TGT AAA TTG TCC CTT TC 3' 9B: 5' ACA GGA TCA ACC TTT TAT TTA 3'	244 pb	55°C	Fuchshuber, 2000, Modificado.
Exon 11A: 5' ACT TGA AGA TTT GCT GTG 3' 11B: 5' TGT CTG TCA TCA TTT TAC TAC 3'	321 pb	60°C	Adjalla, 1998a.
Exon 12A: 5' CAG GGT TTT TAT AGT CAT TA 3' 12B: 5' CAA GAT TCC CAT CAC AGT 3'	276 pb	64°C	Adjalla, 1998a.

Tabla 4. Secuencia, tamaño del fragmento y temperatura de alineamiento de los diferentes exones del gen de la MCM amplificados por PCR.

REACTIVO	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
DNA genómico	1 µL	100-150 ng
Amortiguador 10X	5 µl	1 x
MgCl ₂ 30 mM	4.2 µl	2.5 mM
dNTP's 10 mM	1 µl c/u	0.2 mM
Oligo sentido 15 µM	1.7 µl	0.5 µM
Oligo antisentido 15 µM	1.7 µl	0.5 µM
Taq polimerasa 5 U/µl	0.5 µl	2.5 U
H ₂ O	30.9 µl	
Volumen total	50 µl	

Tabla 5. Condiciones finales para la amplificación por PCR de los diferentes exones del gen de la MCM.

ESTANDARIZACIÓN DEL PCR

Se realizaron las estandarizaciones de las condiciones del PCR con muestras de DNA normales. Para cada par de oligonucleótidos se estandarizó la amplificación en tiempo y temperatura de alineamiento, número de ciclos,

concentración de MgCl₂ y concentración de DNA genómico. El tamaño esperado de los productos de amplificación de PCR se corroboró en geles de agarosa al 1.5% de acuerdo a la metodología reportada (Sambrook *et. al.*, 1989).

PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR.

Los productos de PCR se purificaron de los geles de agarosa al 2% con el kit QIAkit de marca QIAGEN, cortando la banda correspondiente y siguiendo las instrucciones del fabricante.

SECUENCIACIÓN

Los fragmentos purificados se secuenciaron utilizando los oligonucleótidos correspondientes por medio de un secuenciador automático ABI-PRISM 310 (Perkin Elmer, USA) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, o por secuencia manual utilizando el kit de secuenciación “Sequenase Versión 2.0 DNA”, Amersham.

ANÁLISIS DE LA SECUENCIA.

El análisis y comparación de las secuencias obtenidas se realizó con la ayuda del software de la base de datos del centro de Información Biotecnológica (NCBI) disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Altschul *et. al.*, 1997) y del software de ExPasy (<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL>).

RESULTADOS

AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL DNA HUMANO.

La pureza, el rendimiento y la integridad del DNA genómico obtenido a partir de sangre total utilizando la técnica reportada por Lin y Floros (2000), se observó a través de la absorbancia a 260/280 nm y de las bandas obtenidas en geles de agarosa al 1.5%, mostrando buenos resultados como se puede observar en la Fig. 14.

AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE LA MCM.

Una vez obtenido el DNA genómico se procedió a estandarizar las condiciones para la amplificación, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de los exones 3, 5, 6, 9, 11 y 12 del gen de la metilmalonil-CoA mutasa utilizando los oligonucleótidos mencionados en la tabla 4. Se seleccionaron estos exones porque en ellos se concentran el mayor número de las mutaciones reportadas. Se verificó el tamaño de los productos por electroforesis en agarosa. Cabe mencionar que a partir de los exones 2 y 13 no se pudieron obtener los productos de PCR del tamaño esperado, probablemente como resultado de la inespecificidad de los oligonucleótidos o de las condiciones del PCR, sin embargo en todos los demás casos los productos del PCR que se obtuvieron fueron del tamaño esperado.

Después que el tamaño de los productos de PCR para cada exón fue confirmado (Tabla 4; Fig. 15), éstos se purificaron a partir de los geles de agarosa para posteriormente secuenciarlos. Para obtener la secuencia se utilizaron de manera independiente los mismos oligonucleótidos sentido y antisentido que para la amplificación en una concentración de 4 pmoles/ μ l.

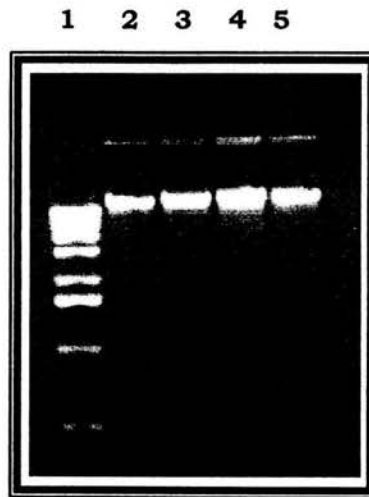


Figura 14. Integridad del DNA genómico purificado. Carril 1 marcador de peso molecular de 1 Kb. Carriles 2-5 muestras de DNA purificado.

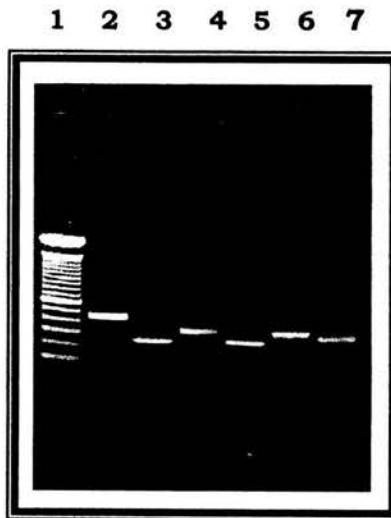


Figura 15. Productos de PCR de cada uno de los exones amplificados. Carril 1, marcador de 100 pb; carril 2, exón 3; carril 3, exón 5; carril 4, exón 6; carril 5, exón 9; carril 6, exón 11 y carril 7, exón 12.

Para tratar de detectar posibles polimorfismos en la secuencia del gen de la MCM de la población mexicana, se comparó la secuencia de 4 a 16 alelos de individuos sanos no relacionados con la secuencia correspondiente depositada en el GenBank (No. de acceso AH003531). Después de realizar los alineamientos no se identificó ningún cambio (Tabla 6).

Exón	Tamaño (pb)	# de alelos muestreados	polimorfismos
3	449	10	No
5	246	12	No
6	337	4	No
9	244	4	No
11	321	12	No
12	276	16	No

Tabla 6. Análisis de alelos en los diferentes exones.

Como no se encuentra reportada la secuencia de aminoácidos correspondientes a cada uno de los exones, ésto se realizó manualmente y en la figura 16 se muestran los límites de cada exón.

1	mlraknqlfl	lsphylrqvk	essgsrliqq	rllhqqqplh	pewaalakkq	lkgknpedli
61	whtpegisik	plyskrdtmd	lpeelpgvkp	ftrgpyptmy	tfrpwtirqy	agfstveesn
121	kfykdnikag	qqqlsvafdl	athrgydsdn	prlrqdvqma	gvaidtvedt	kilfdgiple
181	kasvsatang	avipvlanfi	vtgeeqqvpk	ekltgtiqnd	ilkefavznt	yafppdpank
241	tiadifeyta	khmpkfnsis	isgyhmqeag	adafswwayt	ladgleysrt	glqagltide
301	faprlsffwg	igmfnhmeia	kmragrrlwa	hliekmfqqk	nskslllrah	cqtsqwslte
361	qdpynnivrt	aieamaavfg	gtqslhtnsf	dealglptvk	sariarntqi	iiqeesgipk
421	vadpwggsym	mecltndvyd	aalklineie	emggmakava	egipklriee	caarrqarid
481	sgsevivgvn	kyqlekedav	evlatdntsv	rnrqigklkk	ikssrdqala	ehclaaltec
541	aasgdgnila	lavdasrarc	tvgeitdalk	kvfgehkan	rmvsgayrqe	ygeskeitsa
601	ikrvhkfmer	egrrprllva	kmgqdghdrg	akviatgfad	lgfdvdigpl	fgtprevaqq
661	avdadvhavg	vstlaaghkt	lvpelikeln	slgrpdilvm	cgvvippqdy	eflfevgvsn
721	vfgpgtripk	aavqvlddie	kclekkqqsv			

Fig 16. Secuencia de aminoácidos de la MCM mostrando los límites de cada exón: Exon 2 [], exón 3 [], exón 4 [], exón 5 [], exón 6 [], exón 7 [], exón 8 [], exón 9 [], exón 10 [], exón 11 [], exón 12 [], exón 13 [].

