



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**ELEVADA MORTALIDAD Y DISCAPACIDAD  
EN NIÑOS MEXICANOS CON ENFERMEDAD  
DE ORINA CON OLOR A JARABE DE ARCE  
(EOJA)**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA FARMACEUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA:  
CYNTHIA FERNÁNDEZ LAINEZ**



**EXAMENES PROFESIONALES 2008  
MÉXICO, D.F. FAC. DE QUIMICA**



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 AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE QUIMICA**

**ELEVADA MORTALIDAD Y DISCAPACIDAD EN NIÑOS  
MEXICANOS CON ENFERMEDAD DE ORINA CON OLOR  
A JARABE DE ARCE (EOJA)**

**TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA FARMACEUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA:  
CYNTHIA FERNÁNDEZ LAINEZ**

**MÉXICO D.F.**

**2008**

**JURADO ASIGNADO:**

Presidente: Alicia Beatriz Cervantes Peredo

Vocal: Jesús Fernando Montiel Aguirre

Secretario: Isabel Ibarra González

1er. Suplente: Sobeida Sánchez Nieto

2do. Suplente: María Benita Leonor Fernández Salgado

**Sitio en donde se desarrolló el tema:** UNIDAD DE GENÉTICA DE LA NUTRICIÓN DEL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA SS – INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS UNAM.

**Asesor del tema:**

M. en C. Isabel Cristina Ibarra González

**Sustentante:**

Cynthia Fernández Lainez

*El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir.....*

*Albert Einstein*

*Solamente una vida dedicada a los demás merece ser vivida.....*

*Albert Einstein*

## DEDICATORIA:

A Dios por permitirme concluir esta etapa de mi vida, espero que me permitas ejercer esta carrera con el único fin de ser instrumento de servicio a tí.

A mis padres por hacer de mí una persona dispuesta a servir a los demás y por brindarme las herramientas para ello.

A mis hermanas por apoyarme siempre.

A Tana: Gracias por tu amor, tu paciencia y tu apoyo, espero compartir contigo este y todos los logros que Dios me permita tener.

A mis amigas Anita y Evelina por todos los momentos que compartimos, por su confianza y su amistad.

A mi asesora Isabel por brindarme su confianza, paciencia y por todas sus enseñanzas.

## **AGRADECIMIENTOS**

- Al Dr. Silvestre Frenk por sus comentarios y sugerencias realizados a este trabajo.
- A las Doctoras Marcela Vela Amieva y Leticia Belmont Martínez por por su valioso apoyo y gran aportación a este trabajo de tesis.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
----------------	----------

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>2</b>
---------------------	----------

## **Errores Innatos del Metabolismo**

### **Aminoacidopatías**

#### Aminoácidos Ramificados

- Defectos en el metabolismo

#### Enfermedad de Orina con Olor a Jarabe de Arce

- Fenotipos Clínicos
- Metabolismo de los aminoácidos ramificados
- Rutas de degradación
- Complejo enzimático deshidrogenasa de  $\alpha$ -cetoácidos de cadena ramificada
- Mecanismos de neurotoxicidad
- Prevalencia de la enfermedad
- Métodos de diagnóstico
- Opciones de tratamiento



<b>OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>32</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>40</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>49</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>56</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>57</b>
<b>ANEXO 1</b>	<b>67</b>
<b>ANEXO 2</b>	<b>68</b>

## **RESUMEN**

**Introducción:** La enfermedad de jarabe de arce (EOJA) es una enfermedad genética que produce crisis de cetoacidosis y deterioro neurológico progresivo que llevan al coma fatal. El inicio del tratamiento temprano es determinante en el pronóstico.

**Objetivo:** Describir las características de una cohorte de pacientes mexicanos con EOJA.

**Metodología:** Análisis retrospectivo de casos de EOJA de 1991 a 2006.

**Resultados:** Encontramos 36 pacientes (16 niñas / 20 niños), tres fueron detectados mediante tamiz neonatal, uno de ellos realizado en México y dos en el extranjero. Estos dos últimos recibieron tratamiento oportuno y exhiben desarrollo psicomotor normal. El caso detectado neonatalmente en México, no recibió tratamiento adecuado y falleció. Los otros 33 pacientes se diagnosticaron entre 2 y 73 meses de edad mediante tamiz metabólico (postsintomático) ante la sospecha clínica. Todos los pacientes sintomáticos presentaron positiva la prueba de dinitrofenilhidrazina, aminoácidos ramificados plasmáticos elevados y  $\alpha$ -cetoácidos ramificados urinarios elevados. La hipotonía, rechazo al alimento y crisis convulsivas fueron los signos más frecuentes. La mortalidad de esta cohorte fue de 50% (18/36) y de los sobrevivientes 83.3% (15/18) muestran actualmente retraso psicomotor.

**Conclusiones:** Es necesario establecer en México un modelo de atención integral para la EOJA, que incluya la detección presintomática preventiva, tratamiento temprano, seguimiento y asesoramiento genético.

## INTRODUCCIÓN

### *ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO (EIM)*

Los EIM son trastornos genéticos causados por mutaciones que resultan en actividad nula o deficiente de una enzima o transportador lo que causa un bloqueo en la ruta metabólica implicada<sup>1</sup>.

El modo de herencia en la mayoría de estas enfermedades (98%) es autosómico recesivo, también puede ser autosómico dominante o ligado al cromosoma X<sup>2</sup>.

Aunque estas enfermedades comúnmente son llamadas “raras” (frecuencia en la población igual o menor de 5 casos por cada 10,000 habitantes)<sup>3</sup> por su baja frecuencia individual en la población, al considerarlas en conjunto dejan de ser tan poco comunes. Se sabe que 1 de cada 1000 neonatos vivos nace con un EIM<sup>4</sup>.

Los síntomas clínicos que presentan los pacientes con algún EIM pueden ser explicados por la acumulación de sustrato (a nivel plasmático o intracelular), deficiencia de producto o por alteraciones en la concentración de metabolitos de vías colaterales a la del bloqueo<sup>5</sup>.

Existen diferentes formas de clasificación de los EIM. La descrita por Saudubray<sup>6</sup> los clasifica en 3 grupos en función de su patofisiología y para su

abordaje diagnóstico. En el grupo 1 incluye los desórdenes del metabolismo intermediario que dan origen a intoxicación por acumulación de compuestos tóxicos próximos al bloqueo metabólico, en él se encuentran las acidemias orgánicas, aminoacidopatías, defectos del ciclo de la urea e intolerancia a los azúcares que dan lugar a una intoxicación aguda o crónica. El grupo 2 comprende las enfermedades del metabolismo intermediario debidas a defectos en hígado, miocardio, músculos y cerebro, que afectan los procesos energéticos citoplasmáticos, se presentan predominantemente con hipoglucemia e involucran la glucólisis, gluconeogénesis, glucogenolisis, hiperinsulinismos, desórdenes de la oxidación de ácidos grasos y las acidemias lácticas congénitas. El grupo 3 involucra los desórdenes que afectan la síntesis o catabolismo de moléculas complejas en organelos celulares e incluye los padecimientos por atesoramiento lisosomal, peroxisomal, defectos en la glicosilación y síntesis de colesterol.

En las últimas décadas, gracias a los avances tecnológicos, un número importante de EIM pertenecientes a los grupos 1 y 2 se pueden detectar de manera presintomática en los primeros días de vida mediante el tamiz neonatal ampliado (TNA)<sup>7</sup>. Esta última estrategia ha logrado modificar su historia natural, de manera tal que ahora en muchos países desarrollados los afectados casi nunca rebasan el horizonte clínico y se mantienen metabólicamente controlados, gracias a la instalación oportuna y permanente del tratamiento específico<sup>8, 9</sup>. El estándar de oro para la detección oportuna de estas enfermedades es el TNA por espectrometría de masas en tándem

(MS/MS), que mide de manera precisa y simultánea los aminoácidos, ácidos orgánicos y acilcarnitinas en muestras de sangre seca en papel filtro<sup>10</sup>.

Los resultados que muestran que el neonato es sospechoso para algún EIM deben ser confirmados por métodos enzimáticos o cuantificación de los biomarcadores de la enfermedad en líquidos biológicos<sup>11</sup>.

