
ESTUDIO DE LA VARIANTE POLIMÓRFICA 625G>A DEL GEN DE LA ACIL-COA DESHIDROGENASA DE CADENA CORTA EN UNA FAMILIA DE MANIZALES

José Henry Osorio¹
Morteza Pourfarzam²

RESUMEN

Muestras de sangre de una familia que ha presentado dos casos de síndrome muerte súbita del lactante (SMSL), después de dos embarazos consecutivos, fueron analizadas para algunos desórdenes de la β -oxidación mitocondrial. El polimorfismo 625G>A para el gen SCAD fue identificado en dos personas que son pareja y primos en primer grado, y han sido padres de dos niñas que nacieron aparentemente normales y murieron durante las primeras 24 horas sin una explicación razonable. El ADN fue amplificado por PCR y analizado por SSCP. Cuando los fragmentos de ADN fueron analizados por electroforesis en acrilamida/bisacrilamida (19:1) al 8%, gel 7.5M urea, a temperatura ambiente durante 3 horas, el polimorfismo en la posición 625 fue claramente detectado mediante coloración con nitrato de plata. Los resultados fueron confirmados por secuenciación. Después del tercer embarazo nació una niña, y luego de 6 meses se encuentra saludable. Análisis de acilcarnitinas para los padres y la tercera niña han sido normales, por eso se están realizando análisis bioquímicos y moleculares de la niña y otros familiares voluntarios, con el fin de obtener información acerca de la posible relación entre el problema de SMSL de esta familia y la presencia del polimorfismo. Sin embargo, debido a que cerca del 10-14% de la población en general son homocigotos para 625G>A o 511C> o heterocigotos compuestos para ambos, se hace necesario contar con otros indicios de que esta familia presenta la enfermedad y se necesita, además,

STUDY OF THE SHORT-CHAIN ACYL-COA DEHYDROGENASE 625G>A POLYMORPHISM IN A MANIZALES FAMILY

ABSTRACT

Blood samples from a family who presented two cases of sudden infant death syndrome (SIDS) after two consecutive pregnancies were analysed for some inherited disorders of mitochondrial fatty acid β -oxidation. The polymorphism 625 G>A for the SCAD gene was identified in two persons who are cousins at first degree and marriage, and are the parents of two girls born apparently without problems who died after 24 hours without a reasonable explanation. The DNA analysis was performed by polymerase chain reaction (PCR) and single-stranded conformation polymorphism (SSCP) assay. When DNA fragments were subjected to electrophoresis in an 8% acrilamide/bisacrilamide (19:1), 7.5M urea gel, at room temperature for 3 hours, the single-base change at position 625 was clearly detected after silver stain. The results were confirmed by direct bidirectional cycle sequencing using DNA. After a third pregnancy a baby was born and after 6 months is still alive without problems. The acylcarnitines analysis for parents and the third baby was normal and molecular and biochemical analyses are being performed in samples from the new child and volunteer relatives of this family in order to obtain information about a possible relationship

¹ Laboratorio de Enfermedades Metabólicas. Departamento de Ciencias Básicas de la Salud. Universidad de Caldas.

² Spence Biochemical Genetics Unit, Newcastle upon Tyne, England.

estudiar nuestras poblaciones para conocer el porcentaje real de este polimorfismo entre nosotros, debido a que todos los estudios se han desarrollado en poblaciones caucásicas.

Palabras clave: Acil-coa deshidrogenasa de cadena corta, lípidos, metabolismo.

between the polymorphism and SIDS in this family. However, since about 10-14% of the general population are homozygous 625G>A or 511C>T or compound heterozygous for both it is necessary to have some other indication that they are disease-associated in this family and we need to study our populations to know the real percentage for the presence of this polymorphism as all the studies have been performed in Caucasoid populations.

Key words: Short-chain acil-coa deshydrogenase, lipids, metabolism.

