

Evidencia del polimorfismo 511C>T en el gen de la acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta en Colombia

Evidence of 511C>T polymorphism in the short chain acyl-CoA dehydrogenase gene in Colombia

Evidência do polimorfismo 511C>T no gene da acil-CoA desidrogenase de cadeia curta na Colômbia

► José Henry Osorio¹

¹ PhD. Laboratorio de Investigación en Bioquímica Clínica y Patología Molecular, Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Universidad de Caldas. Colombia.

Resumen

La acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta (SCAD) cataliza la reacción inicial de la β -oxidación de los ácidos grasos de cadena corta. La deficiencia hereditaria de SCAD ha sido reportada y han sido descritos pocos casos de la misma. El presente estudio pretendió determinar la posible presencia del polimorfismo 511C>T en Caldas (Colombia), debido a que las variantes 625G>A y 511C>T en el gen de la acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta están presentes en el 14% de algunas poblaciones estudiadas, causando algunas veces su deficiencia. El presente estudio es descriptivo. Muestras de sangre de 300 voluntarios fueron estudiadas para el polimorfismo 511C>T mediante la técnica de polimorfismo de conformación de la cadena simple, utilizando ADN amplificado por reacción en cadena de la polimerasa. Los resultados fueron confirmados por secuenciación. El polimorfismo fue identificado en tres personas aparentemente sanas. Existe evidencia de la presencia del polimorfismo 511C>T en el gen de la acil-CoA en Colombia, lo que significa que algunas personas de esta población pueden tener riesgo de sufrir su deficiencia.

Palabras clave: acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta * polimorfismos * β -oxidación

Summary

Short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) catalyzes the initial reaction in short-chain fatty acid β -oxidation. Hereditary SCAD deficiency has been reported and only few cases of this disorder have been described. The present study was conducted to determine the possible presence of the 511C>T variation in the short-chain acyl-CoA dehydrogenase gene in Caldas (Colombia), as the 625G>A and 511C>T variations are present in 14% of some studied populations causing its deficiency on some occasions. The present study is descriptive, blood samples of three hundred adult volunteers were tested for 511C>T polymorphism, analysing the polymerase chain reaction

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana
Incorporada al Chemical Abstracts Service.
Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (Impresa)
ISSN 1851-6114 (En línea)
ISSN 1852-396X (CD-ROM)

amplified cDNA, using a single-stranded conformation polymorphism assay. The results were confirmed by direct bidirectional cycle sequencing using DNA from the positive patients. The polymorphism was identified and confirmed in three healthy persons. This is evidence of the presence of 511C>T polymorphism in the short chain acyl-coA dehydrogenase gene in Colombia, which means that some people in these populations can be at risk of suffering SCAD deficiency.

Key words: *short-chain acyl-coA dehydrogenase * polymorphism * β -oxidation*

Resumo

A acil-CoA desidrogenase de cadeia curta (SCAD) catalisa a reação inicial da β -oxidação dos ácidos graxos de cadeia curta. Foi reportada a deficiência hereditária de SCAD e poucos casos de deficiência foram descritos. O presente trabalho quis determinar a possível presença do polimorfismo 511C>T em Caldas (Colômbia), devido a que as variantes 625G>A e 511C>T no gene da acil-CoA desidrogenase de cadeia curta estão presentes em 14% de algumas populações estudadas, produzindo algumas vezes sua deficiência. O presente estudo é descritivo. Amostras de sangue de 300 voluntários foram analisadas para o polimorfismo 511C>T através da técnica de polimorfismo de conformação da cadeia simples, utilizando DNA amplificado por reação em cadeia da polimerase. Os resultados foram confirmados por sequenciamento. O polimorfismo foi identificado em três pessoas aparentemente saudáveis. Existe evidência da presença do polimorfismo 511C>T no gene da acil-CoA na Colômbia, o que significa que algumas pessoas desta população correm o risco de sofrer sua deficiência.

Palavras-chave: *acil-CoA desidrogenase de cadeia curta * polimorfismos * β -oxidação*