El tratamiento de estos desórdenes consiste en una dieta cuidadosamente regulada que proporcione los nutrientes esenciales para garantizar el crecimiento y desarrollo sin exceder la capacidad de degradación enzimática del paciente, consta de restricción de sustrato, suplemento de metabolitos deficientes y/o megadosis de coenzima<sup>12</sup>. Dicho tratamiento debe ser prescrito por un equipo metabólico con experiencia en la administración de fórmulas metabólicas especiales.

### *AMINOACIDOPATÍAS*

Los aminoácidos presentes en los fluidos biológicos son producto de un sistema de transporte y metabolismo de las proteínas. Los niveles de aminoácidos libres representan el balance entre la utilización de aminoácidos por los tejidos y el catabolismo tanto de las proteínas de la dieta como de las proteínas corporales, así como el producto de la biosíntesis de otros intermediarios, dichos niveles presentan poca variación de día a día, entre persona y persona, cuando se trata de individuos sin problemas de nutrición,

por lo tanto los cambios del perfil de aminoácidos son indicadores importantes de una gran variedad de condiciones fisiológicas y patológicas<sup>5</sup>.

Los EIM que alteran las vías metabólicas de los aminoácidos causan un grupo de desórdenes conocidos como aminoacidopatías, en las que existe alteración en la concentración fisiológica de estas moléculas, la aparición de síntomas clínicos es muy variada debido a la bioquímica de los diferentes aminoácidos<sup>13</sup>.

Algunas aminoacidopatías se presentan en el periodo neonatal y son consideradas emergencias pediátricas debido a los efectos que causan. Ejemplo de éstas son la fenilcetonuria, citrulinemia, tirosinemia y la enfermedad de orina con olor a jarabe de arce (EOJA). La detección temprana de estas enfermedades en el neonato es fundamental para prevenir el daño irreversible y atenuar la severidad de las manifestaciones clínicas<sup>14, 15</sup>.

El diagnóstico y seguimiento de los trastornos del metabolismo de los aminoácidos está basado en la detección y cuantificación simultánea de estos biomarcadores en los diferentes líquidos biológicos, principalmente en plasma, orina y líquido cefalorraquídeo<sup>13</sup>.

Para lograr este objetivo se requiere de métodos que permitan la separación del perfil de aminoácidos en un periodo corto de tiempo. Además, se debe

considerar el empleo de volúmenes pequeños de muestra, debido a la pequeña cantidad de sangre que puede ser extraída de un neonato<sup>14</sup>.

Existen varios métodos para detección y cuantificación de aminoácidos, entre ellos se encuentra la electroforesis capilar, la espectrometría de masas en tándem y los métodos cromatográficos acoplados a diferentes sistemas de detección como la cromatografía en capa fina, cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)<sup>13, 14, 16, 17, 18</sup>.

La técnica de CLAR ha resultado ser de gran utilidad debido a que se ha minimizado el tiempo de análisis de las muestras, además de ser una herramienta que acoplada a un adecuado sistema de detección, brinda los parámetros de precisión, exactitud, alta sensibilidad y especificidad necesarios para llevar a cabo el análisis utilizando pequeñas cantidades de muestra en el orden de microlitros<sup>17</sup>. Siendo el sistema de detección por fluorescencia el más sensible y recomendable<sup>14</sup>.

En la técnica de CLAR se emplea un sistema de separación en fase reversa acoplado a un sistema de detección por fluorescencia<sup>19</sup>. La técnica se basa en la extracción de los aminoácidos libres en plasma y derivatización de los mismos. Debido a que no tienen la propiedad de fluorescer; se hacen reaccionar con un compuesto fluorescente, el o-ftaldialdehído (OPA)<sup>20</sup>. La reacción química que se lleva a cabo se muestra en la figura 1:

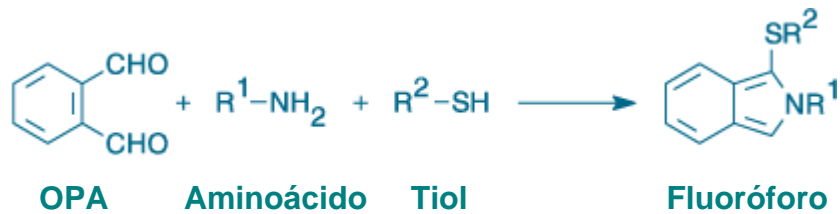


Fig. 1. Formación de 1-alkiltiol-2-alkylisoindol por reacción de OPA con aminas primarias<sup>21</sup>.

Las aminoacidopatías son muy variadas en sus fundamentos bioquímicos, en sus manifestaciones, en la severidad de sus cuadros y en sus tratamientos. El presente trabajo solo aborda la enfermedad de orina con olor a jarabe de arce.

### *AMINOÁCIDOS RAMIFICADOS*

Los aminoácidos leucina, isoleucina y valina se clasifican como aminoácidos de cadena ramificada (BCAA). Son aminoácidos esenciales, alifáticos, neutros, que contienen un grupo metilo ramificado en su grupo R. Constituyen cerca del 35% de los aminoácidos esenciales en el músculo y 40% de los aminoácidos esenciales requeridos por los mamíferos<sup>22</sup>.



## *DEFECTOS EN EL METABOLISMO DE LOS AMINOÁCIDOS RAMIFICADOS*

Los defectos genéticos que afectan la ruta del metabolismo de los aminoácidos ramificados causan 10 desórdenes metabólicos conocidos como acidurias de cadena ramificada entre las que se encuentra la enfermedad de orina con olor a jarabe de arce o cetoaciduria de cadena ramificada (OMIM 248600)<sup>23, 24</sup>.

### *ENFERMEDAD DE ORINA CON OLOR A JARABE DE ARCE*

La EOJA es un desorden metabólico de tipo autosómico recesivo del catabolismo de los aminoácidos ramificados<sup>12</sup>.

Esta enfermedad es causada por la actividad deficiente del complejo enzimático deshidrogenasa de  $\alpha$ -cetoácidos de cadena ramificada (BCKD) que cataliza la descarboxilación oxidativa de los  $\alpha$ -cetoácidos de cadena ramificada (BCKA), derivados de la transaminación de los aminoácidos ramificados<sup>22</sup>.

El bloqueo metabólico a nivel del BCKD resulta en la incapacidad para degradar los BCAA y sus BCKA lo que provoca que éstos se acumulen en diversos fluidos biológicos como la orina y la sangre. Los niveles elevados de

BCAA y sus correspondientes BCKA producen severas consecuencias clínicas incluyendo cetoacidosis fatal, retraso mental, y daño neurológico progresivo<sup>25</sup>.

Snyderman y colaboradores (1962) observaron por primera vez la presencia de aloisoleucina en los pacientes con EOJA y su ausencia en pacientes control, lo que indica que la aloisoleucina es un biomarcador patognomónico para EOJA<sup>26</sup>.

La enfermedad fue descrita por primera vez por Menkes y colaboradores en 1954 como un síndrome que padecían 4 hermanos, los cuales presentaban disfunción cerebral infantil progresiva asociada a un olor inusual en la orina parecido a miel de arce<sup>27</sup>. En 1957, Westall y colaboradores encontraron que los niveles de leucina, isoleucina y valina de un paciente se encontraban importantemente elevados<sup>28</sup>. Más tarde, se encontró en la orina de estos pacientes una excreción masiva de los cetoácidos de estos aminoácidos<sup>29</sup>. La presencia de estos cetoácidos en la orina de los pacientes dio la pauta para que Dancis y colaboradores (1960) identificaran el bloqueo metabólico en EOJA<sup>30</sup>. En este experimento, se incubaron leucocitos de niños sanos y de un paciente con EOJA con los BCAA marcados con (1 – C<sup>14</sup>). Tanto las células de los niños sanos como las del paciente fueron capaces de convertir los BCAA a sus correspondientes BCKA. Sin embargo, las células del paciente no fueron capaces de descarboxilar a los BCKA, lo cual fue medido por la producción de CO<sub>2</sub> radioactivo. Estos resultados, establecieron por

primera vez, que el bloqueo metabólico en EOJA es a nivel de la descarboxilación de los BCKA y no en la transaminación de los BCAA. La acumulación de estos compuestos parecía inducir cetoacidosis, desorden neurológico y retraso en el desarrollo de estos pacientes<sup>11</sup>.