INTRODUCCIÓN

Múltiples investigaciones tratan de explicar el SMSL con base en disfunciones orgánicas tales como las alteraciones del ritmo cardíaco y el síndrome del QT largo, describiendo mutaciones en varios genes codificadores de las subunidades estructurales de los canales de sodio y potasio del corazón en familias con el síndrome (1), alteraciones en la región promotora del gen transportador de serotonina (2), problemas de desarrollo del sistema nervioso autónomo (3), problemas en el gen del complemento C4 y de la interleukina 10, con incremento en el riesgo de infección e inflamación, así como alteraciones neurológicas, procesos hemorrágicos debidos a malformaciones anatómicas y trastornos de la coagulación (4).

Actualmente, los trastornos metabólicos también se identifican como posibles causas fundamentales del SMSL, y son reportadas algunas entidades como: alteraciones en la cadena respiratoria mitocondrial, aciduria dicarboxílica, aciduria etilmalónica, aciduria metilmalónica, aciduria propiónica, aciduria isovalérica, glucogenosis tipo I, galactosemia, fructosemia, enfermedad de Wolman, homocistinuria,

trastornos del ciclo de la urea, acidosis lácticas (biotinidasa, piruvato deshidrogenasa) y trastornos de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, entre otras (5).

De las entidades metabólicas anteriormente mencionadas, los trastornos de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos son los más implicados, mientras que las siguientes deficiencias enzimáticas están relacionadas con el SMSL: transportador de carnitina, carnitina/acilcarnitina translocasa, carnitina palmitoiltransferasa II, varias acil-CoA deshidrogenadas, entre ellas SCAD, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena larga y la proteína trifuncional, así como las múltiples acil-CoA deshidrogenasas (6).

En el presente estudio, muestras de sangre de una familia que ha presentado dos casos de síndrome muerte súbita del lactante (SMSL), después de dos embarazos consecutivos, fueron analizadas para algunos desórdenes de la β -oxidación mitocondrial. De acuerdo con los hallazgos, la investigación ha sido enfocada a la presentación del polimorfismo 625G>A del gen de la acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta en esta familia.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio fue realizado en el laboratorio de enfermedades metabólicas de la Universidad de Caldas y contó con la aprobación del comité de ética. Fueron tomadas muestras de sangre de 20 personas pertenecientes a una misma familia de la ciudad de Manizales. Los adultos firmaron consentimiento escrito y en el caso de los menores de edad, los padres firmaron el consentimiento. Se tomaron 5 ml de sangre a cada persona y se depositaron en tubos con EDTA. Las muestras fueron conservadas a menos 30°C hasta los respectivos análisis.

La extracción de ADN fue realizada de acuerdo con Gustafson y colaboradores (7), con algunas modificaciones. En breve, el protocolo utilizado fue el siguiente:

Se lava la sangre total con suero fisiológico. Son Utilizados tubos NUC de 50cc. Para ello, se traspasa la sangre a esos tubos y se añaden 10 ml de suero fisiológico. Luego se centrifugan las muestras durante 10 min a 2500 rpm a 4°C sin freno. Se desecha el sobrenadante por aspiración y se conserva la capa celular. Posteriormente, se añaden 10 ml de buffer de lisis de eritrocitos (TLE: tris 0.02M, MgCl₂ 0.005M) agitando suavemente hasta la total disolución de la muestra. Se debe centrifugar 15 min a 3500 rpm (10g) a 4°C sin freno. Se repite el paso anterior. Se decanta el sobrenadante conservando el pellet (un pellet blanco pequeño). Se puede conservar a -20 ó -80°C o continuar el proceso.

