

Análisis de mutaciones en el gen de la metilmalonilCoA mutasa en diez pacientes mexicanos con acidemia metilmalónica aislada

Sara Teresa Méndez,* Marcela Vela-Amieva,**
Antonio Velázquez-Arellano,* Isabel Ibarra,** María Elena Flores*

* Departamento de Biología Molecular y Biotecnología,

** Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas,
Universidad Nacional Autónoma de México.

*** Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto Nacional de Pediatría.

Mutation analysis of the methylmalonyl-CoA mutase gene in ten Mexican patients with methylmalonic acidemia

ABSTRACT

Introduction. Methylmalonic acidemia (MMA) is a genetically determined human metabolic disease, characterized by deficient activity of the mitochondrial enzyme, methylmalonyl CoA mutase (MCM). This enzyme catalyzes the isomerization of L-methylmalonyl CoA to succinyl CoA and requires adenosylcobalamin as cofactor. Several mutations have been identified in the unique genetic locus encoding the MCM apoenzyme (*mut*) which causes MMA. **Aim.** To identify the mutations present in Mexican patients diagnosed with MMA. **Results.** Complete nucleotide sequencing of *mut* gene exons of 10 Mexican patients with methylmalonic acidemia (MMA) identified one novel mutation and eight mutations previously reported in the methylmalonyl-CoA mutase (*mut*) gene. The new mutation c.406G>T (p.V136F) was found in one patient combined with the deletion c.1891delG (p.A631QfsX17). The missense mutation c.322C>T (p.R108C) was found in six non-related patients; in addition, the mutations c.ins671-678dupAATTTATG (p.V227NfsX16), c.682C>T (p.R228X), c.1022-1023dupA (p.N341KfsX20), c.1846C>T (p.R616C), c.2080C>T (p.R694W), and c.385+3insTAAGGGT (*splice*) were found. This work reveals that Mexican patients with MMA have new (p.V136F) as well as worldwide and hispanic reported mutations. The mutation R108C is the most frequent change (40% of total alleles) mainly in patients from León, Guanajuato.

Key words. Methylmalonic acidemia. Methylmalonyl-CoA mutase. Mutation analysis. Organic aciduria. Inborn errors of metabolism.

RESUMEN

Introducción. La acidemia metilmalónica aislada (AMM) es una enfermedad metabólica determinada genéticamente y caracterizada por la actividad deficiente o nula de la enzima mitocondrial, metilmalonilCoA mutasa (MCM). Esta enzima cataliza la isomerización de L-metilmalonilCoA a succinilCoA y requiere adenosilcobalamina como cofactor. Una gran cantidad de mutaciones se han identificado en el locus genético único (*mut*) que codifica para la apoenzima MCM, las cuales causan AMM. **Objetivo.** Identificar las mutaciones en pacientes mexicanos diagnosticados con AMM aislada. **Resultados.** La secuenciación completa de los exones del gen *mut* de diez pacientes mexicanos permitió la identificación de ocho mutaciones previamente reportadas y una nueva. La mutación nueva c.406G>T (p.V136F) se encontró en un paciente combinada con la delección c.1891delG (p.a631QfsX17). La mutación missense c.322C>T (p.R108C) se localizó en seis pacientes no relacionados; además también se encontraron las mutaciones c.ins671-678dupAATTTATG (p.V227NfsX16), c.682C>T (p.R228X), c.1022-1023dupA (p.N341KfsX20), c.1846C>T (p.R616C), c.2080C>T (p.R694W) y c.385+3insTAAGGGT (*splice*). En el alelo de un paciente no se identificó la mutación presente. Este trabajo revela que los pacientes mexicanos presentan mutaciones prevalentes en todas las poblaciones y una proveniente de la población hispana, así como una mutación nueva. La mutación más frecuentemente encontrada fue la c.322C>T (R108C) en 8/20 (40%) alelos, principalmente en pacientes nacidos en León, Guanajuato.