Debido a que en el GenBank tampoco se encuentra la traducción de la secuencia de nucleótidos del mensajero en una sola figura, se procedió a realizarla mediante el programa ExPASy, disponible en <http://www.expasy.org/swissmod/> (Fig. 17).

```

atgtaagagctaaagaatcagcttttttactttcacctcattacctgaggcaggtaaaagaatcatcaggetccaggetcatacagcaa 90
M L R A K N Q L F L L S P H Y L R Q V K E S S G S R L I Q Q
cgacttctacaccagcaacagccccttccccagaatgggtgcctctggctaaaagcagctgaaaggcaaaacccagaagacctaa 180
R L L H Q Q Q P L H P E W A A L A K K Q L K G K N P E D L I
tggcacacccgggaaggatctctataaaacccctgtattccaagagagatacttggaactacctgaagaactccaggagtgaagcca 270
W H T P E G I S I K P L Y S K R D T M D L P E E L P G V K P
ttcacacgtggaccatctcaccatgtataccttttagccctggaccatccgccagatgctggttttagtactgtggaagaagcaat 360
F T R G P Y P T M Y T F R P W T I R Q Y A G F S T V E E S N
aagttctataaggacaacattaaaggctggcagcaggattatcagttgctttgatctggcgacacatcgtggctatgattcagacaac 450
K F Y K D N I K A G Q Q G L S V A F D L A T H R G Y D S D N
cctcgagttcgtggtgagttggaatggctggagttgctattgacactgtggaagataccaaaattctttttagtgaattccttagaa 540
P R V R G D V G M A G V A I D T V E D T K I L F D G I P L E
aaaatgtcagtttccatgactatgaatggagcagttattccagttcttgcaaaattttatagtaactggagaagaacaaggtgacctaaa 630
K M S V S M T M N G A V I P V L A N F I V T G E E Q G V P K
gagaaacttactggtaccatccaaaatgatataactaaaggaatttatggttcgaaatacatacattttctccagaacctccatgaaa 720
E K L T G T I Q N D I L K E F M V R N T Y I F P P E P S M K
attattgctgacatatttgaatatacagcaaaagcagcaagcaaaatttcaattcaatttagtggaataccatgaggaaagcagg 810
I I A D I F E Y T A K H M P K F N S I S I S G Y H M Q E A G
gctgatgccattctggagctggcctatacttttagcagatggattggagtactctagaactggactccagggtggcctgacaattgatgaa 900
A D A I L E L A Y T L A D G L E Y S R T G L Q A G L T I D E
tttgcaaccaaggtgtcttcttctgggaattggaatgaattctctataggaatagcaagatgagagctggtagaagactctgggct 990
F A P R L S F F W G I G M N F Y M E I A K M R A G R R L W A
cacttaatagagaaaaatttccagcctaaaaactcaaaatctcttcttcaagagcacactgtcagacatctggatggtcacttactgag 1080
H L I E K M F Q P K N S K S L L L R A H C Q T S G W S L T E
caggatccctacaataatattgtccgtactgcaatagaagcaatggcagcagttttggagggactcagttcttgcacacaaaattcttt 1170
Q D P Y N N I V R T A I E A M A A V F G G T Q S L H T N S F
gatgaagctttgggtttggcaactgtgaaaagtgctcgaattgccaggaacacacaaatcatcattcaagaagaatctgggattcccaaa 1260
D E A L G L P T V K S A R I A R N T Q I I I Q E E S G I P K
gtggctgaccttggggagggtcttacatgatggaatgtctcacaatgatgtttatgatgctgctttaaagctcattaatgaaattgaa 1350
V A D P W G G S Y M M E C L T N D V Y D A A L K L I N E I E
gaaatgggtggaatggcacaagctgtagctgaggaatcacctcaacttogaattgaagaatgtgctgcccgaagacaagctagaatagat 1440
E M G G M A K A V A E G I P K L R I E E C A A R R Q A R I D
ctggttctgaagtaattgttggagtaataagtaaccagttggaaaagaagacgctgtagaagttctggcaattgataaactctcagtg 1530
S G S E V I V G V N K Y Q L E K E D A V E V L A I D N T S V
cgaaaacaggcagattgaaaaacttaagaagatcaaatccagcaggatcaagcttggctgaacattgtcttgcactaaccgaatgt 1620
R N R Q I E K L K K I K S S R D Q A L A E H C L A A L T E C
gctgtagcggagatgaaaatctcctggctcttgcagtgatctcgggcaagatgtacagtgaggagaatcacagatgccctgaaa 1710
A A S G D G N I L A L A V D A S R A R C T V G E I T D A L K
aaggtatttggtagaacataaaggcaatgatcgaatggtgagtgagcatatcgccaggaattggagaaagttaaagagataacatctgct 1800
K V F G E H K A N D R M V S G A Y R Q E F G E S K E I T S A
atcaagagggttcataaattcatggaacgtgaaggtcgagacctcgtctcttctgtagcaaaaatgggacaagatggccatgacagagga 1890
I K R V H K F M E R E G R R P R L L V A K M G Q D G H D R G
gcaaaagtattgctacaggtttgctgatcttgggtttgtatgtggacataggccctctttccagactcctcgtgaagtgcccagcag 1980
A K V I A T E G F A D L G F D V D I G P L F Q T P R E V A Q Q
gctgtggatcgcgatgtgcatgctgtggcgtaagcaccctcgctggtcataaaacccctagttcctgaaactcatcaagaacttaac 2070
A V D A V H A V G V S T L A A G H K T L V P E L I K E L N
tcccttggacggccagatattcttgcagtggtggaggggtgataccacctcaggtatgaatttctgttgaagttgggtttccaat 2160
S L G R P D I L V M C G G V I P P Q D Y E F L F E V G V S N
Gtatttggcctggactcgaattccaaaagcctcgggtcaggtctgtatgataattgagaaggtttggaaaagaagcagcaatctgta 2250
V F G P G T R I P K A A V Q V L D D I E K C L E K Q Q S V

```

Fig 17. Traducción *in silico* de la secuencia de nt del RNAm de la MCM de humano.

ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE LOS PACIENTES.

Paciente 1 (ETN):

En este paciente se secuenciaron los exones 3, 5, 6, 11 y 12. Los alineamientos mostraron un cambio de nucleótido en el exón 12 en la posición 671, de GTA a ATA, lo que dio como consecuencia un cambio del codón de valina (Val) a isoleucina (Ile) (Fig 18). Este cambio de secuencia ocurre de forma homocigota. Esta mutación previamente reportada en población norteamericana (Crane *et. al.*, 1992a) presenta un fenotipo *mut⁻* y está localizada en el dominio de unión a la cobalamina. Por otro lado, se obtuvo también la secuencia de este exón en el DNA de ambos padres y se encontró que los 2 presentan este cambio de manera heterocigota.

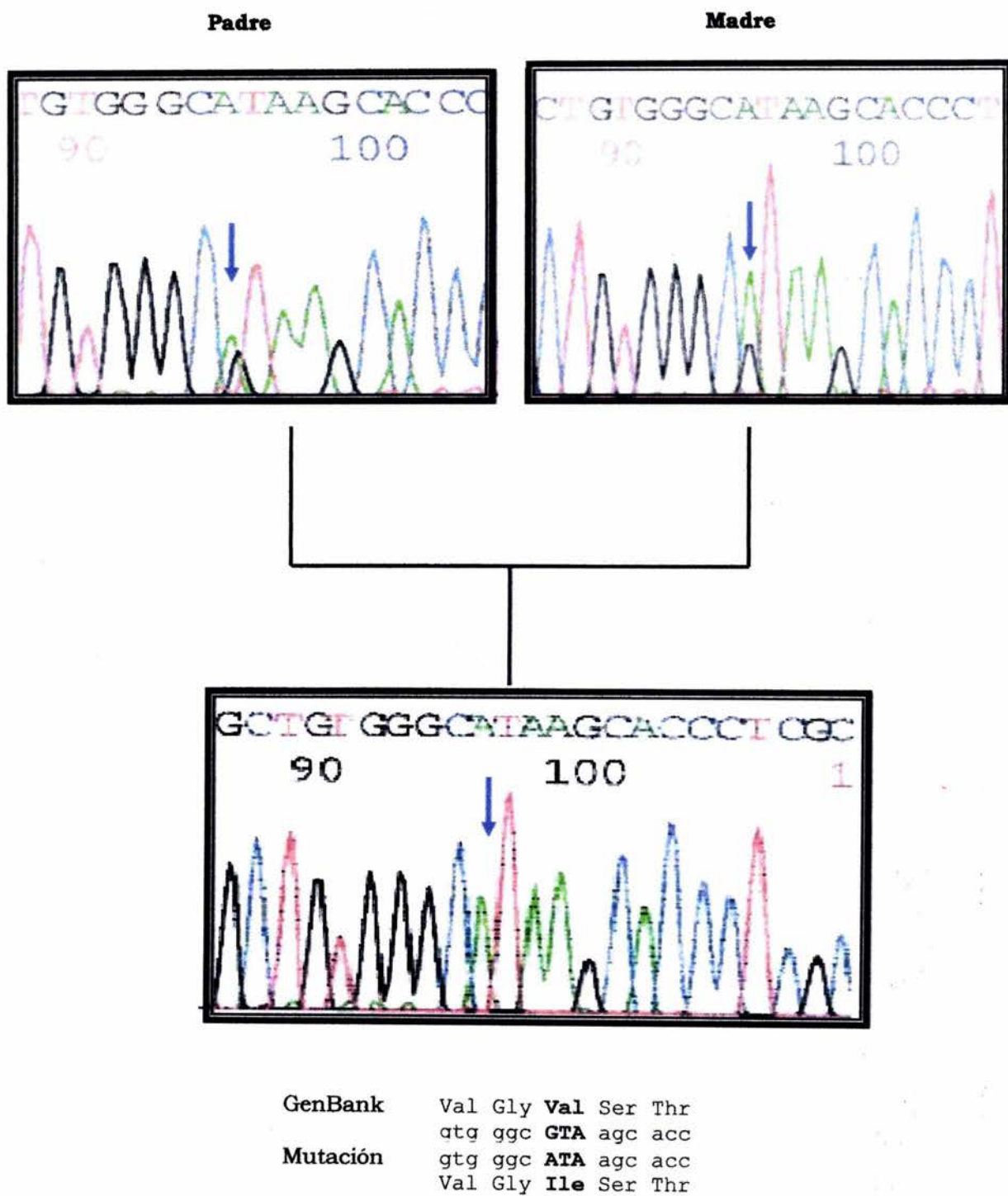
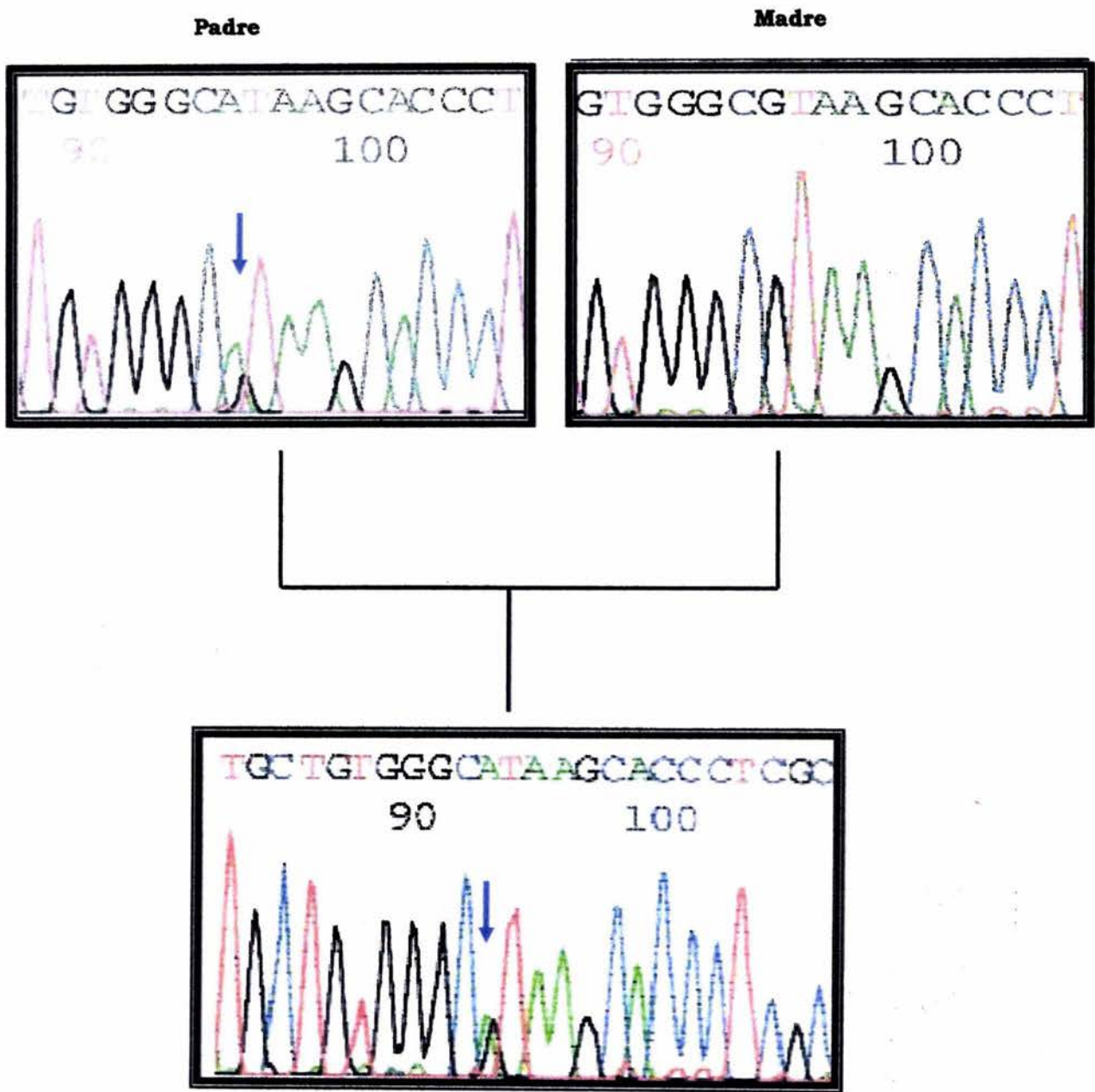