Para la digestión de las proteínas son añadidos 3 ml de buffer de lisis de leucocitos (TLL: tris 0.01M, EDTA 0.002M, NaCl 0.4M) + 200µl de SDS 10% + 500µl de la solución de proteinasa K. Se agita la mezcla con vortex hasta observar un aspecto homogéneo y se deja a 37°C en baño de María con agitación durante la noche. Posteriormente, se añade 1 ml de NaCl saturado (5.5M) a la muestra. Se agita durante 15 seg en vortex y se centrifuga 20 min a 3500 rpm a 4°C sin freno. Luego se traspasa el sobrenadante a otro

tubo y se repite la centrifugación (para evitar el exceso de sales). Se traspasa el sobrenadante a otro tubo. Se adicionan 4700µl de cloroformo y se agita manualmente durante 15 seg, para luego centrifugar 20 min a 3500 rpm a 4°C sin freno. La fase superior es traspasada cuidadosamente a otro tubo evitando tocar las dos fases inferiores. Luego se añaden 4 ml de etanol absoluto y se agita cuidadosamente hasta ver aparecer la medusa de ADN.

La medusa se pasa a un tubo de microcentrífuga y son agregados entre 100 y 1000µl de TE (Tris 0.02 M y EDTA 1x10⁻⁵M). Dependiendo del tamaño de la medusa, se deja en incubación a 37°C durante la noche hasta la total disolución.

La amplificación de los fragmentos de DNA se realizó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para estudiar el polimorfismo 625G>A ubicado en el exón 6 del gen que codifica para la enzima SCAD; los primeros son: Directo 5-GCAGCTCTGAGAAAACCCAC y reverso 5-ATGTCCAGGGTTTGCTGT.

Los productos de PCR se obtienen a apartir de 200 ng de DNA después de 3 minutos de desnaturalización a 94°C y 35 ciclos consistentes en 40 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de hibridación del cebador a 55°C y 2 minutos de extensión a 72°C.

Luego de la PCR, los amplímeros se deben guardar a -20°C hasta el momento en que se haga la confirmación de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa. Para ello, se prepara inicialmente una solución de bromuro de etidio a una concentración final de 20 mg/ml y luego se prepara el buffer de carga. La preparación de las muestras para cargarlas en el gel de agarosa, se realiza mediante la siguiente mezcla: Buffer de carga 0.5µl + muestra 10µl. El buffer de carga contiene los siguientes reactivos: glicerol 50%, Buffer TBE 20X 1%, Azul de bromofenol saturado 1% y xilen cianol al 10%. Este buffer se debe alicuotar en volúmenes de 1 ml y almacenar a -20°C. Se pesa 1g de agarosa

ultrapura y se agregan 50 ml de buffer TBE al 0.5%, para disolverlo con agitación constante en presencia de calor. Luego se agrega bromuro de etidio a una concentración de 50µg/ml de gel. Se coloca el molde para obtener los pozos y se deja gelificar durante 40 minutos, para luego agregar buffer sobre el gel y facilitar el retiro del molde evitando que se dañen los pozos donde se siembran las muestras. Se carga el gel con las muestras y el buffer de carga y se deja correr a 120V durante 1 hora.

Luego se visualiza la presencia o no del fragmento amplificado y se procede a la identificación del polimorfismo 625G>A del gen SCAD mediante la técnica del polimorfismo de conformación de la cadena simple (SSCP) (8), con modificaciones en geles de acrilamida/bisacrilamida, así: son preparados geles al 8% de acrilamida/poliacrilamida (19:1), 7.5M de úrea, se realiza el montaje de la placa y se deja polimerizar por 40 minutos a una hora. Luego se quita la peinilla evitando que se dañen los pozos en los cuales se van a sembrar las muestras y se agrega buffer de corrida. Para sembrar las muestras, debe prepararse un buffer denaturante compuesto por formamida al 95% y EDTA 20mM. Luego se mezclan 15µl del buffer denaturante + 10µl de cada muestra. Se colocan las muestras en agua hirviendo por 10 minutos, para luego pasarlas al hielo. Se da a las muestras un pulso en la centrífuga y luego se colocan nuevamente en hielo, para luego sembrar. Se realiza la corrida a 150V por 3 horas a temperatura ambiente. Luego se desmontan los geles y se colorea con nitrato de plata.