Palabras claves. Acidemia metilmalónica aislada. Aciduria metilmalónica. MetilmalonilCoA mutasa. Errores innatos del metabolismo. Acidemias orgánicas.

INTRODUCCIÓN

La acidemia o aciduria metilmalónica aislada (AMM; MIM ID #251000) es una enfermedad autosómica recesiva debida a un trastorno en el metabolismo del metilmalonato y de la cobalamina (cbl, vitamina B₁₂). La AMM es causada por mutaciones en el gen *mut* que provocan una deficiencia parcial (*mut*) o total (*mut*⁰) de la enzima mitocondrial metilmalonil-CoA mutasa (MCM; EC 5.4.99.2), cuya función es catalizar la isomerización de metilmalonil-CoA a succinil-CoA. La actividad de dicha enzima requiere adenosilcobalamina como coenzima.¹ La incidencia aproximada de la AMM es de uno en 30,000-50,000 recién nacidos vivos a nivel mundial;¹⁻³ sin embargo, la tasa real puede ser mayor debido a que algunos niños mueren antes de que la enfermedad se sospeche. El espectro clínico de la AMM es amplio y comprende desde formas benignas en niños y adultos,^{4,5} hasta formas neonatales catastróficas.⁶ Dentro de los datos clínicos destacan letargo, falla para medrar, vómito recurrente, deshidratación, dificultad respiratoria e hipotonía; también puede existir hepatomegalia, retraso global del desarrollo, retraso mental, autismo, cuadriparesia espástica, distonía y coma.^{3,6}

Dentro de las características bioquímicas de la AMM destacan la presencia de acidosis metabólica de brecha aniónica elevada, con altas concentraciones de ácido metilmalónico en suero y orina, niveles normales de vitamina B₁₂ en suero, cetonuria, hiperamonemia e hiperglicinemia, así como leucopenia, trombocitopenia e incluso pancitopenia.^{1,3}

El espectro mutacional de la AMM se ha estudiado ampliamente a través de la secuenciación del gen *mut* (tiene 13 exones), se localiza en el cromosoma 6p21 y hasta el momento se han reportado más de 200 mutaciones, principalmente en los exones 2-13.⁷⁻¹¹

Diferentes grupos étnicos presentan ciertas mutaciones con mayor frecuencia; por ejemplo, la mutación E117X es frecuente en la población japonesa¹² o la N219Y localizada en pacientes caucásicos descendientes de franceses y turcos.¹³ La población mexicana es étnicamente heterogénea, en su formación contribuyeron grupos humanos de todos los continentes, por lo que es importante conocer cuáles de las mutaciones descritas están presentes en México y si alguna no se ha reportado. Éste es el objeto y la justificación de este artículo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

Este estudio incluyó a diez pacientes afectados con AMM aislada provenientes de nueve familias

(dos hermanos) diagnosticados en el Instituto Nacional de Pediatría de la Ciudad de México mediante perfil urinario de ácidos orgánicos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Las muestras de sangre para la extracción de ADN se obtuvieron después de que los padres de los pacientes firmaron el consentimiento informado; el proyecto se aprobó por los Comités de Bioética del Instituto Nacional de Pediatría y del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Todos los pacientes recibieron asesoramiento genético profesional.