Fig. 18. Secuencia parcial del exón 12 del paciente 1, así como del padre y la madre.

Paciente 2 (DGM).

En las secuencias de los exones 3, 5 y 11 de este paciente no se encontró ningún cambio, pero en el exón 12 se encontró la misma mutación V671I antes mencionada en forma heterocigota. Al realizar el análisis del DNA de sus padres, se encontró que su papá presenta el mismo cambio, mientras que la secuencia de la madre es normal en este exón. Estos resultados hacen suponer que el paciente se trata de un heterocigoto compuesto, por lo que se están analizando las secuencias de los exones restantes en esta familia (Fig 19).



GenBank	Val	Gly	Val	Ser	Thr
	ata	ggc	GTA	agc	acc
Mutación	gtg	ggc	ATA	agc	acc
	Val	Gly	Ile	Ser	Thr

Fig 19. Parte de la secuencia del exón 12 del paciente 2 y de los padres.

Paciente 3 (AJAZ):

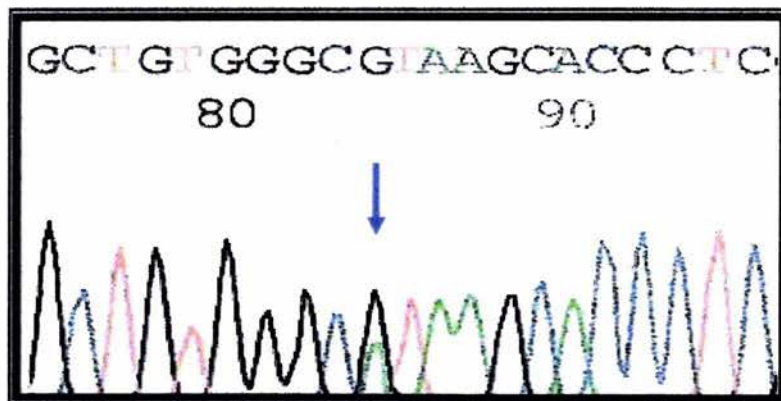
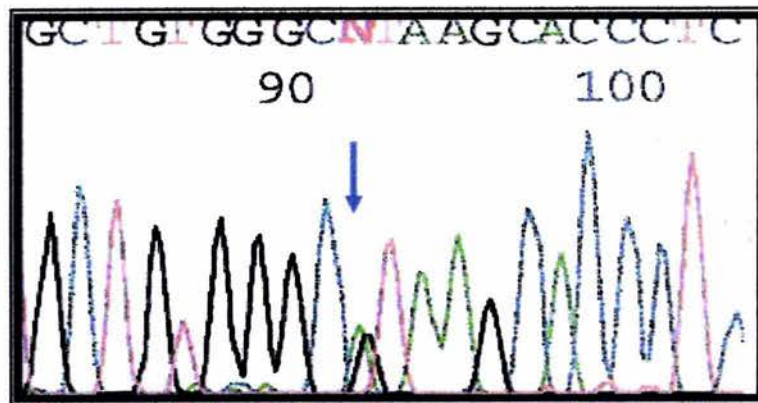
Se analizaron en este paciente los exones 3, 5, 6, 11 y 12 y se encontraron, un cambio en el exón 12 y dos en el exón 3, todos de forma heterocigota. El primer cambio en el exón 12, fue el mismo que en los 2 pacientes anteriores, la mutación V671I. Al analizar la muestra de la madre se localizó también esta mutación de forma heterocigota (Fig. 20).

En el padre se detectó en el exón 3 una mutación en el codón 228 de CGA por TGA, que corresponde al cambio de Arginina (Arg) por un codón de término. Esta mutación se denominó R228X y se encontró de forma heterocigota (Fig. 21).

Al realizar el análisis de la secuencia del exón 3 del paciente y de la madre se encontró que era difícil leerlas porque aparecen los picos encimados, por lo que se muestra en la figura 21 la secuencia en antisentido del paciente donde se puede observar que es heterocigoto para la misma mutación que presenta el padre (R228X).

Al observar con más detalle las secuencias del paciente y de la madre se observó una inserción de 8 nucleótidos (AATTTATG) en la posición 679 que modifica completamente el marco de lectura a partir de ese punto (Fig. 22). Esta modificación se confirmó en la secuencia antisentido. Esta inserción es una repetición de los 8 nucleótidos anteriores (nt 671-678). Tanto la madre como el paciente tienen la inserción 679ins8 de forma heterocigota. Cabe destacar que ambos cambios en el exón 3, el R228X y el 679ins8 no se encuentran reportados en la literatura.

Madre
Exón 12

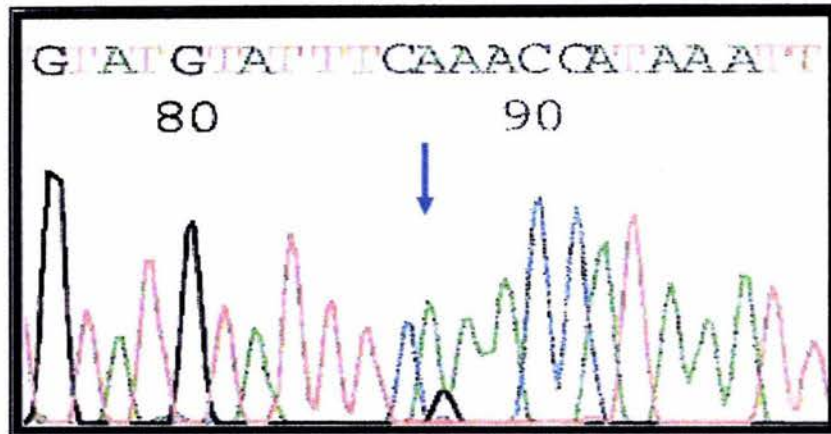
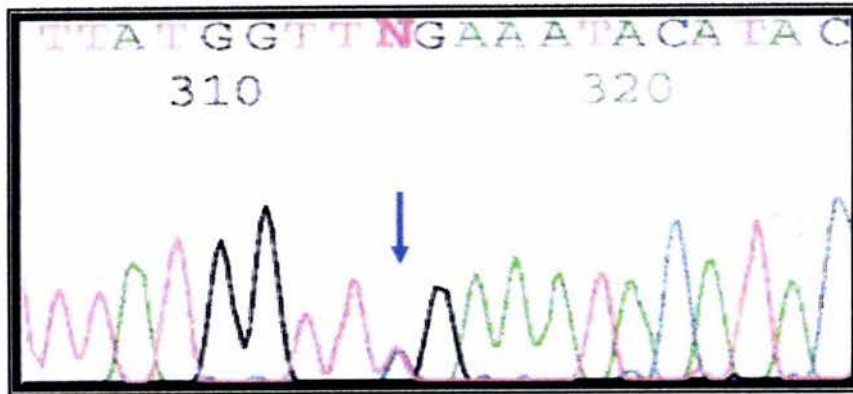


Paciente 3
Exón 12

GenBank	Val Gly Val Ser Thr
	gtg ggc GTA agc acc
Mutación	gtg ggc ATA agc acc
	Val Gly Ile Ser Thr

Fig 20. Secuencias parciales del exón 12 del paciente 3 y de su madre, indicando el sitio en donde se encontró la mutación V671I.