La confirmación de los positivos se realiza mediante secuenciación de los fragmentos amplificados, así: el ADN purificado es secuenciado utilizando el primer antisentido (reverso) de la PCR como primer de secuenciación y un kit de dideoxinucleótidos marcados con fluorescencia (Perkin-Elmer). Las secuencias son leídas utilizando un secuenciador automatizado para DNA (ABI 377A).

Para la determinación de acilcarnitinas mediante espectrometría de masas en tandem (MS/MS) fue utilizado el protocolo de Millington y colaboradores (9). Es el siguiente: Alícuotas de 20 microlitros de sangre se dejan caer sobre papel de filtro (No. 903, 1.88 mm Schleicher & Schuell). Las muestras se dejan secar a temperatura ambiente durante la noche y son empacadas y selladas al vacío, para ser guardadas a -80°C hasta el momento del análisis. El procedimiento se realiza en bandejas de 96 pozos (*microtitre plates*).

Las manchas de sangre son recortadas del papel de filtro en círculos (6.35 mm ó 0.25 pulgadas de diámetro para cada uno, que corresponden a 12µl desangre) y se deposita un círculo en cada pozo. A cada uno son adicionados 100µl de estándar interno (IS) y metanol puro (500 µl). Las bandejas son colocadas en agitador orbital (750 rpm) durante 30 min y luego sonicadas durante 15 min. Posteriormente son agitadas nuevamente durante dos horas. Se sonican por 30 min y el papel de filtro es removido de cada pozo.

El sobrenadante resultante es evaporado bajo gas nitrógeno a 45°C hasta secarse y 50µl de HCl butanólico 1 mol/l son adicionados a cada muestra (cada pozo) e incubados a 60°C durante 15 min (derivatización). Las muestras son evaporadas inmediatamente bajo nitrógeno y redisueltas en 100µl (cada una) de acetónitrilo al 70% en agua para ser inyectadas al espectrómetro de masas. El estándar interno es usado para la cuantificación de L-carnitina al analizar la relación entre las señales.

Todos los análisis son realizados en un equipo Quattro II, triple quadrupole tandem mass spectrometer (Micromass UK), equipado con una fuente de ionización en espray (ESI), y sistema de análisis datos "micro mass MassLynx". La introducción de las muestras a la fuente se hace mediante el dispositivo automático Jasco AS980 acoplado a una bomba Jasco PU980 HPLC.

Análisis por MS/MS. El análisis se realiza utilizando las siguientes características: Padres de m/z 85, rango de scan 200-500 (m/z), energía de colisión 25 eV., voltaje del cono 30V, tiempo de scan 2.0 sec., tiempo de Inter-scan 0.1 sec., gas de colisión argon, presión del gas de colisión $1.6-2 \times 10^{-3}$ mBar.

Para calcular la concentración de acilcarnitinas, se tienen en cuenta las concentraciones del estándar interno (I/S) en 100 μ l; para $[d_9]cn = 3.6\mu M$, $[d_3]C_2cn = 1.2 \mu M$, $[d_3]C_3cn = 0.24 \mu M$, $[d_9]C_8cn = 0.12 \mu M$ y $[d_9]C_{16}cn = 0.24 \mu M$ adicionados a 12 μ l de sangre extraídos de la tarjeta.

RESULTADOS

El polimorfismo 625G>A para el gen SCAD fue identificado en dos personas (heterocigotos) que son pareja y primos en primer grado. Ellos fueron padres de dos niñas que nacieron aparentemente normales y murieron durante las primeras 24 horas sin una explicación razonable. El ADN fue amplificado por PCR y analizado por SSCP. Cuando los fragmentos de ADN fueron analizados por electroforesis en acrilamida/bisacrilamida (19:1) al 8%, gel 7.5M urea, a temperatura ambiente durante 3 horas, el polimorfismo en la posición 625 fue claramente detectado mediante coloración con nitrato de plata (figuras 1 y 2). Los resultados fueron confirmados por secuenciación. Después del tercer embarazo, nació una niña que luego de 6 meses se encuentra saludable. Los análisis de acilcarnitinas para los padres y la tercera niña han sido normales.