Análisis de mutaciones

Los exones 2-13 y las regiones intrónicas adyacentes del gene *mut* se amplificaron del DNA genómico obtenido de muestras de sangre periférica de los pacientes, familiares y 100 controles usando el Mini Kit Perfect gDNA Blood (Eppendorf). La mezcla de reacción para el PCR consistió de 100 ng de ADN, 0.5 μ M de cada iniciador (sentido y antisentido) (Cuadro 1), 200 μ M de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 2.5 U de Taq polimerasa y buffer 1X (Invitrogen) en un volumen total de 50 μ L. Después de 5 min de incubación a 94 °C se llevaron a cabo 30 ciclos de 60 s a 94 °C (desnaturalización), 60 s a diferentes temperaturas de alineamiento (ver el cuadro 1 para consultar la temperatura empleada para cada exón) y 1 min a 72 °C (extensión). Los iniciadores se diseñaron con el programa DNAMAN versión 3.0 tomando como base la secuencia No. NM_000255 reportada en el GenBank. La amplificación fue confirmada por electroforesis de 10 μ L del producto en geles de agarosa a 1.5% en buffer TAE. Los amplicones se purificaron del gel por medio del kit QIAquick (Qiagen) y secuenciados directamente al usar los iniciadores utilizados para la amplificación. La secuencia se realizó con el sistema BigDye terminator v.3.1 (Applied Biosystems) y analizados con un Secuenciador de ADN ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems). La numeración del ADNc inició en el nucleótido A del codón de inicio ATG.

Formación de heterodúplex

El exón 3 de cada una de las muestras del paciente y familiares o controles se amplificó por PCR. Los amplicones se purificaron del gel en un volumen total de 20 μ L y se sometieron a 95 °C por 5 min y a 68 °C por 30 min para someterlas después a electroforesis en un gel de poli(acrilamida) a 12% en buffer TTE (44.5 mM Tris, 7.5 mM Taurina, 0.25 mM EDTA, pH 9).¹⁴

Cuadro 1. Oligonucleótidos para PCR y análisis de secuencia de los exones y regiones vecinas del gen *mut*.

Oligonucleótidos	Secuencia	Temperatura de alineamiento	Producto de PCR (pb)	Referencia
Exón 1-delantero Exón 1-reverso	5'-CGCCCATGAGAGCGCTATT-3' 5'-AAAGGACAGAGCGGAGAGAA-3'	63 °C	317	Méndez, <i>et al.</i> (2012)
Exón 2- delantero Exón 2-reverso	5'- TAGTAGCTCCTATTCCACCC-3' 5'-TCTCACCTTAATGTTGCTCCT-3'	58 °C	485	Méndez, <i>et al.</i> (2012)
Exón 3-delantero Exón3-reverso	5'-CCAGACTCTTGAATCTTACAT-3' 5'-CAAGGAACTATAGAAAA C-3'	54 °C	449	Méndez, <i>et al.</i> (2012)
Exón 4- delantero Exon 4-reverso	5'- TGGATTTAATAGGACCTT-3' 5'- AAATCTAAATCTAGCCTGA-3'	57 °C	332	Méndez, <i>et al.</i> (2012)
Exón 5- delantero Exón 5-reverso	5'-AATTAATTCTGGACCTA-3' 5'-ACTTTATTAATCTACAT-3'	50 °C	246	Adjalla, <i>et al.</i> ¹⁸
Exón 6- delantero Exón 6-reverso	5'-CATATCTATCACCGTTCTTGA-3' 5'-CTATAAATCTGAAAACAAAGTT-3'	56 °C	337	Adjalla, <i>et al.</i> ¹⁸
Exón 7- delantero Exón 7-reverso	5'- TTAATTCTGTTCTTATGAAAC-3' 5'- ACTATACATGTTATCTTCAAAC-3'	63 °C	332	Méndez, <i>et al.</i> (2012)
Exón 8- delantero Exón 8-reverso	5'- CCAGAGCATTACAATTAGGT-3' 5'- TTAATACACCTCATGCTG-3'	58 °C	300	Méndez, <i>et al.</i> (2012)
Exón 9- delantero Exón 9-reverso	5'- AAATTGTCCTTTCTTGACTT -3' 5'- GCTCACATGGTTTACAGGATCA -3'	55 °C	244	Méndez, <i>et al.</i> (2012)
Exón 10- delantero Exón 10-reverso	5'- TGAAGTTAATGGAACCACCA -3' 5'- GGAAATTAAGCTCCCAGTAGA-3'	64 °C	246	Méndez, <i>et al.</i> (2012)
Exón 11- delantero Exón 11-reverso	5'-ACTTGAAGATTTGCTGTG-3' 5'-TGTCTGTCATCTTTACTAC-3'	60 °C	321	Adjalla, <i>et al.</i> ¹⁸
Exón 12- delantero Exón 12-reverso	5'-CAGGGTTTTAGTCATTA-3' 5'-CAAGATTCCCATCACAGT-3'	64 °C	276	Adjalla, <i>et al.</i> ¹⁸
Exón 13- delantero Exón 13-reverso	5'- TGACAAGAGAAGATAGGGTT-3' 5'- CAAGGAAAGTACAAATCAGG-3'	63 °C	283	Méndez, <i>et al.</i> (2012)