### *FENOTIPOS CLÍNICOS*

Con base en las características clínicas y bioquímicas como la edad de inicio de los síntomas, actividad enzimática residual del complejo BCKD y respuesta a dosis de tiamina, la EOJA se divide en 5 fenotipos: clásica, intermedia, intermitente, respondedora a tiamina y deficiente de E3<sup>11</sup>.

La forma clásica es la más severa y común de los 5 fenotipos y se manifiesta entre el 4° y 7° día de vida extrauterina caracterizándose por alimentación pobre, letargia, convulsiones y cetoacidosis, acompañada de signos neurológicos progresivos que van desde letargo hasta coma fatal en pacientes no tratados. La padecen el 75% de los pacientes con EOJA y presentan una actividad enzimática residual de entre 0% y 2%. La forma intermedia está asociada a retraso mental progresivo y retraso en el desarrollo, sin antecedentes de enfermedad catastrófica, los pacientes que la presentan tienen una actividad enzimática residual de 3% a 30%. En la forma intermitente los pacientes presentan niveles normales de BCAA así como inteligencia y desarrollo normales, hasta que una situación de estrés como una infección, precipita una descompensación metabólica con cetoacidosis.

La actividad enzimática residual del complejo BCKD de estos pacientes se encuentra entre 5 y 20%. La forma respondedora a tiamina es similar a la intermedia pero responde a dosis farmacológicas de tiamina con la consecuente normalización de los niveles de los BCAA, los pacientes con esta forma de la enfermedad presentan una actividad enzimática residual de 2% a 40%. La forma deficiente de E3 es causada por defectos en el componente E3 del complejo BCKD, la dihidrolipoamida deshidrogenasa, los pacientes con esta forma de la enfermedad presentan, acidosis láctica severa además de elevación de piruvato y  $\alpha$ -cetoglutarato, con una actividad enzimática del complejo BCKD que va de 0% a 25%. Estos pacientes tienen una deficiencia combinada de los complejos BCKD, deshidrogenasa de piruvato y deshidrogenasa de  $\alpha$ -cetoglutarato puesto que comparten la subunidad E3<sup>11, 31, 32, 33</sup>.

### *METABOLISMO DE LOS AMINOÁCIDOS RAMIFICADOS*

El destino de los esqueletos de carbono de los BCAA incluye incorporación a proteínas y degradación oxidativa en la mitocondria. Los BCAA se metabolizan en el músculo esquelético como fuente de energía alternativa, también son oxidados en riñones, corazón, tejido adiposo, y cerebro. En hígado los BCKA derivados de los BCAA se catabolizan para producir cuerpos cetónicos y succinil – CoA. El tejido adiposo y el músculo utilizan el Acetil-CoA producido de la leucina para la síntesis de ácidos grasos de

cadena larga y colesterol. La leucina también parece tener un importante papel en la promoción de la síntesis de proteínas, inhibiendo su degradación y estimulando la secreción de insulina<sup>11, 22</sup>.

### *RUTAS DE DEGRADACIÓN*

La oxidación de los BCAA comienza por su transporte al interior de la célula a través de un sistema de transporte dependiente de sodio en la membrana plasmática. En la célula, inicialmente sufren tres reacciones comunes: transaminación, descarboxilación oxidativa y deshidrogenación<sup>11</sup> (fig. 2). La reacción de transaminación es catalizada por las aminotransferasas de los BCAA (BCAT), las cuales pueden ser citosólicas o mitocondriales, para producir los BCKA. Los BCKA comprenden los ácidos  $\alpha$ -cetoisocapróico (KIC),  $\alpha$ -ceto- $\beta$ -metilvalérico (KMV) y  $\alpha$ -cetoisovalérico (KIV), que son derivados de la leucina, isoleucina y valina respectivamente. Los BCKA citosólicos son transportados a través de la membrana mitocondrial por el transportador de BCKA por el cual compiten<sup>34</sup>. Este último está regulado por el pH externo y el de la matriz mitocondrial. El segundo paso, la descarboxilación oxidativa de los BCKA, es catalizado por el complejo mitocondrial enzimático BCKD<sup>22</sup>. Los productos de reacción del KIC, KMV y KIV son isovaleril-CoA,  $\alpha$ -metilbutiril-CoA e isobutiril-CoA, respectivamente. Estos acil CoA de cadena ramificada sufren posteriormente una última reacción en común: deshidrogenación por Acil-CoA deshidrogenasas

específicas. La deshidrogenación de isovaleril-CoA es catalizada por la isovaleril-CoA deshidrogenasa y la de  $\alpha$ -metilbutiril-CoA e isobutiril-CoA por la deshidrogenasa de  $\alpha$ -metil acil-CoA de cadena ramificada. Después de esto, la ruta degradativa de cada BCKA diverge. La leucina produce acetil-CoA y acetoacetato como productos finales, y es, por lo tanto, un aminoácido cetogénico. La valina produce succinil-CoA, y es, por consiguiente, un aminoácido glucogénico. La succinil-CoA entra al ciclo de Krebs, y es convertida en glucosa por la ruta de la gluconeogénesis. La isoleucina es lipogénica y glucogénica debido a que se metaboliza a acetil-CoA y succinil CoA<sup>11</sup>.