DISCUSIÓN

La deficiencia hereditaria de SCAD fue reportada inicialmente en 1987 (10). 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). Menos de 20 pacientes con deficiencia primaria de SCAD han sido documentados y reportados (11). 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 (12), flavoproteína de transferencia de electrones-ubiquinona oxidoreductasa (13) o flavina adenino dinucleótido mitocondrial (14).

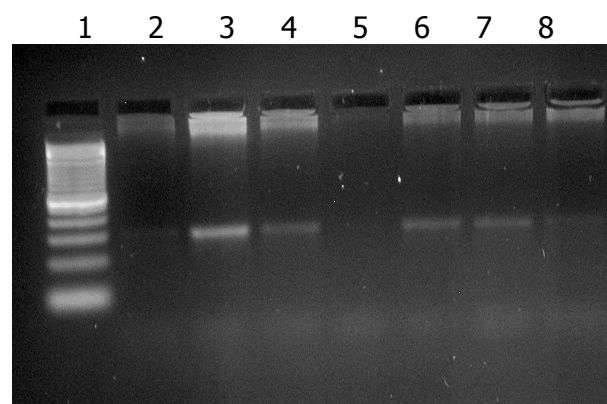


Figura 1. Gel de agarosa (PCR) para el exón 6 del gen SCAD amplificado en seis pacientes. Pozo 1 marcador de peso molecular; pozos 3, 4, 6, 7 y 8 muestras de pacientes; pozos 2 y 5 muestras control sin amplificar.

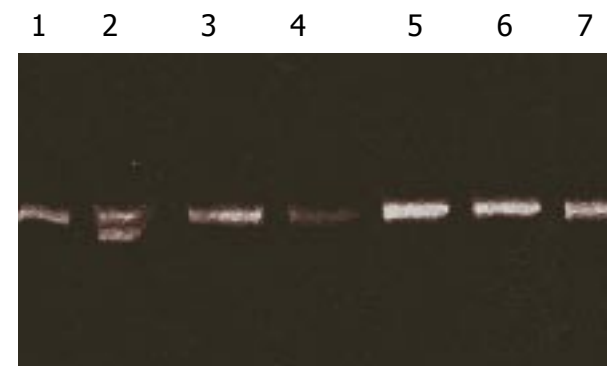


Figura 2. Gel de acrilamida/bisacrilamida (SSCP) para el análisis del polimorfismo 625G>A del gen SCAD en 7 muestras control. La muestra del pozo número 2 evidencia la presencia del polimorfismo (doble banda).

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 por cromatografía de gases-espectrometría de masas ha sido considerado un marcador bioquímico de la deficiencia funcional primaria o secundaria de SCAD (16). Sin embargo, este hallazgo es común también en pacientes con signos predominantemente neuromusculares y deficiencias en la cadena respiratoria mitocondrial (17), en pacientes con síndrome de encefalopatía etilmalónica (18), y en la enfermedad de los vómitos de Jamaica (19).

Ante la sospecha de que la actividad SCAD está implicada en la mayoría de los casos de aciduria etilmalónica, ante la imposibilidad de investigar a fondo con los recursos necesarios todos los casos de pacientes con niveles de EMA elevados y ante la dificultad bioquímica de medir la actividad SCAD, 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 (20). Estos estudios han reportado que la aciduria etilmalónica en una pequeña proporción de casos es causada por mutaciones patogénicas en el gen SCAD, pero también han demostrado que puede ser causada frecuentemente debido a una deficiencia funcional de SCAD, ante la presencia de variaciones de susceptibilidad (polimorfismos) en el gen, en las cuales una actividad variable o moderadamente reducida de la actividad SCAD en fibroblastos, podría ser clínicamente relevante (11). 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).