Introducción

La acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta (SCAD) es una de las enzimas que catalizan la primera etapa de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos de cadena corta (C4-C6) (1). La organización estructural del gen SCAD (12q22-qter) en humanos ha sido previamente reportada y consta aproximadamente de 13 kb de longitud y 10 exones (2). El déficit de esta enzima (McKusick 201470 - Clasificación del catálogo McKusick de herencia mendeliana) (3) es un error innato del metabolismo. Estudios de expresión de las variantes polimórficas 625G>A y 511C>T del gen SCAD muestran reducción de la actividad catalítica y estabilidad de la enzima (4). La mayoría de pacientes que sufren la deficiencia presentan hipotonía muscular como signo característico (5). La variante 625G>A ha sido encontrada en homocigosis en el 7% de los individuos control y la variante 511C>T está presente en el 10% de los individuos 625G estudiados en Europa y los Estados Unidos (6), por lo que es necesario dar comienzo al estudio de este tipo de deficiencia en esta población, tratando de establecer la frecuencia de presentación y su origen geográfico. La deficiencia hereditaria de SCAD fue reportada inicialmente en 1987 (7). Esta deficiencia es considerada un raro error congénito del metabolismo mitocondrial de los ácidos grasos y ha sido relacionada con retardo en el crecimiento, muchas veces asociado a disfunciones neuromusculares y elevada excreción urinaria de ácido

etilmalónico (EMA) (8) (9). Deficiencias secundarias de SCAD pueden ser observadas en defectos múltiples de la deshidrogenación de acil-CoA, donde la actividad SCAD se encuentra afectada por deficiencias en la flavoproteína de transferencia de electrones (10), flavoproteína de transferencia de electrones ubiquinona óxidorreductasa (11) (12), o flavinadeninucleótido mitocondrial (13) (14). Dado que la deficiencia primaria o secundaria de SCAD resulta en acumulación intracelular de butiril-CoA, el cual puede ser convertido en EMA mediante la acción de la propionil-CoA carboxilasa y posterior hidrólisis del etilmalonil-CoA (15), el análisis de EMA—realizado por cromatografía de gases-espectrometría de masas— ha sido considerado un marcador bioquímico de la deficiencia funcional primaria o secundaria de SCAD (16) (17). Sin embargo, ante la sospecha de que la actividad SCAD está implicada en la mayoría de los casos de aciduria etilmalónica, diversos estudios han postulado que el estudio de los posibles polimorfismos o alelos de susceptibilidad del gen SCAD sirve como marcador molecular para establecer la responsabilidad de la deficiencia primaria o secundaria de SCAD en la aciduria etilmalónica (18). El presente estudio fue realizado para tratar de determinar la posible presencia de la variación 511C>T en el gen de la acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta en Caldas (Colombia), debido a que las variaciones 625G>A y 511C>T están presentes hasta en el 14% de algunas poblaciones estudiadas, causando algunas veces su deficiencia.

Materiales y Métodos

El presente estudio es descriptivo. Se utilizaron muestras de sangre de 300 adultos voluntarios, aparentemente sanos, con edades comprendidas entre 18 y 49 años (120 hombres y 180 mujeres), todos nacidos en Caldas (Colombia), sin antecedentes de errores innatos del metabolismo. Las muestras fueron recolectadas entre enero de 2006 y enero de 2009 y todos los participantes firmaron el consentimiento informado. Las muestras de sangre fueron colocadas en tubos con EDTA. La extracción del ADN se realizó de acuerdo con Gustafson *et al* (19), con algunas modificaciones (20). Se realizó un ensayo de polimorfismo de conformación de la cadena simple (SSCP) utilizando los siguientes *primers*: Directo 5-GTGCCCTTAGGTTGTGTG - Reverso 5-AAGGCCCTAGAAACAGAAAT.

Condiciones de la PCR: 3 min a 94 °C, 40 s a 94 °C, 30 s a 55 °C y 2 min a 72 °C para 35 ciclos con 500 ng de ADN genómico purificado y 75 ng de cada *primer*.

Técnica de polimorfismo de conformación de la cadena simple: los amplímeros obtenidos fueron sometidos a electroforesis en un gel de acrilamida/bisacrilamida (19:1), 7,5 M de urea, a temperatura ambiente por 3 h. Los cambios en las bandas fueron detectados luego de colorear el gel con nitrato de plata. Los resultados fueron confirmados mediante secuenciación automática, utilizando un equipo con "BigDyeterminators" (Prism, TaqFS y BigDye, Perkin-Elmer), en un "ABI Catalyst 800 Molecular BiologyLabStation" (Applied Biosystems).

Resultados

Luego de analizar las muestras de ADN de los 300 participantes, el polimorfismo fue identificado en tres personas, todos en heterocigosis. Las tres personas identificadas como portadoras del polimorfismo fueron tres mujeres de 23, 25 y 38 años respectivamente, aparentemente sanas, procedentes de familias sin antecedentes de alguna enfermedad que pudiera relacionarse con algún defecto en la oxidación de ácidos grasos. Luego de realizar un perfil de acilcarnitinas en sangre a las tres personas, los resultados fueron normales.