RESULTADOS

En este trabajo se investigaron las mutaciones presentes en nueve familias con pacientes diagnosticados con acidemia metilmalónica, a través de la secuenciación de la región codificante completa y las regiones vecinas de los exones-intrones del gen *mut* usando ADN genómico como templado, tanto de los pacientes como de los padres. Todos los niños presentaron altos niveles de ácido metilmalónico en orina y los síntomas asociados a AMM. Las características clínicas observadas en este grupo de pacien-

tes fueron similares a las descritas en la literatura: iniciaron con síntomas gastrointestinales tales como vómito y rechazo al alimento, seguidos por manifestaciones neurológicas entre las que destacaron irritabilidad, alteraciones del tono muscular y letargo. Dos de los pacientes presentaron de manera inicial crisis convulsivas. Por otro lado, en los tres pacientes clasificados con fenotipo infantil el cuadro clínico inició entre los cuatro y ocho meses de vida y las manifestaciones clínicas se relacionaron con el inicio de la ablactación. En la mayoría de los casos las manifestaciones bioquímicas de la enfermedad fueron

Cuadro 2. Características, clasificación fenotípica, evolución y descripción de las mutaciones encontradas en los pacientes con acidemia metilmalónica aislada.

Caso/sexo	Alelo 1 madre (efecto)	Alelo 2 padre (efecto)	Edad de inicio de los síntomas	Características o diagnóstico inicial	Fenotipo clínico/evolución
1/M	c.322C>T (p.R108C)	c.322C>T (p.R108C)	Ocho días	Acidosis metabólica de difícil estabilización.	Neonatal/fallecido
2/F	c.322C>T (p.R108C)	c.322C>T (p.R108C)	Tres días	Sepsis neonatal temprana.	Neonatal/viva RGD
3/M	c.671-678dup AATTTATG (p.V227NfsX16)	c.682C>T (p.R228X)	15 días	Sepsis neonatal.	Neonatal/fallecido
4/M	c.322C>T (p.R108C)	c.385+3insTAAGGGT (splice)	Nueve meses asintomático con tratamiento	Diagnóstico por tamiz prenatal por antecedente de dos hermanos fallecidos, recibió tratamiento neonatal, asintomático hasta los nueve meses que presentó cuadro de vómito, deshidratación, hiperamonemia y acidosis metabólica de brecha aniónica elevada.	Neonatal/vivo RGD, insuficiencia renal crónica. Pancitopenia.
5/F	c.1022-1023dupA (p.N314KfsX20)	c.322C>T (p.R108C)	20 días	Neumonías de repetición, sepsis, cuadros repetidos de acidosis metabólica de brecha aniónica elevada, anorexia, vómito.	Neonatal/viva RGD, insuficiencia renal crónica. Bicitopenia.
6/F	c.322C>T (p.R108C)	Mutación no identificada	Cuatro meses	Cuadros repetidos de acidosis metabólica de difícil estabilización, hiperamonemia, vómito, letargia.	Infantil/fallecida
7* /M	c.1846C>T (p.R616C)	c.1846C>T (p.R616C)	25 días	Cuadros repetidos de acidosis metabólica de difícil estabilización.	Neonatal/fallecido
8*/F	c.1846C>T (p.R616C)	c.1846C>T (p.R616C)	Siete meses asintomática con tratamiento	Diagnosticada mediante tamiz neonatal por antecedente de hermano afectado. Asintomática hasta los seis meses.	Neonatal/fallecida
9/F	c.2080C>T (p.R694W)	c.322C>T (p.R108C)	Ocho meses	Deshidratación, vómito, crisis de acidosis metabólica de brecha aniónica elevada.	Infantil/viva Desarrollo psicomotor normal.
10/M	c.406G>T** (p.V136F)	c.1891delG (p.A631QfsX17)	Cuatro meses	Acidosis metabólica de difícil estabilización.	Infantil/vivo RGD, proteinuria.