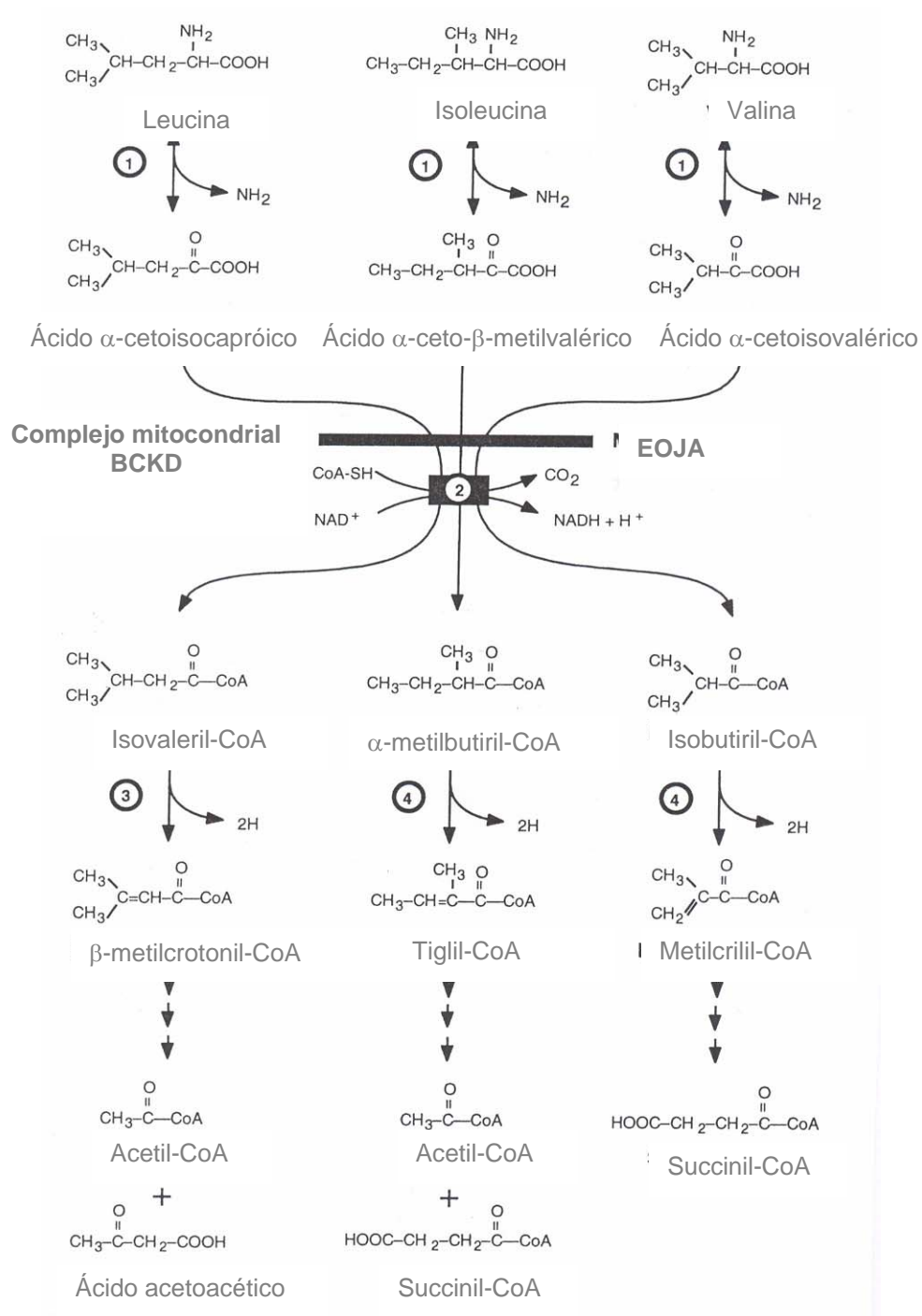


Fig. 2. Ruta catabólica de los aminoácidos ramificados. 1. Aminotransferasas de aminoácidos de cadena ramificada; 2. Complejo enzimático BCKD; 3. Isovaleril Co-A deshidrogenasa; 4. Deshidrogenasa de  $\alpha$ -metil acil-CoA de cadena ramificada<sup>22</sup>.

## *COMPLEJO ENZIMÁTICO DESHIDROGENASA DE $\alpha$ - CETOÁCIDOS DE CADENA RAMIFICADA*

### *ORGANIZACIÓN MACROMOLECULAR.*

El BCKD tiene un peso aproximado de  $4 \times 10^6$  daltones (fig. 3). Se encuentra organizado alrededor de un núcleo cúbico, formado por 24 copias del componente E2, con actividad de dihidrolipoil transacilasa al que se encuentran unidas mediante interacciones iónicas, 12 copias del componente E1 con actividad de descarboxilasa, tiamin-difosfato dependiente, que está constituido por dos subunidades E1 $\alpha$  y dos E1 $\beta$ ; 6 copias del componente E3 que es una flavoproteína homodimérica, con actividad de dihidrolipoamida deshidrogenasa; adicionalmente forman parte de este complejo enzimático una cinasa y una fosfatasa específicas que son responsables de regular la actividad del complejo BCKD por un ciclo reversible de fosforilación(inactivación)/desfosforilación(activación)<sup>22, 35, 36</sup>



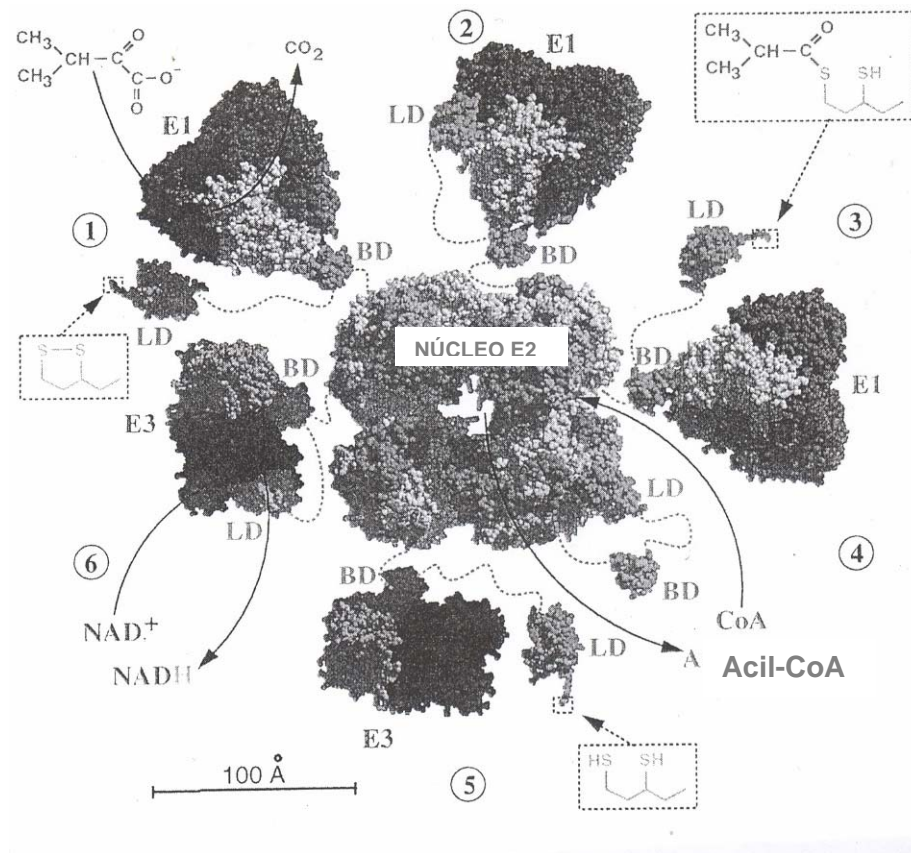


Fig. 6. Organización estructural y reacciones de cada uno de los componentes del complejo BCKD humano<sup>22</sup>.

## BIOLOGÍA MOLECULAR

Excepto la fosfatasa, todos los genes que codifican para las subunidades del complejo BCKD han sido clonados, y gracias a estos cDNA, las secuencias de aminoácidos se han deducido, lo que facilita el estudio de los dominios y las funciones de las subunidades<sup>22</sup> (Cuadro 1).

Cuadro 1. Genes del complejo enzimático BCKD y sus productos<sup>37, 38, 39, 40, 41</sup>

Gen	Localización	Longitud (kb)	Nº. exones	Subunidad	Aminoácidos (proteína precursora)	Masa Molecular (Daltones)
BCKDHA	19q13.1 – q13.2	55	9	E1 $\alpha$	445	46, 500
BCKDHB	6p21 – p22	100	11	E1 $\beta$	392	37, 200
DBT	1p31	68	11	E2	477	46, 500
DLD	7q31-q32	20	20	E3	509	55, 000

Se han descrito mutaciones en las cuatro diferentes subunidades catalíticas del complejo BCKD (E1 $\alpha$ , E1 $\beta$ , E2 y E3) en pacientes con EOJA. Con base en la subunidad afectada, la EOJA se puede clasificar en 6 subtipos genéticos<sup>22</sup>. La EOJA tipo IA que afecta la subunidad E1 $\alpha$ <sup>31</sup>, la EOJA tipo IB que afecta la subunidad E1 $\beta$ <sup>36</sup>, el tipo II que afecta la subunidad E2<sup>41</sup> y el tipo III que afecta la subunidad E3. Los tipos IV y V, están reservados para los tipos de EOJA en que estén afectadas la cinasa y la fosfatasa, respectivamente. Excepto por el tipo II, que está asociado a la respuesta con tiamina, no se ha demostrado una gran correlación entre un subtipo genético específico y un fenotipo clínico particular<sup>31</sup>.

La mayoría de las mutaciones que se han descrito hasta el año 2007 en los genes del complejo BCKD afectan los *loci* E1 $\alpha$ , E1 $\beta$  y E2<sup>22, 33, 42</sup>.

*Mutaciones en EOJA tipo IA.*

Se han reportado 53 mutaciones que afectan la subunidad E1 $\alpha$  (Cuadro 2), el 90% de éstas son mutaciones sin sentido. Con algunas excepciones, las mutaciones tipo IA causan la forma clásica de EOJA. El tipo de mutación que prevalece es la Y393N que fue detectada originalmente en un paciente italiano<sup>22</sup>. Posteriormente se observó que este alelo mutado está presente en los pacientes homocigotos de la población Amish de Pensilvania en donde la enfermedad presenta la mayor incidencia<sup>43, 44</sup>.