Discusión y Conclusiones

Los estudios de expresión de las variantes polimórficas 625G>A y 511C>T del gen SCAD muestran reducción de la actividad catalítica y estabilidad de la enzima bajo ciertas condiciones, lo cual explicaría su funcionalidad reducida *in vivo* bajo ciertas circunstancias (21). Por esto, es fundamental desde la patología

molecular conocer la presencia de mutaciones o polimorfismos relacionados con este tipo de deficiencias en las distintas poblaciones. Colombia cuenta con 45 millones de habitantes aproximadamente, distribuidos en 35 regiones en las cuales se observa una mezcla racial. Caldas, una de esas regiones (departamentos), cuenta con un territorio dividido en 29 municipios y una totalidad de 968.740 habitantes, según el censo de 2005 (22), número que debe ser mayor a la fecha. Al encontrar el polimorfismo 511C>T en esta región se coincide con trabajos anteriores (23), confirmando que la región no es ajena a la presencia de errores innatos del metabolismo intermediario y se contribuye al entendimiento de la distribución geográfica de la deficiencia SCAD, un error innato del metabolismo que comienza a ser reportado en otras latitudes (24). Caldas es una región que cuenta con poblaciones indígenas, negras y principalmente blancas derivadas de ancestros españoles de fuerte arraigo en esta zona. Sin embargo, las personas portadoras de esta variante en el presente estudio son mestizas. Debido a que entre el 10% y el 14% de la población general es homocigota para 625G>A o 511C>T, o incluso heterocigota compuesta para ambas variantes (25), se hace necesario tener alguna otra indicación bioquímica o clínica, para que estas personas se clasifiquen como manifestando la deficiencia, por lo que se consideran portadoras. Para diagnosticar la deficiencia de SCAD pueden realizarse algunas pruebas bioquímicas, como el estudio de acilcarnitinas en sangre por espectrometría de masas en *tandem* (26) o estudios en fibroblastos (27), donde se encuentran elevados los niveles de acilcarnitina de 4 átomos de carbono (butirilcarnitina). En el presente estudio en las tres personas los perfiles de acilcarnitinas fueron normales.

La deficiencia de SCAD es una enfermedad autosómica recesiva, clínicamente heterogénea, con manifestaciones clínicas que varían de acuerdo al fenotipo, pudiendo algunos pacientes permanecer asintomáticos, y otros presentar una enfermedad que puede ser fatal en etapas tempranas de la vida. Los polimorfismos 511C>T y 625G>A, han sido encontrados en los exones 5 y 6 del gen SCAD, respectivamente y pueden conferir susceptibilidad para la enfermedad, ya que alteran las propiedades estructurales y catalíticas de la enzima SCAD. Los estudios poblacionales realizados para estos polimorfismos muestran su presencia en Colombia. Se necesitan más estudios de este tipo en Latinoamérica que permitan conocer la distribución de los errores innatos del metabolismo.