*Pacientes de la misma familia. **Mutación nueva. RGD: retraso global de desarrollo. F = Femenina. M = Masculino.

episodios agudos de acidosis metabólica, de brecha aniónica elevada, además de difícil estabilización y recurrente, en la mitad de los pacientes se acompañó de hiperamonemia.

La evolución clínica de los pacientes se caracterizó por una mortalidad de 5/10 pacientes. Por lo general, los fallecimientos ocurrieron durante alguno de los episodios de acidosis de repetición. En el seguimiento de estos pacientes (cinco años) se documentó retraso global del desarrollo en 4/10; tres pacientes presentaron insuficiencia renal, que en dos casos derivó en fallecimiento (pacientes hermanos 7 y 8) y una sobreviviente (caso 5), a la fecha tenía insuficiencia renal crónica terminal. El paciente 4 cursaba con una pancitopenia severa, misma que se relacionó con cuadros repetidos de infecciones oportunistas. Llama la atención que de esta cohorte analizada únicamente la paciente 9 (mutación heterocigota c.2086CT/c.322C>T), 11 años de edad a la fecha, tenía un desarrollo psicomotor normal.

El espectro mutacional encontrado incluyó nueve variaciones en las secuencias del gene *mut*, una de ellas no descrita en la literatura c.406G>T (p.V136F) y ocho correspondientes a mutaciones ya reportadas.^{7,11,15,16} Cuatro de ellas son missense (c.322C>T, c.1846C>T, c.2080C>T, c.406G>T), una nonsense (682C>T), dos duplicaciones (c.671-678dupAATTTATG, c.1022-1023dupA); una delección (1891delG) y una inserción (c.385+3TAAGGGT) como se muestra en el cuadro 2 donde también se incluyeron las características, evolución y clasificación fenotípica de los pacientes estudiados. De las nueve familias analizadas, cinco eran originarias de la Ciudad de México, tres de Guanajuato y una de San Luis Potosí. Se documentó consanguinidad únicamente en una de ellas. Tres de las familias tenían el antecedente de hijos previos fallecidos con un cuadro clínico similar, sin diagnóstico específico.

De los 20 alelos analizados, ocho (40%) presentaron la mutación c.322C>T (p.R108C) en el exón 2; dos pacientes no relacionados fueron homocigotos para dicha mutación. En segundo lugar de frecuencia se encontró la mutación c.1846C>T (4/20) y el resto de las mutaciones se encontró una vez cada una (Cuadro 2).

En el paciente 10 se encontraron dos cambios, la delección c.1891delG (p.A631QfsX17) en un alelo y en el otro la mutación c.406G>T (p.V136F), mutación no reportada hasta la fecha y que implica un cambio de valina por fenilalanina en el primer tercio de la secuencia de la proteína. Aunque no aparece en las bases de datos de SNPs, para descartar que esta modificación fuera un polimorfismo en el exón 3, 200