Cuadro 2. Mutaciones en el gen BCKDHA

<b>MUTACIONES PUNTUALES DE SENTIDO ERRONEO/SIN SENTIDO</b>	
<b>Cambio de aminoácido</b>	<b>Referencia</b>
P39H	Henneke M et. al. 2003
M64T	Chuang J. et al 2000
Q80E	Dursan et. al. 2002
T106M	Dursan et. al. 2002
R114W	Nobukuni Y. et.al. 1993
T121N	Danner et. al. 1998
R122Q	Danner et. al. 1998
Q145K	Nobukuni Y. et.al. 1993
R159W	Nobukuni Y. et.al. 1993
T166M	Chuang J. et al 2000
I168T	Danner et. al. 1998
G204S	Chuang J. et al 1995
A208T	Nobukuni Y. et.al. 1993
A209T	Nobukuni Y. et.al. 1993
A216V	Rodríguez P. et. al. 2006
A220V	Rodríguez P. et. al. 2006
R220W	Chuang J. et al 1995
N222S	Chuang J. et al 1995
A328T	Flaschker et. al. 2007
A240P	Chuang J. et al 1995
R242X	Chinsky J. et al. 1998
G245R	Chuang J. et al 1995
R252H	Chuang J. et al 2000
A253T	Nobukuni Y. et. al. 1993
T265R	Chuang J. et al 1995
R269X	Nellis et. al. 2003
I281T	Nobukuni Y. et.al. 1993
G283N	Rodríguez P. et. al. 2006
A285P	Wynn et. al. 1998
G290R	Chuang J. et al 1995
R297C	Rodríguez P. et. al. 2006
G300S	Rodríguez P. et. al. 2006
N302A	Rodríguez P. et. al. 2006
R314X	Rodríguez P. et. al. 2006
E327K	Rodríguez P. et. al. 2006
A328T	Flaschker et. al. 2007
R346H	Rodríguez P. et. al. 2006
F364C	Chuang J. et al 1995
V367M	Henneke M et. al. 2003
Y368C	Chuang J. et.al. 1994
Y393N	Mastuda I. et. al. 1990
N411fs	Rodríguez P. et. al. 2006
V412M	Henneke M et. al. 2003

Cuadro 2 continuación

<b>MUTACIONES POR DELECIÓN</b>	
<b>Delección</b>	<b>Referencia</b>
IVS5 -1gc (delex6)	Chuang J. et al 2000
117 del C	Rodríguez P. et. al. 2006
538 del C	Chuang J. et al 2000
647 853del exon 6	Rodríguez P. et. al. 2006
887 del 8	Chuang J. et al 1994
1233delC1242_1243ins27	Rodríguez P. et. al. 2006
A383del	Danner D. et. al. 1998

<b>MUTACIONES POR INSERCIÓN</b>	
<b>Inserción</b>	<b>Referencia</b>
144 ins C	Chiang J. et al 2000
174insC	Chiang J. et al 1994
117dupC	Chiang J. et al 1994

*Mutaciones en EOJA tipo IB.*

Se han reportado 53 mutaciones que afectan la subunidad E1 $\beta$  (Cuadro 3), más frecuente es la E163X reportada por Rodríguez-Pombo en el año 2006<sup>42</sup>.

**Cuadro 3. Mutaciones en el gen BCKDHB.**

<b>MUTACIONES PUNTUALES DE SENTIDO ERRÓNEO/SIN SENTIDO</b>	
<b>Cambio de aminoácido</b>	<b>Referencia</b>
G85R	Henneke M et. al. 2003
A87V	Nellis et. al. 2003
G109K	Henneke M et. al. 2003
R111X	Flaschker et. al. 2007
P123L	Flaschker et. al. 2007
N126Y	Mc Conell B. et. al. 1997
V130G	Flaschker et. al. 2007
R133P	Edelman et. al. 2001
G135R	Henneke M et. al. 2003
V139N	Nellis et. al. 2003
H156R	Nobukuni Y. et.al. 1993
Q159K	Henneke M et. al. 2003
E163X	Rodríguez P. et. al. 2006
R168H	Henneke M et. al. 2003
G172W	Rodríguez P. et. al. 2006
K191X	Henneke M et. al. 2003
P200A	Flaschker et. al. 2007
V201A	Nellis et. al. 2001
I214K	Rodríguez P. et. al. 2006
R216G	Rodríguez P. et. al. 2006
Q217X	Nellis et. al. 2003
Q222R	Henneke M et. al. 2003
W227C	Nellis et. al. 2004
G228S	Edelman et. al. 2001
R235X	Henneke M et. al. 2003
Q241X	Henneke M et. al. 2003
Y244H	Flaschker et. al. 2007
V251A	Nellis et. al. 2001
Q267X	Nellis et. al. 2003
R274X	Mc Conell B. et. al. 1997
G278S	Edelman et. al. 2001
V283A	Flaschker et. al. 2007
R285X	Henneke M et. al. 2003
E290K	Nellis et. al. 2003
E322X	Edelman et. al. 2001
Y333X	Nellis et. al. 2001
Y383X	Nellis et. al. 2001

Cuadro 3 continuación.

<b>MUTACIONES QUE AFECTAN REMOCIÓN DE INTRONES</b>	
<b>Sustitución</b>	<b>Referencia</b>
IVS3-1G-A	Dursun et. al. 2002
IVS5+1G-T	Hayashida et. al. 1994

<b>MUTACIONES POR DELECIÓN</b>	
<b>Delección</b>	<b>Referencia</b>
92 del 11	Nobukuni Y. et.al. 1991
348delA	Rodríguez P. et. al. 2006
389_391delTTG	Rodríguez P. et. al. 2006
595_596delAG	Henneke M et. al. 2003
808_821del	Flaschker et. al. 2007
937delG	Henneke M et. al. 2003
954 del T	Nobukuni Y. et.al. 1993
Ex1del11bp	Nobukuni Y. et.al. 1991
Ex3delG326	Nellis M. et. al. 2003
IVS5 -1G → T	Hayshida Y. et. al. 1994

<b>MUTACIONES POR INSERCIÓN</b>	
<b>Inserción</b>	<b>Referencia</b>
52 ins G	Nobukuni Y. et.al. 1993
163insACTT	Henneke M et. al. 2003
92_102dup11	Rodríguez P. et. al. 2006
163_166dupACTT	Henneke M et. al. 2003

*Mutaciones en EOJA tipo II.*

Actualmente se conocen 51 mutaciones en el componente E2 del complejo BCKD (Cuadro 4). La mutación F215C es una de las prevalentes en los alelos de la población francesa canadiense y otros grupos étnicos<sup>44</sup>.

Cuadro 4. Mutaciones en el gen DBT.

<b>MUTACIONES PUNTUALES DE SENTIDO ERRÓNEO/ SIN SENTIDO</b>	
<b>Cambio de aminoácido</b>	<b>Referencia</b>
I37M	Tsuruta M. et. al. 1998
P73L	Chuang J. et al 2000
P73R	Chuang J. et al 2000
D76Y	Chuang J. et al 2000
G132R	Fisher et. al. 1993
I77T	Chiang D. et. al. 1991
E163X	Fisher C. et. al. 1998
F215C	Fisher C. et. al. 1991
R230G	Chuang J. et al 2000
R240C	Chuang J. et. al. 1997
K252N	Chuang J. et. al. 1997
M263T	Rodríguez P. et. al. 2006
H281T	Chuang J. et al 2000
H281N	Nellis et.al. 2003
G292R	Chuang J. et al 2000
F276C	Fisher et. al. 1991
F307S	Flaschker et. al. 2007
G323S	Tsuruta M. et. al. 1998
I368N	Henneke M et. al. 2003
G384S	Tsuruta M. et. al. 1998
V385M	Henneke M et. al. 2003
R401P	Nellis et.al. 2001
X422L	Tsuruta M. et. al. 1998
I429N	Henneke M et. al. 2003
A450N	Rodríguez P. et. al. 2006
R462P	Rodríguez P. et. al. 2006
V466M	Henneke M et. al. 2003

<b>MUTACIONES TIPO SPLICING</b>	
<b>Sustitución</b>	<b>Referencia</b>
IVS7-1G-A	Henneke M et. al. 2003
IVS8-700A-G	Tsuruta M. et. al. 1998
IVS8 del +1g	Mitsubuchi H. et. al. 1991
IVS9-7A-G	Fisher C. et. al. 1991
IVS10 del (-9: +1)	Chuang J. et. al. 1997



Cuadro 4 continuación

<b>MUTACIONES POR DELECIÓN</b>	
<b>Delección</b>	<b>Referencia</b>
E27del	Chuang D. et. al. 1991
34-157del	Hering W. et. al. 1991
75_76delAT	Henneke M et. al. 2003
90 del AT	Fisher C. et. al. 1993
354del7	Chuang J. et al 2000
501 del AC	Chuang J. et al 2000
747_773del	Flaschker et. al. 2007
764_760del	Rodríguez P. et. al. 2006
925_1003del78bp	Mitsubuchi H. et. al. 1991
940_1G>A	Henneke M et. al. 2003
124bp nt.34-157	Hering W. et. al. 1991
15-20kb delAlu	Hering W. et. al. 1992
3.2kb del .incl. Intr. 4	Chuang J. et. al. 1997
IVS4del(-3.2kb: -14)	Fisher C. et. al. 1991
IVS4del(-15: -4)	Chuang J. et. al. 1997
IVS4del(-1: +1)	Chuang J. et. al. 1997
IVS97A-G	Chuang J. et. al. 1997
IVS10del [-9:+1]	Chuang J. et. al. 1997
4.7kb, Alu +L1, IVS10-3'UTR	Chi 2003

*Mutaciones en EOJA tipo III.*

Se han reportado 14 mutaciones en el gen del componente E3 (Cuadro 5).