Padre
Exón 3

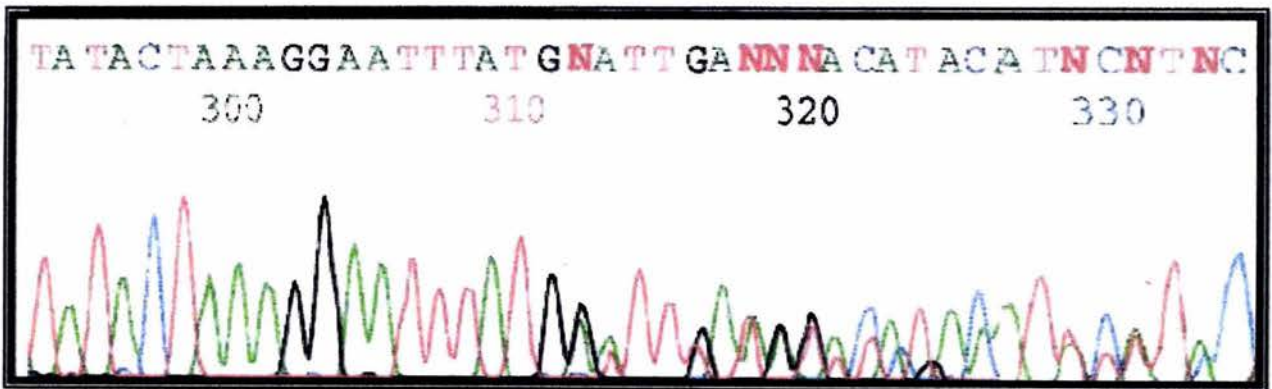
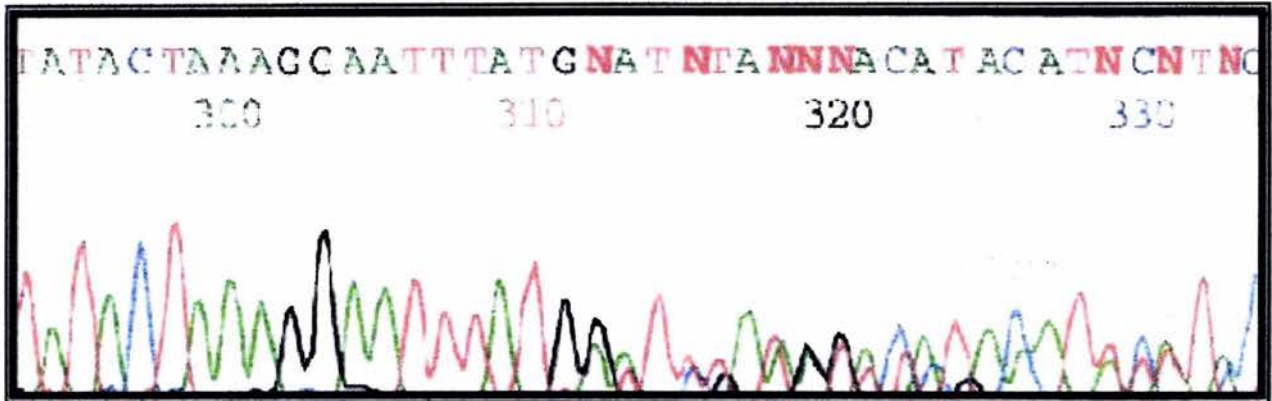


Paciente 3
Exón 3
(antisentido)

GenBank	Phe	Met	Val	Arg	Asn	Thr	Tyr
	ttt	atg	gtt	CGA	aat	aca	tac
Antisentido	aaa	tac	caa	ACT	tta	tgt	atg
Mutación	ttt	atg	gtt	TGA	aat	aca	tac
	Phe	Met	Val	STOP	Asn	Thr	Tyr

Fig 21. Secuencias parciales del exón 3 del paciente 3 y de su padre, indicando el sitio donde ocurrió el cambio en sentido en el padre y antisentido en el paciente, ambos de manera heterocigota.

Madre
Exón 3



Paciente 3
Exón 3

GenBank	L	K	E	F	M	V	R	N	T	Y	I	F	P	P
Normal	Leu	Lys	Glu	Phe	Met	Val	Arg	Asn	Thr	Tyr	Ile	Phe	Pro	Pro
Mutación alelo 1	cta	aag	gaa	ttt	atg	ggt	CGA	aat	aca	tac	att	ttt	cct	cca
Mutación alelo 2	cta	aag	gaa	ttt	atg	ggt	TGA	aat	aca	tac	att	ttt	cct	cca
	cta	aag	gaa	ttt	atg	AAT	TTA	TGg	ttC	gaa	ata	cat	aca	ttt
	I.	K	E	F	M	N	I.	W	F	F	T	H	T	F

Fig 22. Secuencias parciales del exón 3 del paciente 3 y de su madre, indicando el sitio donde se insertan 8 nt.

Por otro lado para conocer que modificaciones introduce esta inserción a la MCM de este paciente y su madre, se llevó a cabo la traducción de la secuencia de nucleótidos *in silico* mediante el programa ExPasy. En la figura 23 se puede observar que la secuencia mutada genera, además del cambio del marco de lectura, varios codones de término y que la mutasa formada estaría truncada desde el aminoácido 242.

NORMAL

Met LRAKNQLFLLSPHYLRQVKESGSRLLIQRLLHQQQPLHPEWAALAKKQKLGKNP
 EDLIWHTPEGISIKPLYSKRDT Met DLPEELPGVKPFTRGPYPT Met YTFRPWTIRQYAGF
 STVEESNKFYKDNKAGQQGLSVAFDLATHRGYSDNPRVRGDVGMet AGVAIDTVED
 TKILFDGIPLEK Met SVS Met T Met NGAVIPVLANFIVTGEEQGVPKKLTGTIQNDILKEF
 Met VRNTYIFPPEPS Met KIIADIFEY TAKH Met PKFNSISISGYH Met QEAGADAILELAYT
 LADGLEYSRTGLOAGLTIDEFAPRLSFFWGIG Met NFY Met EIAK Met RAGRRLWAHLIEK
 Met FQPKNSKSLLLRAHCQTS GWSL TEQDPYNNIVRTAIEA Met AAVFGGTQSLHTNSF
 DEALGLPTVKSARIARNTQIIQEESGIPKVADPWGGSY Met Met ECLTNDVYDAALKLI
 NEIEE Met GG Met AKAVAEGIPKLRIEECAARRQARIDSGSEVIVGVNKYOLEKEDAVEV
 LAIDNTSVRNRQIEKLLKIKSSRDQALAEHCLAALTECAASGDGNILALAVDASRARC
 TVGEITDALKKVFGEHKANDR Met VSGAYRQEFGESKEITSAIKRVHKF Met EREGRRP
 RLLVAK Met GQDGHDRGAKVIATGFADLGFVDIGPLFQTPREVAQQAVDADVHAVG
 VSTLAAGHKTLP ELIKELNSLGRPDILV Met CGGVIPPQDYEFLEFVGVSNVFGPGTRI
 PKAAVQVLDDIEKCLEKKQQSV