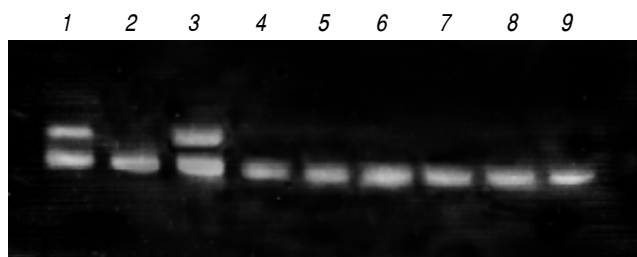


Figura 1. Migración diferencial de heterodúplex y homodúplex del exón 3 en geles de poliacrilamida a 12% para la identificación de la mutación G>T en muestras control. Carril 1, heterodúplex de la muestra del padre; carril 2, muestra de la madre; carril 3, muestra del paciente; carriles 4-9, homodúplex representativos de la población control.

alelos control se analizaron por formación de heterodúplex, la cual es una técnica diseñada para detectar pequeñas variaciones en las secuencias de ADN. Este método se basa en las propiedades físicas de la molécula debido a la formación de burbujas que se generan por bases que no encuentran su par homólogo, formando un heterodúplex (el cual migra más lento que un homodúplex en una electroforesis), mientras que las cadenas homólogas formarán un homodúplex, detectando así cadenas silvestres o mutantes. Con esta herramienta sólo se encontró el cambio en la muestra del paciente y en la del padre (Figura 1).

DISCUSIÓN

La acidemia metilmalónica es una enfermedad que generalmente se diagnostica en el primer año de vida con síntomas poco característicos, por lo que se tiene que confirmar la enfermedad con la cuantificación de ácido metilmalónico en orina. Es un trastorno autosómico recesivo con una incidencia aproximada de uno en cada 30,000 a 50,000 recién nacidos a nivel mundial, afecta por igual a niños y niñas.¹⁷

La acidemia metilmalónica se presenta cuando existen mutaciones en el gen que codifica para la metilmalonilCoA mutasa y se ha reportado que diferentes grupos étnicos presentan ciertas mutaciones con mayor frecuencia. Además de las mutaciones prevalentes en poblaciones francesa/turca y japonesa mencionadas en la introducción se ha reportado la mutación G717V presente con gran frecuencia en población afroamericana.^{18,19}

Los resultados de este trabajo en diez pacientes de nueve familias muestran la presencia de nueve cambios, de los cuales cuatro fueron mutaciones missense, dos duplicaciones, una inserción y una mutación nonsense. Una de estas mutaciones, c.406G>T

(p.V136F), se reportó por primera vez, sumándose a la gran cantidad de mutaciones publicadas. La sustitución de una valina muy conservada en el codón 136 del exón 3, por una fenilalanina en la cadena I β 2 dentro del barril (β/α)₈, que junto con S¹³⁵, A¹³⁷ y F¹³⁸, tiene un papel crucial en la interacción con el metilmalonil coenzima A.²⁰ Se concluyó que este cambio no ocurre de manera frecuente en la población mexicana, sino que el padre la adquirió de alguno de sus progenitores, a través del análisis de heterodúplex en 200 alelos control donde no se encontró la mutación. Ésta es una técnica muy usada para confirmar una mutación en un gran número de alelos; tal fue el caso del polimorfismo A499T encontrado en población tailandesa que se confirmó con una frecuencia alta a través de esta metodología.²¹

La mutación c.322C>T (p.R108C) se encontró en seis pacientes de forma homo o heterocigota, representa una frecuencia de 40% de los alelos. Estos resultados concuerdan con la recurrencia reportada por Worgan, *et al.*,¹¹ en líneas celulares de fibroblastos de pacientes de origen mexicano o español detectados en Canadá, aunque no se precisa si nacieron en México o son de ascendencia mexicana. Sólo dos de ellos fueron homocigotos para esta mutación y la AMM inició a los pocos días de nacidos; sin embargo, su evolución fue distinta, uno falleció mientras que la otra paciente sobrevivió, aunque con retraso global del desarrollo. Los otros pacientes fueron heterocigotos para la mutación, por lo que es difícil comparar su fenotipo clínico y evolución tanto entre ellos como con lo reportado en otros artículos, ya que la mayoría trabaja con líneas celulares y mencionan poco de los pacientes.