La mutación más frecuente es la G229C, detectada en población judía Ashkenazi, reportada por Shaag y colaboradores en el año 1999<sup>45</sup>.

Cuadro 5. Mutaciones en el gen DLD.

<b>MUTACIONES PUNTUALES DE SENTIDO ERRÓNEO / SIN SENTIDO</b>	
<b>Cambio de aminoácido</b>	<b>Referencia</b>
Y35X	Hong Y. et. Al. 1996
K37Q	Liu et. Al. 1993
K37E	Liu T. et. Al. 1993
G194C	ái A. et. Al. 1999
G229C	ái A. et. Al. 1999
M326V	Cerna et. Al. 2001
Q340K	Hong Y. et. Al. 1997
I358T	Grafakou et. Al. 2003
N444V	Aín et Al. 1999
R447G	Odievre et. Al. 2005
P453L	Liu T. et. Al. 1993
R460G	Hong Y. et. Al. 1996

<b>MUTACIONES EN INTRONES</b>	
<b>Sustitución</b>	<b>Referencia</b>
IVS9+1G-A	Grafakou et. Al. 2003

<b>MUTACIONES POR DELECCIÓN</b>	
<b>Delección</b>	<b>Referencia</b>
455_457delAGG	Hong y. et. al. 1997

## MECANISMOS DE NEUROTOXICIDAD

La EOJA es un trastorno que causa daño neurológico progresivo. Algunos de los hallazgos neuropatológicos de la enfermedad son edema cerebral, atrofia de los hemisferios cerebrales, degeneración esponjosa de la materia blanca y desmielinización<sup>22</sup>.

Aunque los mecanismos de neurotoxicidad parecen ser múltiples y aún son pobremente conocidos, en los últimos años, se han propuesto varios mecanismos que explican el daño neurológico de esta enfermedad.

Se considera que la leucina y su cetoácido, el ácido  $\alpha$ -cetoisocapróico, son los principales metabolitos neurotóxicos, debido a que la aparición de síntomas neurológicos está asociada al incremento en la concentración de estos compuestos en líquidos biológicos, en pacientes que no han sido tratados o aquellos que presentan descompensación metabólica<sup>46</sup>.

Los mecanismos de neurotoxicidad por acumulación de leucina y su cetoácido en el sistema nervioso central (SNC) propuestos hasta el año 2007 incluyen la alteración en el metabolismo energético por desequilibrio en las rutas de biosíntesis de neurotransmisores como el glutamato, aspartato y ácido  $\gamma$ -aminobutírico, mecanismo propuesto por Tavares y colaboradores<sup>47</sup>.

La disminución de la captación de aminoácidos esenciales por el SNC debido a la competencia por el transportador membranal de dichos aminoácidos y los aminoácidos ramificados, es otro de los mecanismos de neurotoxicidad que han sido propuestos<sup>48</sup>.

El daño neuronal causado por inducción de estrés oxidativo debido a sobreproducción de radicales libres, aumento en la peroxidación de lípidos y

reducción de defensas antioxidantes de tipo no enzimático, es uno de los mecanismos de reciente publicación, propuesto por el Dr. Wajner Moacir y colaboradores, como producto de sus investigaciones en cerebro de rata<sup>46</sup>.

## PREVALENCIA DE LA ENFERMEDAD

No existe consenso en el mundo sobre la prevalencia al nacimiento de este trastorno pero se estima cercana a 1:100,000 recién nacidos<sup>22, 49</sup>, sin embargo, en la población Amish de Pensilvania la prevalencia es de 1:176 recién nacidos<sup>22, 50</sup>.

## MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Además de la cuantificación de aminoácidos plasmáticos, para realizar el diagnóstico de la enfermedad, se requieren otras pruebas de laboratorio que son la detección de  $\alpha$ -cetoácidos urinarios de cadena ramificada mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CGEM) y la prueba de dinitrofenilhidrazina (DNPH) para determinar la presencia de  $\alpha$ -cetoácidos urinarios<sup>1, 19</sup>.

La técnica de CGEM se basa en la extracción de los ácidos orgánicos de la orina utilizando el método de extracción por disolventes, la formación de sus derivados oximados por reacción con hidroxilamina<sup>51</sup> (Fig. 4); su derivatización a compuestos volátiles por reacción con trimetilsilil-trifluoroacetamida + trimetilsilano<sup>52</sup> y su análisis mediante CGEM<sup>53</sup>.

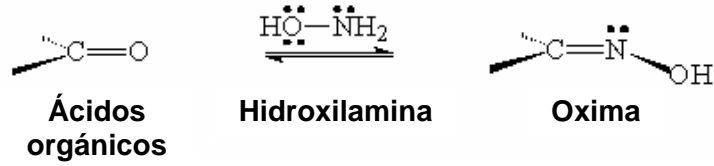


Fig. 4. Formación de la oxima de un ácido orgánico<sup>51</sup>.

La prueba de DNPH se basa en la formación de hidrazonas (precipitado amarillo) mediante la reacción en medio ácido de la dinitrofenilhidrazina con  $\alpha$ -cetoácidos<sup>19</sup> (Fig. 5).

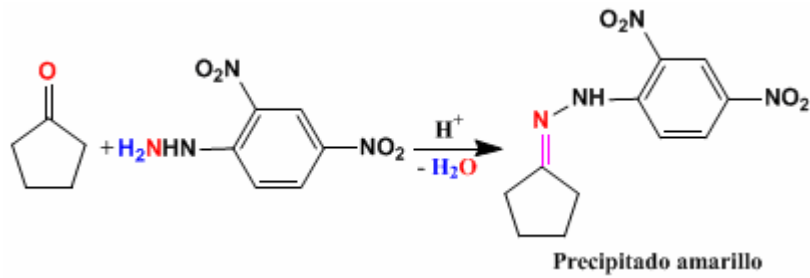


Fig. 5. Obtención de una hidrazona a partir de la reacción de dinitrofenilhidrazina con un  $\alpha$ -cetoácido<sup>54</sup>.

## TRATAMIENTO

El tratamiento de seguimiento crónico consiste en la implementación de una dieta que permita normalizar las concentraciones de BCAA limitando la ingesta de estos aminoácidos y a la vez proporcionando el aporte protéico adecuado para mantener el crecimiento y desarrollo<sup>22</sup>. También es importante suplementar con tiamina (vitamina B<sub>1</sub>), entre 50-300 mg/día,

cuando menos por 3 semanas, dado que dicha vitamina es el cofactor del complejo BCKD y para algunos pacientes es terapéutico (fenotipo respondedor a la tiamina), pues logra restablecer el metabolismo de los aminoácidos ramificados, y no tiene efectos adversos conocidos<sup>11</sup>.

Se ha encontrado que de los tres aminoácidos ramificados, la leucina provoca el daño neurológico que causa esta enfermedad<sup>22, 50, 55, 56</sup>.