La variante 625G>A ha sido encontrada en homocigosis en el 7% de los individuos control mientras que se encuentra en el 60% de los pacientes con excreción elevada de EMA (22). Por otro lado, la variante 511C>T está presente en 13 de 130 y 15 de 67 alelos 625G, en el grupo control y en el de pacientes con EMA elevado, respectivamente. Ese mismo estudio concluye que el alelo 511T-625G confiere susceptibilidad para desarrollar aciduria etilmalónica (16).

A pesar de poseer manifestaciones clínicas heterogéneas, en los trastornos caracterizados por niveles elevados de EMA prevalecen los signos neurológicos y es característico el retraso en el desarrollo neuromotor, por lo que la mayoría de los pacientes presenta hipotonía, aunque también algunos casos pueden presentar hipertensión e hiperactividad (23).

Otras manifestaciones clínicas observadas en pacientes que sufren deficiencia de SCAD incluyen: acidosis severa neonatal y fallo de medro, los cuales pueden estar relacionados con SMSL; debilidad o hipotonía en la infancia, hasta formas severas de atrofia muscular y escoliosis; retraso en el lenguaje e hiperactividad u oftalmoplejía progresiva externa y miopatía en niños mayores (24). Las formas benignas de la enfermedad se caracterizan por hipotonía y descenso del nivel de conciencia durante períodos de crisis secundarias a procesos infecciosos; sin embargo, en la mayoría de estas formas de la enfermedad, los pacientes permanecen prácticamente asintomáticos.

En el presente estudio hicimos el análisis del grupo familiar, inicialmente mediante técnicas moleculares, pero bioquímicamente esta deficiencia presenta características específicas. A diferencia de otros errores innatos del metabolismo mitocondrial de los ácidos grasos, en la deficiencia de SCAD no se presenta hipoglicemia hipocetósica ni hipocarnitinemia; sin embargo, la relación carnitina esterificada/carnitina libre se encuentra incrementada. Los niveles de ácido etilmalónico (EMA) pueden

encontrarse elevados, pero para el diagnóstico definitivo es recomendable el diagnóstico molecular.

En nuestro laboratorio fue posible encontrar y reportar por primera vez en Latinoamérica la presencia del polimorfismo 625G>A en un individuo normal (25). Pero el presente estudio muestra que este polimorfismo puede ser común en nuestras poblaciones, aunque se requieren más estudios poblacionales para saber el porcentaje de presentación del mismo.

Se está trabajando en investigación con la tercera niña nacida de esta pareja, la cual vive actualmente sin problemas. Ella presenta niveles de acilcarnitinas normales y estamos realizando estudios moleculares tendientes a documentar el caso de esta familia.

CONCLUSIÓN

Las personas que sufren la deficiencia enzimática de SCAD presentan niveles de butirilcarnitina elevados, pero en las dos personas que lo detectamos no hay alteraciones del perfil de acilcarnitinas, por lo cual se descarta que sufran la deficiencia. En este caso, al no tener ningún espécimen conservado de las dos niñas fallecidas, con el fin de realizar análisis bioquímicos o moleculares, no podemos atribuir directamente sus muertes a una deficiencia SCAD, pero tampoco puede descartarse esa posibilidad, debido a que los padres heterocigotos pueden tener hijos homocigotos con riesgo de muerte. Por tal motivo, es recomendable implementar entre patólogos y pediatras la necesidad de la llamada "necrosis metabólica".