Es importante enfatizar que tres pacientes nacieron en León, Guanajuato, lo que sugiere una alta frecuencia de este cambio en la población de dicha ciudad, por lo que sería interesante un estudio en población abierta para conocer la frecuencia en la población de este estado.

Las otras mutaciones reportadas en este trabajo, presentes en niños con AMM, se encontraron en una sola familia, por lo que la frecuencia puede ser muy baja en nuestra población, aunque faltaría analizar un número mayor de pacientes para concluir acerca de su tasa en población mexicana.

Se ha reportado una gran cantidad de mutaciones nuevas asociadas a acidemia metilmalónica, más de 200 descripciones.²² Los exones 3, 6, 11 y 12 codifican para el dominio de unión a sustrato y de unión a cobalamina y son los que presentan un mayor número de mutaciones reportadas, mientras que los exones 7 y 9 son en los que hay menos mutaciones.

Por otro lado, la presencia de hotspots para eventos mutacionales podría explicar por qué el codón de arginina que contiene el dinucleótido CpG o los codones de glicina (GpG) son más susceptibles a presentar mutaciones, ya que entre ambos codones suman más de 30 cambios.²³

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a Tóshiko Takahashi por su apoyo técnico y a Patricia de la Torre por la secuenciación de ADN. Este trabajo fue parcialmente apoyado por la DGAPA-UNAM (PAPIIT 200403). CONACyT concedió una beca doctoral a Sara Teresa Méndez para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

1. Fenton WA, Gravel RA, Rosenblatt DS. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. In: Scriver C, Beaudet AL, Sly W, Valle D (eds.). *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases*. 8a. ed. New York: Mc Graw Hill; 2001, p. 2165-93.
2. Coulombe JT, Shih VE, Levy HL. Massachusetts Metabolic Disorders Screening Program. II. Methylmalonic aciduria. *Pediatrics* 1981; 67(1): 26-31.
3. Manoli I, Venditti CP. Methylmalonic Acidemia. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K (eds.). *Gene Reviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2005 Aug 16 [updated 2010 Sep 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301409>.
4. Ledley FD, Levy HL, Shih VE, Benjamin R, Mahoney MJ. Benign methylmalonic aciduria. *N Engl J Med* 1984; 311: 1015-8.
5. Giorgio AJ, Trowbridge M, Boone AW, Patten RS. Methylmalonic aciduria without vitamin B₁₂ deficiency in an adult sibship. *N Engl J Med* 1976; 295: 310-3.
6. Matsui SM, Mahoney MJ, Rosenberg LE. The natural history of the inherited methylmalonic acidemias. *N Engl J Med* 1993; 308: 857-61.
7. Pérez B, Angaroni C, Sánchez-Alcudia R, Merinero B, Pérez-Cerdá C, Specola N, Rodríguez-Pombo P, et al. The molecular landscape of propionic acidemia and methylmalonic aciduria in Latin America. *J Inherit Metab Dis* 2010; 33(Suppl. 2): S307-S314.
8. Janata J, Kogekar N, Fenton WA. Expression and kinetic characterization of methylmalonyl-CoA mutase from patients with the *mut* phenotype: evidence for naturally occurring interallelic complementation. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 1457-64.
9. Cavicchi C, Donati MA, Pasquini E, Poggi GM, Dionisi-Vici C, Parini R, et al. Mutational spectrum in ten Italian patients affected by methylmalonyl-CoA mutase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 2005; 28: 1175-8.
10. Peters HL, Nefedov M, Lee LW, Abdenur JE, Chamoles NA, Kahler SG, Ioannou PA. Molecular studies in mutase-deficient (*MUT*) methylmalonic aciduria: Identification of five novel mutations. *Hum Mutat* 2002; 20: 406-11.
11. Worgan LC, Niles K, Tirone JC, Hofmann A, Verner A, Sammak A, Kucic T, Lepage P, Rosenblatt DS. Spectrum of mutations in *mut* methylmalonic acidemia and identification of a common Hispanic mutation and haplotype. *Hum Mutat* 2006; 27: 31-43.