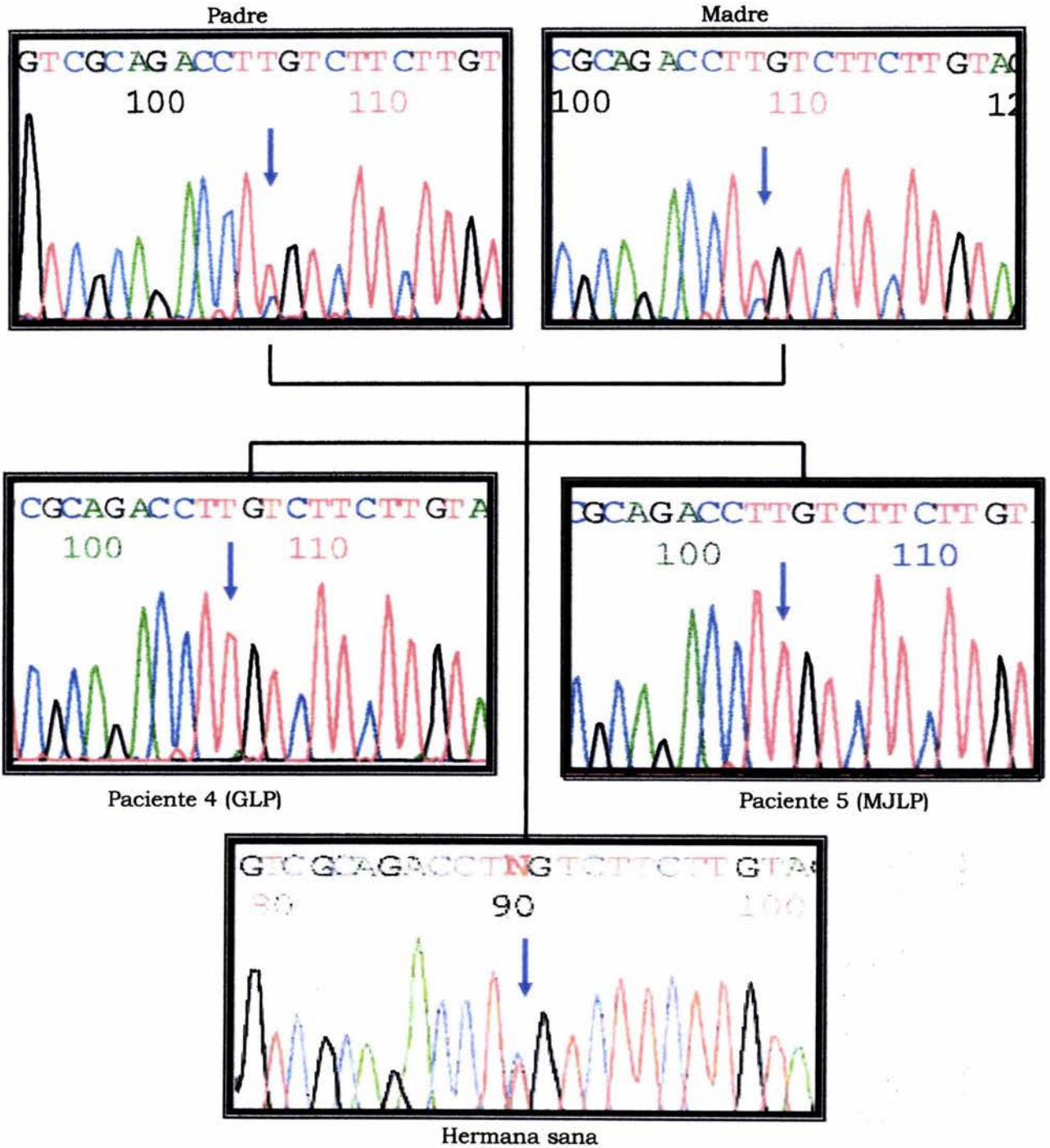
MUTACION 679ins8

Met LRAKNQLFLLSPHYLRQVKESGSRLLIQRLLHQQQPLHPEWAALAKKOLKGKNP
 EDLIWHTPEGISIKPLYSKRDT Met DLPEELPGVKPFTRGPYPT Met YTFRPWTIRQYAGF
 STVEESNKFYKDNKAGQQGLSVAFDLATHRGYSDNPRVRGDVGMet AGVAIDTVED
 TKILFDGIPLEK Met SVS Met T Met NGAVIPVLANFIVTGEEQGVPKKLTGTIQNDILKEF
 Met NLWFEIHTFFLQNHPS top KLLLTLYLNIQQSTCQNLIQFQLVDTICRKOGL Met PFW S
 WPIL Stop Q Met DWSTLEELDSRLA Stop QL Met NLHQGCLSSGELE Stop ISIW K Stop QR Stop EL
 VEDSGE T Stop Stop RKCFSLKTQNLFF Stop EHTVRHLDGHLLSRIPTIHSVLQ Stop KQWQQ
 YLEGLSLCTQILL Met KLWVCQL Stop KVLELPGTHKSSFKKNLGFPKWLILGEVLT Stop W
 NVSQ Met Met F Met Met LL Stop SSL Met KKKK WVE WPKL Stop LREYLN FELKNVLPEDKLE
 Stop ILV LK Stop LLE Stop ISTSWKKKTL Stop KFWQLIILQCETGRKLNLRNSNPAGIKLWEN
 IVLLH Stop PNVLLAE Met ETSWLLQW Met HLGQDVQWEKSQ Met P Stop KRYLVNIKR Met IE
 W Stop VEHIARNLEKVKR Stop HLLSRGFINSWNVK VADLVFL Stop QKWDK Met A Met TEEQ
 KLLLQDLLILVL Met WT Stop ALFSRLLVK WPSRLW Met R Met C Met LWA Stop APSLLVIK P
 Stop FLNSSKNL TPLDGGQIFLSCVEG Stop YHLRI Met NFCLKLVFP Met YLVLGLEFQRLPFR
 CL Met ILRSVWKRSSNI

Fig 23. Secuencias de aa de la MCM normal y mutada con la 679ins8, mostrando la región que cambia.

Pacientes 4 y 5 (GLP) (MJLP):

En estos pacientes se analizaron los exones 3, 5, 11 y 12 y se encontró una mutación en el exón 11 en la primera posición del codón 616, de CGT por TGT, cambiando de arginina (Arg) a cisteína (Cys). Esta modificación se encuentra en el dominio de unión al cofactor, por lo que es muy probable que se trate de un fenotipo *mut*⁻. Esta mutación, la cual no está reportada, se encontró en forma homocigota en ambos hermanos afectados. Al hacer el análisis de las secuencias de ambos padres y de la hermana sana, se encontró que todos ellos presentan este mismo cambio de forma heterocigota (Fig 24).



GenBank	Arg Arg Pro Arg Leu Leu Val
	cac aga cct CGT ctt ctt gta
Mutación	cgc aga cct TGT ctt ctt gta
	Arg Arg Pro Cys Leu Leu Val

Fig 24. Fragmentos de las secuencias del exón 11 de los pacientes 4 y 5, de sus padres y hermana sana, indicando el sitio en donde se encontró la sustitución de Arg a Cys.

Paciente 6 (ALBM):

Se han analizado 5 exones en esta paciente (3, 5, 6, 11 y 12) y hasta el momento no se ha encontrado ningún cambio en su secuencia ni en la de sus padres.

DISCUSIÓN

La acidemia metilmalónica es una enfermedad que se presenta con una prevalencia de 1:48 000 a 1:61 000 recién nacidos según la región ó población estimada mediante el tamiz neonatal ampliado. Dado que muchos de los niños con AMM fallecen en la primera semana de vida por cetoacidosis o hiperamonemia, la verdadera frecuencia probablemente sea mayor (Vela-Amieva *et. al.*, 2003). Durante el tiempo de desarrollo de este trabajo se obtuvieron las muestras de sangre de 10 niños con esta enfermedad, los cuales fueron diagnosticados con AMM por medio del tamiz ampliado. Solo se realizó el estudio en 6 de ellos, ya que los otros 4 tuvieron los niveles de homocisteína altos y por lo tanto pertenecían al fenotipo *cbl*.

En 3 de estos 6 pacientes se encontró la mutación V671I, previamente reportada (Crane *et. al.*, 1992b) lo que implica el 50% de nuestra población estudiada. A esta cambio se le ha designado como polimorfismo ya que Crane *et. al.* (1992b) reportó que cultivos de fibroblastos *mut⁰* GM1673 con una expresión del 1% del RNAm de la MCM, transformados con vectores conteniendo el gen de la MCM, con el cambio de valina por isoleucina, incorporaban niveles de [¹⁴C]propionato equivalentes a una línea de fibroblastos normal. Estos resultados sugieren que este cambio no afecta la actividad enzimática y por lo tanto no es la causa de la enfermedad.

Por otro lado, tanto Crane *et. al.* (1992b) como Qureshi *et. al.* (1994) encontraron los cambios V671I y H532R asociados con otras mutaciones

(G717V, G623R y G703R) y estos últimos autores nuevamente los denominan como “polimorfismos” o “mutaciones benignas”.

Por otro lado, Berger *et. al.* (2001) reportan la presencia de la sustitución G→A en el nucleótido 2011 (V671I) también asociada a otra mutación (E414X) en uno de siete pacientes israelíes con AMM.

En ninguno de estos trabajos rastrean esta sustitución (V671I) en población normal y si se considera que un polimorfismo se define como un cambio en la secuencia de nt o aa sin modificar la actividad de la proteína y que se encuentra en el 1% de la población (Brown, 1999), entonces no se puede afirmar que este cambio sea un polimorfismo a menos que se analizara una muestra significativa de sujetos normales y se demostrara su presencia en un cierto porcentaje de ella.

Es probable que el cambio de valina por isoleucina no afecte la actividad de la MCM, pero cabe mencionar que el cambio V671I sólo se ha encontrado de forma homocigota en pacientes con AMM a diferencia del polimorfismo H532R que fue identificado tanto en un paciente tailandés como en sus padres y en 3 sujetos control de manera homocigota (Champattanachai *et. al.*, 2003).

Mientras tanto, los resultados encontrados en este trabajo indican que en el paciente 1 se encontró la mutación V671I de forma homocigota y en sus padres de forma heterocigota y que en el paciente 2 y en su padre esta mutación se encontró de forma heterocigota. Posiblemente en estos 2 casos se trate de heterocigotos compuestos, ya que no descartamos la posibilidad de

encontrar otras mutaciones que puedan ser las causantes de la enfermedad. Actualmente se están haciendo las amplificaciones de los exones restantes.

El fenotipo clínico de estos pacientes no es claro a través de la respuesta al tratamiento con vitamina B₁₂, ya que estos 2 pacientes respondieron medianamente a la hidroxicobalamina, quizá debido a que en ambos casos la detección de la enfermedad fue después de los 6 meses de edad, cuando ya presentaban daño neurológico moderado.