Para evitar el daño neurológico por intoxicación con leucina es importante suplementar con isoleucina y valina debido a que estos aminoácidos compiten con la leucina por el transportador membranal de aminoácidos neutros en los diferentes órganos incluyendo el cerebro. Se debe administrar solución de cloruro de sodio para mantener valores altos de osmolaridad y evitar que se presente edema cerebral hiponatrémico<sup>50</sup>. Algunos pacientes han sido sometidos con éxito a trasplante hepático<sup>57, 58</sup>.

En los casos de una crisis con deterioro de la función cerebral debido a una marcada acumulación de BCKA y sus cetoácidos, se necesita proporcionar un tratamiento agresivo o agudo, el cual consiste en la destoxificación mediante diálisis y hemodiálisis, se retiran las proteínas de la dieta y su subsecuente ingesta se restringe utilizando el monitoreo de los BCAA como herramienta para el ajuste de su aporte. La suplementación con aminoácidos es necesaria para evitar estados de deficiencia, en especial se aumenta la dosis de valina e isoleucina para favorecer la competencia por el transportador membranal durante esta fase en la que la concentración sérica

de leucina es alta, así como la suplementación con solución salina hipertónica, manitol y furosemida para mantener concentraciones séricas de sodio dentro del intervalo normal y evitar edema cerebral<sup>32, 50, 59, 60</sup>.

La edad del diagnóstico y el subsiguiente control metabólico son determinantes en el pronóstico de los pacientes con EOJA, esto es, mientras más temprano sea el inicio y más estricto el apego al tratamiento, mejor será la evolución. En los países desarrollados estos pacientes han alcanzado la vida adulta con desarrollo psicomotor normal<sup>59, 61</sup>.

Varios autores han demostrado que la evolución de los pacientes con EOJA es más favorable en los países que detectan de manera oportuna los casos mediante TNA<sup>12, 22, 49, 61</sup>. Morton y colaboradores en Pensilvania (2002), han demostrado que los niños afectados con EOJA pueden tener una vida de calidad, con un mínimo de internamientos y coeficiente intelectual prácticamente normal, siempre y cuando inicien su tratamiento en la primera semana de vida<sup>50</sup>.

En México, la historia es diferente: los niños con EOJA no son detectados a tiempo puesto que el tamiz neonatal obligatorio únicamente incluye al hipotiroidismo congénito<sup>62</sup>, y sólo unos cuantos niños que nacen en hospitales privados tienen acceso al TNA para EIM<sup>63</sup>.

## **OBJETIVO GENERAL**

Describir las características clínicas y bioquímicas de una cohorte de pacientes mexicanos con EOJA.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Cuantificar los aminoácidos plasmáticos mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de muestras de suero de pacientes con sospecha de padecer EOJA.
- Determinar la presencia de  $\alpha$ -cetoácidos de cadena ramificada mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en muestras de pacientes con sospecha de padecer EOJA.
- Realizar la identificación de  $\alpha$ -cetoácidos urinarios mediante la prueba de DNPH en muestras de pacientes con sospecha de padecer EOJA.



## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

Estudio descriptivo, observacional y transversal.

Población de Estudio.

Se incluyeron todos los pacientes con diagnóstico de EOJA del archivo histórico de la Unidad de Genética de la Nutrición (UGN) hasta el año 2006.

Procedimiento

Se registraron los siguientes parámetros: tipo de prueba metabólica aplicada que llevó al diagnóstico: TNA (detección presintomática o temprana) o tamiz metabólico (detección sintomática), así como las principales características clínicas y bioquímicas a través de la cuantificación de los aminoácidos ramificados plasmáticos por HPLC, detección de  $\alpha$ -cetoácidos de cadena ramificada mediante CGEM y la presencia de  $\alpha$ -cetoácidos urinarios mediante la prueba de DNPH.

A los padres se les aplicó un cuestionario con las siguientes cuatro preguntas: ¿Le practicaron a su hijo el TNA para EOJA?, ¿a qué edad usted (es) notaron que su hijo tenía alguna anormalidad y cuál fue?, ¿qué hicieron ustedes ante esos datos anormales?, y ¿qué hizo su médico?

## *CUANTIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS PLASMÁTICOS MEDIANTE CLAR.*

### Reactivos:

- solución de p-fluorofenilalanina 20  $\mu$ M grado reactivo en metanol (estándar interno)
- metanol grado HPLC
- solución sobresaturada de ácido bórico pH=9
- o-ftaldialdehído (OPA) 0.146mM en metanol: etanetiol; 98:2 (solución derivatizante)
- tetrahidrofurano grado HPLC
- acetonitrilo grado HPLC
- fosfato monobásico de sodio monohidratado, grado reactivo
- fosfato dibásico de sodio anhidro, grado reactivo
- filtros de nylon con poro de 0.05 $\mu$ m

Todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma (St. Luis, MO, EUA) excepto por el metanol, tetrahidrofurano y acetonitrilo (Caledon, Ont. Canadá), filtros de nylon (Titán, TN, EUA).

### Equipo

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución marca Waters modelo 2690

Detector de fluorescencia marca Waters modelo 474

Fase estacionaria: Columna Phenomenex Kingsorb C18 de 150 x 4.6mm con un diámetro interno de 3  $\mu\text{m}$ .

La detección de los aminoácidos se realizó a una longitud de onda de excitación de 338nm y una longitud de onda de emisión de 425nm.

#### Procesamiento de la muestra

A una alícuota de 50  $\mu\text{L}$  de plasma se le adicionó 1 mL de solución de estándar interno para precipitar las proteínas, se centrifugó por 10 min a 10,000 rpm a 4°C, se filtró utilizando filtros de nylon con poro de 0.05 $\mu\text{m}$ , posteriormente se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante y se les agregaron 20  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora de boratos y 20  $\mu\text{L}$  de solución derivatizante, se utilizaron 10  $\mu\text{L}$  de volumen de inyección.

#### Condiciones cromatográficas

##### Fase Móvil.

Disolvente A. Amortiguador de fosfatos 0.02mM (pH 7.0): tetrahidrofurano: agua; 91: 5: 4.

Disolvente B. Amortiguador de fosfatos 0.02mM (pH 7.0): acetonitrilo: agua; 40: 5: 55.

Condiciones de Gradiente:

TIEMPO (min)	FLUJO (mL/min)	% A	% B
Inicial	1.3	78	22
30	1.3	50	50
38	1.3	37	63
39	1.3	0	100
46	1.3	0	100
48	1.3	78	22

Temperatura de la columna: 45°C

Temperatura de la muestra: 4°C

*DETECCIÓN DE  $\alpha$ -CETOÁCIDOS DE CADENA RAMIFICADA URINARIOS  
MEDIANTE CGEM.*

Reactivos:

- ácido dodecanedióico 2mM (98% de pureza) en metanol grado HPLC (estándar interno)
- hidrocloreuro de o-(2, 3, 4, 5, 6- pentafluorobencil) – hidroxilamina grado reactivo
- solución de hidróxido de sodio 3N grado reactivo
- ácido clorhídrico concentrado (37%) grado reactivo
- solución sobresaturada de cloruro de sodio grado reactivo

- acetato de etilo grado HPLC
- solución de hidróxido de sodio 0.05 M en metanol grado HPLC
- bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida + 1% trimetilclorosilano (BSTFA + TMS) grado reactivo

Todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma (St. Luis, MO, EUA), excepto por ácido clorhídrico (J.T.Baker, Edo. Mex. Mex.), acetato de etilo (Caledon, Ont. Canadá) y BSTFA + TMS (Regis, IL, USA)

## Equipo

Cromatógrafo de gases marca Agilent modelo 6890N.

Espectrómetro de masas marca Agilent modelo 5973.

Fase estacionaria: Columna capilar J & W modelo 1225532 DB-5MS, de (5% fenil)- metilpolisiloxano de 30m x 0.250mm de diámetro x 0.25µm de espesor de película.

Fase móvil: Gas Helio de ultra alta pureza.

## Procesamiento de la muestra:

Debido a que los valores de concentración de ácidos orgánicos urinarios se reportan, por convención internacional, en unidades de mmol/mol de creatinina, previo a su extracción, debe determinarse la concentración de creatinina de la orina<sup>64</sup>.