12. Mikami H, Ogasawara M, Matsubara Y, Kikuchi M, Miyabayashi S, Kure S, Narisawa K. Molecular analysis of methylmalonyl-CoA mutase deficiency: Identification of three missense mutations in *mut*⁰ patients. *J Hum Genet* 1999; 44: 35-9.
13. Acquaviva C, Benoist JF, Pereira S, Callebaut I, Koskas T, Porquet D, Elion J. Molecular basis of methylmalonyl-CoA mutase apoenzyme defect in 40 European patients affected by *mut*^o and *mut* forms of methylmalonic acidemia: identification of 29 novel mutations in the *MUT* gene. *Hum Mutat* 2005; 25: 167-76.
14. Ramos JP, Valente P, de Souza RA, Rosa CA, Leoncini O. Heteroduplex mobility assay of the D1/D2 region of the 26S rDNA for differentiation of *Saccharomyces* species. *Lett Appl Microbiol* 2001; 33: 206-10.
15. Martínez MA, Rincón A, Desviat LR, Merinero B, Ugarte M, Pérez B. Genetic analysis of three genes causing isolated methylmalonic acidemia: identification of 21 novel allelic variants. *Mol Genet Metab* 2005; 84(4): 317-25.
16. Merinero B, Pérez B, Pérez-Cerdá C, Rincón A, Desviat LR, Martínez MA, et al. Methylmalonic acidemia: examination of genotype and biochemical data in 32 patients belonging to *mut*, *cblA* or *cblB* complementation group. *J Inherit Dis* 2008; 31: 55-66.
17. Rezvani I. Defects in metabolism of amino acids. In: Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB, Stanton BF (eds.). *Nelson Textbook of Pediatrics*. Chap 85. 18th. Ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; 2007.
18. Adjalla CE, Hosak AR, Gilfix BM, Lamothe E, Sun S, Chan A, Evans S, et al. Seven novel mutations in *mut*-methylmalonic aciduria. *Hum Mutat* 1998; 11: 270-4.
19. Crane AM, Ledley FD. Clustering of mutations in methylmalonyl CoA mutase associated with *mut*-methylmalonic acidemia. *Am J Hum Genet* 1994; 55(1): 42-50.
20. Thomä NH, Leadlay PF. Homology modeling of human methylmalonyl-CoA mutase: A structural basis for point mutations causing methylmalonic aciduria. *Prot Sci* 1996; 5: 1922-27.
21. Champattanachai V, Ketudat Cairns JR, Shotelersuk V, Keerati-chamroen S, Srisomsap C, Kaewpaluek V, Svasti J. Novel mutations in a Thai patient with methylmalonic acidemia. *Mol Genet Metab* 2003; 79: 300-002.
22. Froese DS, Gravel RA. Genetic disorders of vitamin B₁₂ metabolism: eight complementation groups-eight genes. *Expert Rev Mol Med* 2010; 12: e37.
23. Morgan C, Lewis PD. iMARS-mutation analysis reporting software: an analysis of spontaneous cII mutation spectra. *Mut Res* 2006; 603: 15-26.

Reimpresos:

Dra. María Elena Flores

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología
 Instituto de Investigaciones Biomédicas,
 Universidad Nacional Autónoma de México
 Tercer circuito exterior s/n,
 A.P. 70228,
 04510, México
 Tel.: 55 5622-9204/05
 Fax: 55 5622-9182
 Correo electrónico: mlflores@biomedicas.unam.mx

*Recibido el 20 de mayo 2011.
 Aceptado el 10 de enero 2012.*