El paciente 3, también presenta el cambio V671I de forma heterocigota al igual que su madre, pero se encontraron otros 2 cambios importantes en el exón 3. Se encontró una sustitución de C → T en el nucleótido 682 que provoca que cambie el codón CGA para arginina al codón TGA que es un codón de término (R228X). Tanto el paciente como el padre son heterocigotos para esta mutación.

El otro cambio en el exón 3 que se localizó de manera también heterocigota en la madre y en el paciente fue una inserción de 8 nucleótidos en la posición 679. Esta inserción (679ins8) provoca un cambio en el marco de lectura, el cual genera codones de término, el primero en el codón 242 por lo que la mutasa formada también estaría incompleta. Por lo tanto, el paciente es un heterocigoto compuesto con posible fenotipo *mut*⁰ ya que ambos alelos generarían enzimas truncadas. En este sentido cabe mencionar que existe el antecedente de un hermano fallecido a los pocos días de nacido con el mismo diagnóstico y posiblemente el mismo genotipo. De cualquier manera habría que confirmar que estas mutaciones son las causantes de la enfermedad, midiendo

la actividad de la MCM en el paciente, así como en los padres, los cuales tendrían alrededor de un 50% de actividad enzimática, suficiente para que no se manifieste la AMM.

En los pacientes 4 y 5 (hermanos) se localizó un cambio de nucleótido de citosina por timina en la primera posición del codón 616 en el exón 11 cambiándolo de arginina (Arg) por cisteína (Cys). Esta mutación se presenta de manera homocigota en los pacientes mientras que en ambos padres y en la hermana sana se encontró de forma heterocigota. En los demás exones hasta el momento analizados no se ha encontrado algún otro cambio. Esta mutación se encuentra muy cerca de una zona de 90 aminoácidos reportada por Crane *et al.* (1994) en donde se han reportado 5 mutaciones (G626C, G630E, G648D, R694W y G717V) que pertenecen al fenotipo mut⁻ y que se encuentran en el dominio de unión a cobalamina. Clínicamente ambos pacientes presentaron los mismos síntomas y tienen el antecedente de un hermano fallecido del mismo padecimiento. Con estos datos podríamos suponer que la mutación R616C es la causante de la enfermedad y que posiblemente esta arginina sea importante para el buen funcionamiento de la proteína ya que se encuentra muy conservada en la mayoría de las MCM reportadas. Sin embargo habría que medir la actividad de la enzima en el paciente o realizar la construcción del gen mutado por mutagénesis dirigida y medir la actividad de la enzima *in vitro* para confirmarlo. Es muy importante señalar que la información obtenida para esta familia puede servir como una herramienta preventiva ya que se les informará que la hermana es portadora de la mutación de forma heterocigota y podría

tener hijos con AMM si el padre resultara también portador de ésta o cualquier otra mutación. También sería interesante analizar a un mayor número de miembros de la pequeña ranchería donde habitan, para establecer si existen otros portadores de la mutación R616C.

En el caso de la última paciente, se han analizado los exones 3, 5, 6, 11 y 12 y hasta el momento no se ha podido encontrar alguna mutación en la secuencia del gen de la MCM, por lo que suponemos que existe algún cambio en los exones restantes, los cuales se analizarán posteriormente, ya que está confirmado que esta paciente no presenta el fenotipo *cbl*, porque sus niveles de homocisteína fueron normales.

Tanto las mutaciones R228X y 679ins8 en el exón 3, como la R616C en el exón 11 no se encuentran reportadas en la base de datos del GenBank, lo que implica que se trata de 3 nuevas mutaciones, aunque habría que confirmar su efecto sobre la actividad de la MCM.

En el laboratorio de la Dra. Maria Elena Flores, tutora de esta tesis, se ha montado el ensayo de la actividad enzimática en extractos libres de células del microorganismo *Saccharopolyspora erythraea*, midiendo la aparición de succinil-CoA a través de HPLC (Bermúdez *et. al.*, 1998), sin embargo no se ha podido medir la actividad de mutasa en los pacientes por la dificultad de la toma de la biopsia. Se ha reportado que se puede medir la actividad de algunas enzimas en cultivos de linfocitos (Kikuchi *et. al.*, 1989), lo que podría ser una alternativa para poder confirmar el fenotipo de estas mutaciones.

En otros países, en donde se han realizado estudios acerca de las mutaciones presentes en el gen de la MCM, como era de esperarse, se han encontrado algunas nuevas así como otras ya reportadas. Hay que mencionar que la mutación G717V se ha encontrado en 5 pacientes de la población negra (Adjalla *et. al.*, 1998b; Crane *et. al.*, 1992a).

En un trabajo realizado en Francia, encontraron también mutaciones nuevas correspondientes a un solo paciente. Tal es el caso de las mutaciones D156N y K621N (Benoist *et. al.*, 2001). Por otro lado, en una sola paciente tailandesa, se encontraron dos nuevas mutaciones de manera heterocigota y el polimorfismo A499T el cual está presente en el 8% de los alelos de 100 individuos controles de la población tailandesa (Champattanachai *et. al.*, 2003).

Por último, consideramos que de acuerdo a los datos obtenidos en esta tesis se podría implementar en un futuro el diagnóstico de portadores heterocigotos de mutaciones que puedan causar AMM ó hacer el diagnóstico *in utero* en las familias con antecedentes de la enfermedad. Además hay que mencionar que no existe ningún otro trabajo de este tipo acerca de esta enfermedad ni de ningún otro error innato del metabolismo en México, por lo que sería importante darle un mayor impulso a los estudios moleculares y bioquímicos para relacionarlos con los datos clínicos, así como para hacer un diagnóstico rápido que permita dar el tratamiento adecuado lo más pronto posible y evitar las consecuencias de la enfermedad.

CONCLUSIONES

- 1) Se encontraron 3 nuevas mutaciones, la R228X, la 679ins8 y la R616C en pacientes mexicanos con acidemia metilmalónica.
- 2) El cambio V671I se presentó con una frecuencia del 50% en los pacientes estudiados.
- 3) La secuencia de los exones 3, 5, 6, 11 y 12 del gen de la MCM en personas mexicanas normales es idéntica a la reportada en el GenBank, al analizar un total de 16 alelos.

PERSPECTIVAS

*Continuar con la secuenciación del gen de la MCM en sujetos normales y los pacientes con AMM.

*Clonar el gen de la MCM de humano y expresarlo en *E. coli* para determinar la actividad.

*Confirmar que las mutaciones R228X, 679ins8 y R616C son las causantes de la AMM en los pacientes.

*Establecer que la mutación V671I es un polimorfismo.

*Analizar un mayor número de alelos de la población de San Luis Potosí donde radica la familia de los pacientes 4 y 5.

BIBLIOGRAFÍA

- Acquaviva C, Benoist JF, Callebaut I, Guffon N, Ogier de Baulny H, Touati G, Aydin A, Porquet D and Elion J. **2001**. N219Y, a new frequent mutation among *mut* (degree) forms of methylmalonic academia in Caucasian patients. *Eur. J. Hum. Genet.* 9: 577-582.
- Adjalla C, Hosack A, Gilfix B, Lamothe E, Sun S, Chan A, Evans S, Matiaszuk N and Rosenblatt D. **1998(a)**. Seven novel mutations in *mut* methylmalonic aciduria. *Hum. Mut.* 11: 270-274.
- Adjalla C, Hosack A, Matiaszuk N and Rosenblatt D. **1998(b)**. A common mutation among blacks with *mut* methylmalonic aciduria. *Hum. Mut. Supplement* 1:S248-S250.
- Altschul SF, Madden TL, Schäfler AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. **1997**. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acid. Res.* 25: 3389-3402.
- Barker HA, Smith RD, Wawszkiewicz EJ, Lee MN, Wilson R. **1958**. Enzymatic preparation and characterization of an α -L- β -methylaspartic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 78: 468.
- Benoist JF, Acquaviva C, Callebaut I, Guffon N, Ogier de Baulny H, Mornon JP, Porquet D and Elion J. **2001**. Molecular and structural analysis of two novel mutations in a patient with *mut* methylmalonyl-CoA deficiency. *Molec. Genet. Metabol.* 72: 181-184.
- Berger I, Shaag A, Anikster Y, Baumgartner ER, Bar-Meir M, Joseph A and Elpeleg O. **2001**. Mutation analysis of the MCM gene in Israeli patients with *mut⁰* disease. *Molec. Genet. Metabol.* 73: 107-110.
- Bermúdez O, Padilla P, Huitrón C and Flores ME. **1998**. Influence of carbon and nitrogen source on synthesis of NADP⁺-isocitrate dehydrogenase, methylmalonyl-coenzyme A mutase, and methylmalonyl-coenzyme A decarboxylase in *Saccharopolyspora erythraea* CA340. *FEMS Microbiol. Lett.* 164: 77-82.
- Birch A, Leiser A and Robinson JA. **1993**. Cloning, sequencing and expression of the gene encoding methylmalonyl-CoA mutase from *Streptomyces cinnamomensis*. *J. Bacteriol.* 175: 3511-3519.
- Brown TA. **1999**. *Genomes*. Edit. A John Wiley and Sons, Inc; publication. 472 pp. U.S.A.

-Champattanachai V, Ketudat Cairns JR, Shotelersuk V, Keeratichamroen S, Sawangareetrakul P, Srisomsap C, Kaewpaluek V and Svasti J. **2003**. Novel mutations in a Thai patient with methylmalonic acidemia. *Molec. Genet. Metabol.* 79: 300-302.