CORRESPONDENCIA

PhD. JOSÉ HENRY OSORIO

E-mail: jose.osorio_o@ucaldas.edu.co

Referencias bibliográficas

- Panov A, Orynbayeva Z, Vavilin V, Lyakhovich V. Fatty acids in energy metabolism of the central nervous system. *Biomed Res Int* 2014; 472459. Epub.
- Corydon MJ, Andresen BS, Bross P, Kjeldsen M, Andreassen PH, Eiberg H, *et al*. Structural organization of the human short-chain acyl-CoA dehydrogenase gene. *Mamm Genome* 1997; 8: 922-6.
- OMIM. Online Mendelian Inheritance in man (Fecha de acceso: 6 de julio de 2014). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>. 2014.
- Jethva R, Bennett MJ, Vockley J. Short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Mol Gen Metab* 2008; 95: 195-200.
- van Maldegem BT, Wanders RJ, Wijburg FA. Clinical aspects of short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 2010; 33 (5): 507-11.
- Koeberl DD, Young SP, Gregersen NS, Vockley J, Smith WE, Benjamin DK Jr, *et al*. Rare disorders of metabolism with elevated butyryl- and isobutyryl-carnitine detected by tandem mass spectrometry newborn screening. *Pediatr Res* 2003; 54 (2): 219-23.
- Amendt BA, Greene C, Sweetman L, Cloherty J, Shih V, Moon A, *et al*. Short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. Clinical and biochemical studies in two patients. *J Clin Invest* 1987; 79: 1303-09.
- Waisbren SE, Levy HL, Noble M, Matern D, Gregersen N, Pasley K, *et al*. Short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) deficiency: an examination of the medical and neurodevelopmental characteristics of 14 cases identified through newborn screening or clinical symptoms. *Mol Genet Metab* 2008; 95 (1-2): 39-45.
- Pedersen CB, Kølvråa S, Kølvråa A, Stenbroen V, Kjeldsen M, Ensenauer R, *et al*. The ACADS gene variation spectrum in 114 patients with short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) deficiency is dominated by missense variations leading to protein misfolding at the cellular level. *Hum Genet* 2008; 124 (1): 43-56.
- Rhead WL, Wolff JA, Lipson M, Falace P, Desai N, Fritchman K, *et al*. Clinical and biochemical variation and family studies in the multiple acyl-CoA dehydrogenation disorders. *Pediatr Res* 1987; 21: 371-6.
- Goodman SI, Frerman FE. Glutaricaciduria type II (multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency). *J Inherit Metab Dis* 1984; 7 (suppl 1): 33-7.
- Rinaldo P, Welch RD, Previs SF, Schmidt-Sommerfeld E, Gargus JJ, *et al*. Ethylmalonic/adipic aciduria: effect of oral medium chain triglycerides, carnitine and glycine on urinary excretion of organic acids, acylcarnitines and acylglycines. *Pediatr Res* 1991; 30: 216-21.
- Gregersen N, Wintzensen H, Kølvråa S, Christensen E, Christensen MF, Brandt NJ, *et al*. C6-C10-dicarboxylic aciduria: investigation of a patient with riboflavin responsive multiple acyl-CoA dehydrogenation defects. *Pediatr Res* 1983; 16: 861-8.
- Gregersen N, Rhead W, Christensen E. Riboflavin responsive Glutaric Aciduria type II. In: Tanaka K, Coates PM (eds). *Clinical, Biochemical and Molecular Aspects of Fatty Acid Oxidation*. New York: Alan R Liss; 1990. p. 477-94.
- Amaral AU, Cecatto C, Busanello EN, Ribeiro CA, Melo DR, Leipnitz G, *et al*. Ethylmalonic acid impairs brain mitochondrial succinate and malate transport. *Mol Genet Metab* 2012; 105 (1): 84-90.
- Corydon MJ, Gregersen N, Lehnert W, Ribes A, Rinaldo P, Kmoch S. Ethylmalonic aciduria is associated with an amino acid variant of short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase. *Pediatr Res* 1996; 39: 1059-66.
- Gregersen N, Winter VS, Corydon MJ, Corydon TJ, Rinaldo P, Ribes A, *et al*. Identification of four new mutations in the short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) gene in two patients: one of the variant alleles, 511C→T, is present at an unexpectedly high frequency in the general population, as was the case for 625G→A, together conferring susceptibility to ethylmalonic aciduria. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 619-27.
- Reddy GS, Sujatha M. A rare case of short-chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency: The apparent rarity of the disorder results in under diagnosis. *Indian J Clin Biochem* 2011; 26 (3): 312-5.
- Gustafson S, Proper JA, Bowie EJW, Sommer SS. Parameters affecting the yield of DNA from human blood. *Biochemistry* 1987; 165: 294-9.
- Osorio JH, Quenan YE. Modificación de una técnica para extracción de ADN de glóbulos blancos humanos. *Biosalud* 2012; 11 (2): 20-5.
- Nguyen TV, Riggs C, Babovic-Vuksanovic D, Kim YS, Carpenter JF, Burghardt TP *et al*. Purification and characterization of two polymorphic variants of short chain acyl-CoA dehydrogenase reveal reduction of catalytic activity and stability of the Gly185Ser enzyme. *Biochemistry* 2002; 41 (37): 11126-33.
- Departamento Nacional de Estadística (DANE) Colombia. <http://www.dane.gov.co/censo/> 2005. Fecha de acceso: 2 de febrero de 2014.
- Osorio JH. Evidence in Colombia of 625G>A polymorphism in the short chain acyl-CoA dehydrogenase gene, a variation which could cause glutaric aciduria in our populations. *Colomb Med* 2010; 41 (3): 235-9.
- Jiang M, Liu L, Peng M, Liang C, Sheng H, Cai Y. First case report of short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in China. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2012; 25 (7-8): 795-7.
- Kim SH, Park HD, Sohn YB, Park SW, Cho SY, Ji S, Kim SJ, *et al*. Mutations of ACADS gene associated with short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Ann Clin Lab Sci* 2011; 41 (1): 84-8.
- Gallant NM, Leydiker K, Tang H, Feuchtbaum L, Lorey F, Puckett R, *et al*. Biochemical, molecular, and clinical characteristics of children with short chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency detected by newborn screening in California. *Mol Genet Metab* 2012; 106 (1): 55-61.
- Edhager AV, Stenbroen V, Nielsen NS, Bross P, Olsen RK, Gregersen, *et al*. Proteomic investigation of cultivated fibroblasts from patients with mitochondrial short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Mol Genet Metab* 2014; 111 (3): 360-8.

Recibido: 30 de marzo de 2013

Aceptado: 13 de junio de 2014