REFERENCIAS

1. Kiehne N, Kauferstein S. Mutations in the SCN5A gene: Evidence for a link between long QT syndrome and sudden death? *Forensic Sci International: Genetics* 2007; 1:170-4.
2. Byard RW. Sudden infant death syndrome. In: *Sudden death in infancy, childhood and adolescence*. 2nd Edition. Cambridge: Cambridge University Press: 2004.489-575.
3. Weese-Mayer DE, Zhou L, Berry-Kravis EM, Maher BS, Silvestri JM, Marazita ML. Association of the serotonin transporter gene with sudden infant death syndrome: a haplotype analysis. *Am J Med Genet* 2003; 122A:238-45.
4. Weese-Mayer DE, Ackerman MJ, Marazita ML, Berry-Kravis EM. Sudden Infant Death Syndrome: review of implicated genetic factors. *Am J Med Genet* 2007; 143A:771-88.
5. Opdal SH, Vege A, Stave AK. The complement component C4 in sudden infant death. *Eur J Pediatr* 1999; 158:210-12.
6. Boles RG, Buck EA, Blitzer MG, Platt MS, Cowan TM, Martin SK, et al. Retrospective biological screening of fatty acid disorders in postmortem livers of 418 cases of sudden infant death in the first year of life. *J Pediatr* 1998; 132:924-33.
7. Gustafson S, Proper JA, Bowie EJW, Sommer SS. Parameters affecting the yield of DNA from human blood. *Biochemistry* 1987; 165:294-99.
8. Kristensen MJ, Kmoch S, Bross P, Andresen BS, Gregersen N. Amino acid polymorphism (Gly209Ser) in the ACADS gene. *Hum Mol Genet* 1994; 3:1711.
9. Millington DS, Terada N, Chace DH, Chen YT, Ding JH, Kodo N, et al. The role of tandem mass spectrometry in the diagnosis of fatty acid oxidation disorders. In: Coates PM, Tanaka K (eds). *New Developments in fatty acid oxidation*. New York: Wiley-Liss; 1992. p.339-354.
10. 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.

11. Corydon MJ, Vockley J, Rinaldo P, Rhead WJ, Kjeldsen M, Winter V, et al. Role of common gene variations in the molecular pathogenesis of short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr Res* 2001; 49(1):18-23.
12. 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; 21:371-76.
13. Rinaldo P, Welch RD, Previs SF, Schmidt-Sommerfeld E, Gargus JJ, O'Shea 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.
14. 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. 477-494.
15. Hegre CS, Halenz DR, Lane MD. The enzymatic carboxylation of butyryl-coenzyme A. *J Am Chem Soc* 1959; 81:6526-27.
16. 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(4):619-27.
17. Christensen E, Brandt NJ, Schmalbruch H, Kamieniecka Z, Hertz B, Ruitenbeek W. Muscle cytochrome C oxidase deficiency accompanied by a urinary organic acid pattern mimicking multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inher Metab Dis* 1993; 16:553-56.
18. García-Silva MT, Ribes A, Campos Y, Garavaglia B, Arenas J. Syndrome of encephalopathy, petechiae, and ethylmalonic aciduria. *Pediatr Neurol* 1997; 17(2):165-70.
19. Tanaka K, Kean EA, Johnson B. Jamaican vomiting sickness: Biochemical investigation of two cases. *New Engl J Med* 1976; 295:461-67.
20. Gregersen N, Andresen BS, Corydon MJ, Corydon TJ, Olsen RK, Bolund L, et al. Mutation analysis in mitochondrial fatty acid oxidation defects: Exemplified by acyl-CoA dehydrogenase deficiencies, with special focus on genotype-phenotype relationship. *Hum Mutat* 2001; 18(3):169-89.
21. 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; 17:11126-133.
22. Corydon MJ, Gregersen N, Lehnert W, Ribes A, Rinaldo P, Kmoch S, et al. Ethylmalonic aciduria is associated with an amino acid variant of short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase. *Pediatr Res* 1996; 39: 1059-1966.
23. Sweetman L, Williams JC. Branched chain organic acidurias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS (eds). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. Chapter 93. 8th. New York: McGraw Hill; 2001.
24. Osorio JH, Pourfarzam M. Early diagnosis of neurometabolic diseases by tandem mass spectrometry. Acylcarnitine profile from cord blood. *Rev Neurol* 2004; 38: 111-16.
25. Osorio JH, García F, Sánchez A. First report for 625G>A polymorphism in the short-chain acyl-coa dehydrogenase gen in South America. *J Inher Metab Dis* 2005; 28 Supl 1:109.