-Chang C, Hsiao K, Lee Y and Lin C. **1999**. Towards metabolic sink therapy for *mut* methylmalonyl acidaemia: Correction of methylmalonyl-CoA mutase deficiency in T lymphocytes from a *mut* methylmalonic acidemia child by retroviral-mediated gene transfer. *J. Inher. Metab.* 22: 773-787.

-Crane A, Martin L, Valle D and Ledley F. **1992(a)**. Phenotype of disease in three patients with identical mutations in methylmalonyl CoA mutase. *Hum. Genet.* 89: 259-264.

-Crane A, Jansen R, Andrews E and Ledley F. **1992(b)**. Cloning and expression of a mutant methylmalonyl coenzyme A mutase with altered cobalamin affinity that causes *mut* methylmalonic aciduria. *J. Clin. Invest.* 89: 385-391.

-Crane A and Ledley F. **1994**. Clustering of mutations in methylmalonyl-CoA mutase associated with *mut* methylmalonic acidemia. *Am. J. Hum. Genet.* 55: 42-50.

-Drennan CL, Matthews RG and Ludwig ML. **1994**. Cobalamin dependent methionine synthase: the structure of a methylcobalamin fragment and implications for the other B₁₂ dependent enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4: 919-929.

-Fenton WA, Hack AM, Kraus JP and Rosenberg LE. **1987**. Immunochemical studies of fibroblasts from patients with methylmalonyl-CoA mutase apoenzyme deficiency: Detection of a mutation interfering with mitochondrial import. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 1421-1424.

-Fenton WA, Gravel RA and Rosenblatt DS. **2001**. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th edn. New York; McGraw Hill, 2165-2194.

-Flavin M, Ortiz PJ and Ochoa S. **1955**. Metabolism of propionic acid in animal tissues. *Nature*. 176: 823.

-Fuchshuber A, Mucha B, Baumgartner ER, Vollmer M and Hildebrandt F. **2000**. *Mut⁰* Methylmalonic acidemia: eleven novel mutations of the methylmalonyl-CoA mutase including a deletion-insertion mutation. *Hum. Genet. Mutat.* 16: 179-185.

-Hollowell JGJ, Hall WK, Coryell ME, McPherson JJ, Hahn DA. **1969**. Homocystinuria and organic aciduria in a patient with vitamin-B₁₂ deficiency. *Lancet*. 2: 1428.

-Janata J, Kogekar N y Fenton W. **1997**. Expression and kinetic characterization of methylmalonyl-CoA mutase from patients with the *mut* phenotype: evidence for naturally occurring interallelic complementation. *Hum. Molec. Genet.* 6: 1457-1464.

-Jansen R, Kalousek F, Fenton W, Rosenberg L and Ledley F. **1989**. Cloning of full-length methylmalonyl-CoA mutase from a cDNA library using the Polymerase Chain Reaction. *Genom.* 4:198-205.

-Jansen R and Ledley F. **1990**. Heterozygous mutations at the *mut* locus in fibroblasts with *mut*⁰ methylmalonic acidemia identified by polymerase-chain reaction cDNA cloning. *Am. J. Hum. Genet.* 47: 808-814.

-Katz J and Chaikoff IL. **1955**. The metabolism of propionate by rat liver slices and the formation of isosuccinic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 77: 2659.

-Kikuchi M, Hanamizu H, Narisawa K and Tada K. **1989**. Assay of methylmalonyl CoA mutase with high-performance liquid chromatography. *Clin. Chim. Act.* 184: 307-314.

-Kolhouse JF, Stabler SP, Allen RH. **1988**. L-Methylmalonyl-CoA mutase from human placenta. *Method. Enzymol.* 166: 407-414.

-Ledley F, Levy H, Shih V, Benjamin R and Mahoney M. **1984**. Benign methylmalonic aciduria. *N. Engl. J.* 311: 1015-1018.

-Ledley F, Lumetta M, Nguyen P, Kolhouse J and Allen R. **1988**. Molecular cloning of L-methylmalonyl-CoA mutase: Gene transfer and analysis of *mut* cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 3518-3521.

-Ledley F, Jansen R, Nham S, Fenton W and Rosenberg L. **1990**. Mutation eliminating mitochondrial leader sequence of methylmalonyl-CoA mutase causes *mut*⁰ methylmalonic acidemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 3147-3150.

-Ledley F and Rosenblatt D. **1997**. Mutations in *mut* Methylmalonic Acidemia : Clinical and Enzymatic Correlations. *Hum. Mut.* 9: 1-6.

-Lehninger A, Nelson D, Cox M. **1993**. *Principios de Bioquímica*. Segunda edición. OMEGA. Barcelona, España. 1013 pp.

-Lin Z and Floros J. **2000**. Protocol for genomic DNA preparation from fresh or frozen serum for PCR amplification. *BioTechn.* 29: 460-466.

-Ludwing ML, Drennan CL and Matthews RG. **1996**. The reactivity of B₁₂-cofactors: the proteins make a difference. *Struct.* 4: 505-512.

-Luz A. **2002**. Clonación y secuencia parcial de los genes que codifican para la metilmalonil-CoA mutasa de *Saccharopolyspora erythraea* CA340. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

-Luz-Madrigal A, Petrossyan P, Sánchez-dela Paz A and Flores ME. **2004**. Cloning, sequence analysis and organization of *mutA* and *mutB* genes encoding methylmalonyl-coenzyme A mutase from *Saccharopolyspora erythraea* CA340. En preparación.

-Mancia F, Keep NH, Nakagawa A, Leadlay P, McSweeney S, Rasmussen B, Bösecke P, Diat O and Evans PR. **1996**. How coenzyme B₁₂ radicals are generated: the crystal structure of methylmalonyl-coenzyme A mutase at 2 Å resolution. *Struc.* 4: 339-350.

-Mancia F, Smith GA, Evans PR. **1999**. Crystal Structure of Substrate Complexes of Methylmalonyl-CoA Mutase. *Biochem.* 38: 7999-8005.

-Matsui S, Mahoney M and Rosenberg L. **1983**. The natural history of the inherited methylmalonic acidemias. *N. Engl. J. Med.* 308: 857-861.

-Mikami H, Ogasawara M, Matsubara Y, Kikuchi M, Miyabayashi S, Kure S and Narisawa K. **1999**. Molecular analysis of methylmalonyl-CoA mutase deficiency: identification of three missense mutations in *mut⁰* patients. *J. Hum. Genet.* 44: 35-39.

-Minot GR and Murphy LP. (1926) **1983**. Treatment of pernicious anemia by a special diet. *JAMA.* 250: 3328-3335.

-Nham S, Wilkemeyer M, Ledley F. **1990**. Structure of the human methylmalonyl CoA mutase (MUT) locus. *Genom.* 8: 710-716.

-Neil E and Marsh G. **1997**. Coenzyme B₁₂ (cobalamin)-dependent enzymes. *Essays Biochem.* 34: 1-16.

-Neil E and Marsh G. **2000**. Coenzyme B₁₂ dependent glutamate mutase. *Bioorganic. Chem.* 28: 176-189.

-Oberholzer VC, Levin B, Burgess EA and Young WF. **1967**. Methylmalonic aciduria: An inborn error of metabolism leading to chronic metabolic acidosis. *Arch. Dis. Child.* 42: 492.

-Ogasawara M, Matsubara Y, Mikami H and Narisawa K. **1994**. Identification of two novel mutations in the methylmalonyl-CoA mutase gene with decreased

levels of mutant mRNA in methylmalonic acidemia. *Hum. Mol. Genet.* 3: 867-872.

-Ogier H, Charpentier C, Saudubray M. **1990**. *Organic acidemias*. In: Fernandes J, Saudubray M, Tada K eds. *Inborn metabolic diseases: diagnosis and treatment*. Berlin: Springer: 276-278.

-Peters H, Nefedov M, Lee LW, Abdenur J, Chamoles N, Kahler S and Ioannou PA. **2002**. Molecular studies in mutase-deficient (MUT) methylmalonic aciduria: identification of five novel mutations. *Hum. mut.* 545: 1-5.

-Qureshi A, Crane AM, Matiaszuk NV, Rezvani I, Ledley FD and Rosenblatt D. **1994**. Cloning and expression of mutations demonstrating intragenic complementation in *mut*⁰ methylmalonic aciduria. *J. Clin. Invest.* 93: 1812-1819.

-Raff M, Crane AM, Jansen R, Ledley F and Rosenblatt D. **1991**. Genetic characterization of a MUT locus mutation discriminating heterogeneity in *mut*⁰ and *mut* methylmalonic aciduria by interallelic complementation. *J. Clin. Invest.* 87: 203-207.

-Rosenblatt D and Fenton W. **1999**. *Inborn errors of cobalamin metabolism*. In Banerjee R (ed): *Chemistry and Biology of B₁₂*. New York, John Wiley, 367pp.

-Rosenblatt D and Fenton W. **2001**. *Inherited disorders of folate and cobalamin transport and metabolism*. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. eds. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. 8th edn. New York; Mc Graw Hill, 3897-3923.

-Roy IY and Leadley PF. **1992**. Physical Map localization of the new *Escherichia coli* gene *sbm*. *J. Bacteriol.* 174: 5763-5764.

-Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. **1989**. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor. Laboratory Press. NY.

-Sawada T and Ledley F. **1992**. Correction of methylmalonyl-CoA mutase deficiency in *Mut*⁰ fibroblasts and constitution of gene expression in primary human hepatocytes by retroviral-mediated gene transfer. *Somat. Cell Molec. Genet.* 18: 507-516.

-Scriver C and Kaufman. **2001**. Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th edn. New York; Mc Graw Hill, 1667-1724.

-Sennett C, Rosenberg LE and Mellman IS. **1981**. Transmembrane transport of cobalamin in prokaryotic and eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* 50: 1053.

-Stokke O, Eldjarn L, Norum KR, Steen-Johnsen J and Halvorsen S. **1967**. Methylmalonic aciduria: A new inborn error of metabolism which may cause fatal acidosis in the neonatal period. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 20: 313.

-Stryer L. *Bioquímica*. Tercera edición. **1990**. Reverté. Barcelona, España.

-Touraine R, Rolland M, Divry P, Mathieu M, Guibaud P and Bozon D. **1995**. A 13-bp deletion (1952 del 13) in the methylmalonyl-CoA mutase gene of an affected patient. *Hum. Mut.* 5: 354-356.

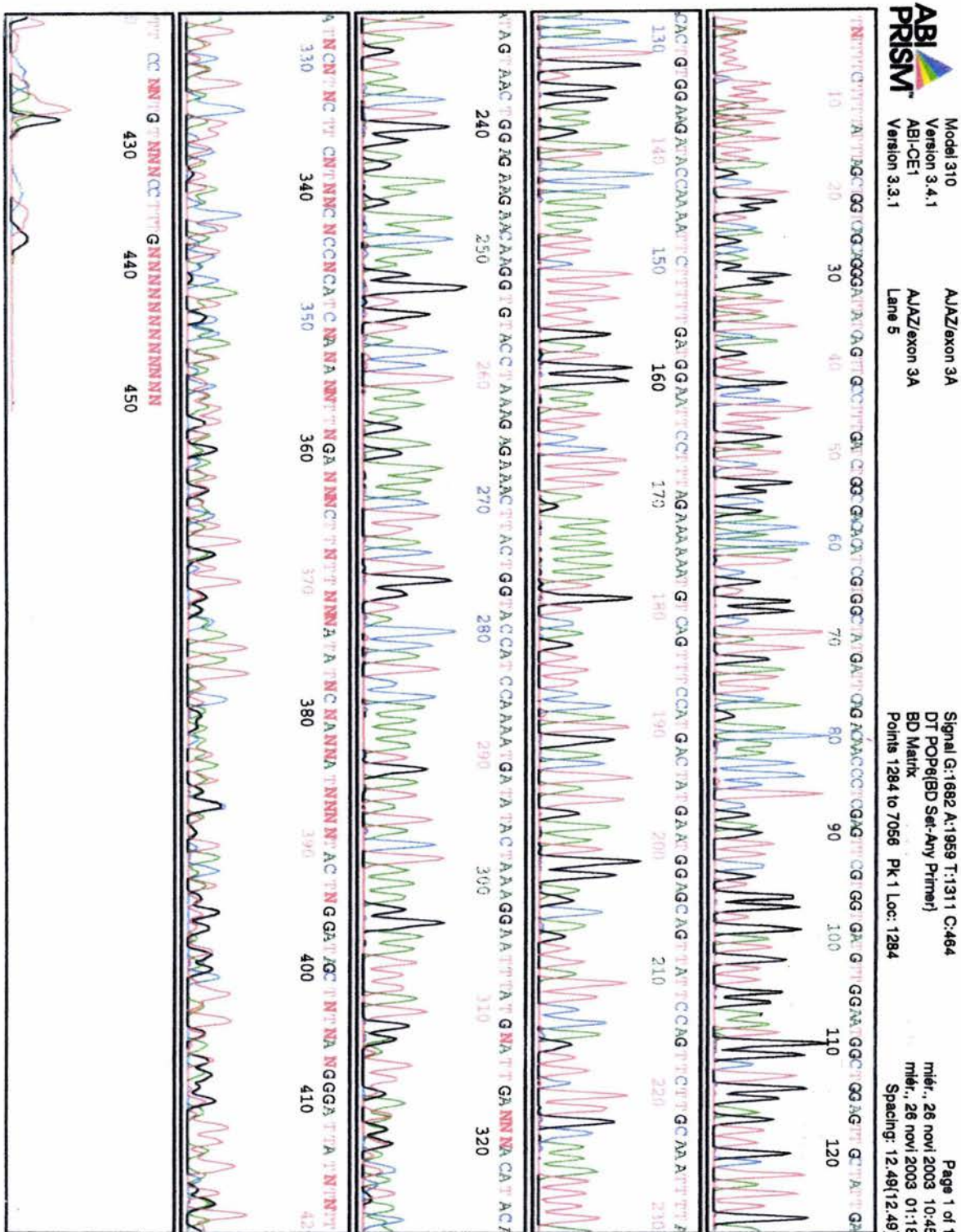
-Vela M, Jiménez G, Cicerón I y Velázquez A. **1998**. Guía para el diagnóstico de los errores innatos del metabolismo. PAC P-1. Parte D, Libro 4. Academia Mexicana de Pediatría, A.C. 67 pags.

-Vela M. **2002**. Errores innatos del metabolismo: Experiencia en México. XXVII Congreso de la Asociación Mexicana de Genética Humana. Veracruz, Veracruz, México.

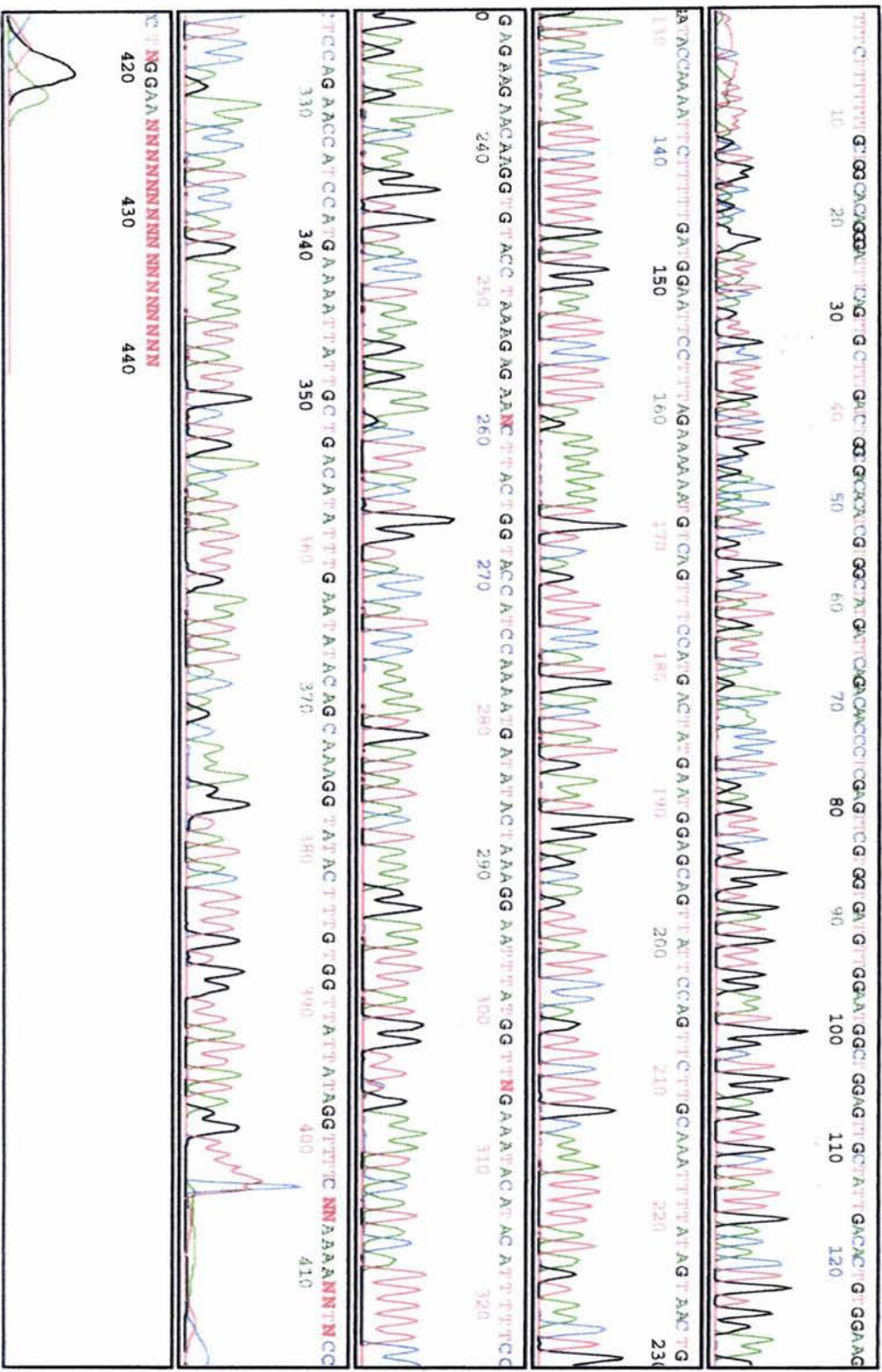
-Vela-Amieva M, Ibarra-González I, Olivares-Sandoval Z, Méndez-Cruz ST, Arnold-Almaraz K, Pérez-Andrade M, Ortiz-Cortés J, Rivera-Quintero J, Morales-González R, Gamboa-Cardiel S y Velázquez-Arellano A. **2003**. Características clínicas y bioquímicas de pacientes mexicanos con acidemia metilmalónica. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 60: 380-388.

-Wilkemeyer M, Crane AM and Ledley F. **1990**. Primary structure and activity of mouse methylmalonyl-CoA mutase. *Biochem. J.* 271: 449-455.

APÉNDICE



Secuencia completa del exón 3 sentido del paciente 3 (AJAZ).



Secuencia completa del exón 3 sentido del padre del paciente 3.



Secuencia completa del exón 3 antisense del paciente 3 (AJAZ).