La determinación de creatinina se realizó mediante el método de Jaffe<sup>65</sup>. La orina se hace reaccionar con picrato de sodio para obtener un compuesto que da coloración amarilla, cuya absorbancia se lee a 520 nm en un espectrofotómetro. Para obtener la concentración de creatinina urinaria, se relaciona la absorbancia de una dilución de creatinina de concentración conocida, con la absorbancia de la orina.

Para llevar a cabo la determinación de ácidos orgánicos urinarios mediante CGEM es necesario que las muestras de orina tengan una concentración de metabolitos homogénea<sup>64</sup>, para ello se toma como metabolito de referencia a la creatinina. Se toma el volumen necesario de orina que contenga una concentración de creatinina de 0.06 mg/ml de acuerdo al siguiente cálculo:

$$\begin{aligned} & \mathbf{[0.06 \text{ mg creatinina / concentración de creatinina (mg/mL)]}^*} \\ & \mathbf{(1000\mu\text{L}/1\text{mL}) = \mu\text{L de orina que tienen una concentración de creatinina}} \\ & \mathbf{0.06\text{mg/mL.}} \end{aligned}$$

A la orina se le adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de solución de estándar interno 2 mM + 5 mg de hidrocloreuro de o-(2, 3, 4, 5, 6- pentafluorobencil) - hidroxilamina para obtener un compuesto derivado oximado de los ácidos orgánicos, posteriormente estos derivados se extrajeron por duplicado utilizando acetato de etilo. El disolvente se eliminó por evaporación en una campana de extracción por 12 horas. Se llevó a cabo la reacción de formación de los

derivados volátiles de los ácidos orgánicos mediante la adición de 100  $\mu\text{L}$  de BSTFA + TMS a las muestras secas. Se realizó una dilución 1:4. Se inyectó 1  $\mu\text{L}$  en el cromatógrafo de gases para su análisis.

Condiciones cromatográficas:

Programa de temperatura: La temperatura inicial de la columna es de 40°C por 5 min, temperatura final de 280°C por 2 min., velocidad de calentamiento 10°C por min.

Temperatura del inyector: 250°C

Temperatura de la línea de transferencia: 280°C

Temperatura de la fuente de ionización: 150°C

Tipo de inyección: Total (Splitless)

Se realiza un monitoreo total de iones ("scan") en el intervalo m/z de 45 a 650.

*IDENTIFICACIÓN DE  $\alpha$ -CETOÁCIDOS URINARIOS MEDIANTE LA PRUEBA DE DNPH.*

Reactivos

- ❖ solución de 2,4-dinitrofenilhidrazina al 2.8% en HCl 1N
- ❖ ácido 2,4- $\alpha$ -cetoglutarico 7mM

Todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma (St. Luis, MO, EUA).

Se preparan las siguientes mezclas:

Reactivo	Blanco	Estándar	Muestra
Agua	1 mL		
Ac- 2,4- $\alpha$ -cetoglutarico		1 mL	
Orina			1 mL
DNPH	1 mL	1 mL	1 mL

Interpretación. La formación de un precipitado lechoso color amarillo parecido al del estándar indica presencia de  $\alpha$ -cetoácidos urinarios.



## RESULTADOS.

Encontramos 36 pacientes, 16 niñas y 20 niños, provenientes de 35 familias (1 familia tuvo 2 hijos afectados). Se documentó consanguinidad en 11/35 familias. Todos los productos fueron de término y los embarazos se desarrollaron sin eventualidades. El 21.2% de los pacientes fueron originarios del Estado de México, seguido de Guanajuato (12.1%), Michoacán y Sinaloa (9% cada uno).

En 3 casos la enfermedad se diagnosticó mediante TNA (1 estudio se realizó en México en un laboratorio privado y 2 en EUA), estos 2 últimos niños recibieron tratamiento en dicho país dentro de los primeros 15 días de vida y posteriormente por cambio de residencia, acudieron a nuestra institución; actualmente tienen 4 y 11 años de edad, continúan en tratamiento estricto y su neuro-desarrollo es normal. El caso detectado en México, a pesar del resultado positivo del tamiz neonatal, no recibió tratamiento adecuado (fue tratado con dieta hipoprotéica no cuantificada y con largos periodos de ayuno) y fue trasladado a nuestra institución con diagnóstico de EOJA, desnutrición y sepsis, falleciendo a los 3 meses de vida por choque séptico causado por *Pseudomonas aeruginosa*.

Los otros 33 pacientes se diagnosticaron mediante el tamiz metabólico, ante la sospecha clínica de EIM. El 100% de los pacientes presentaron una excreción elevada de  $\alpha$ -cetoácidos (prueba de DNPH urinaria positiva).

La edad promedio al momento del diagnóstico fue de 247 días (14 días a 73 meses).

En la figura 6 se muestra un cromatograma característico de un paciente con EOJA.

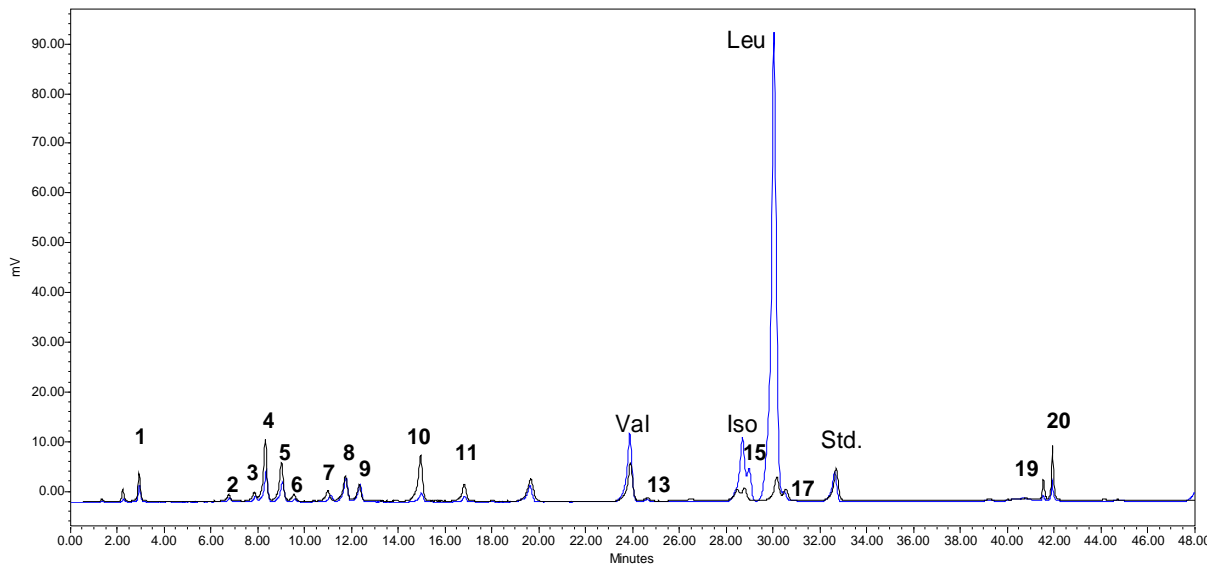


Fig 6. Superposición de un perfil de aminoácidos plasmáticos característico de un paciente con EOJA y uno normal. Se observa la elevación de aminoácidos ramificados en el paciente con EOJA en comparación con el cromatograma normal. Abreviaturas: 1: Ácido glutámico, 2: Asparagina, 3: Histidina, 4: Glutamina, 5: Serina, 6: Citrulina, 7: Arginina, 8: Serina, 9: Treonina, 10: Alanina, 11: Tirosina, 13: Metionina, 15: Triptofano, 17: Fenilalanina, 19: Ornitina, 20: Lisisna.

La media de las concentraciones iniciales de los aminoácidos ramificados (n=23) cuantificados mediante CLAR, fue: valina 635  $\mu\text{mol/l}$  (valor de referencia: 86-190  $\mu\text{mol/l}$ ), isoleucina 556  $\mu\text{mol/l}$  (valor de referencia: 26-91  $\mu\text{mol/l}$ ) y leucina 2747  $\mu\text{mol/l}$  (valor de referencia: 48-160  $\mu\text{mol/l}$ ) (Figura 7). No contamos con datos de los pacientes que fueron diagnosticados antes del año 1992, ni de aquéllos diagnosticados en otras instituciones.

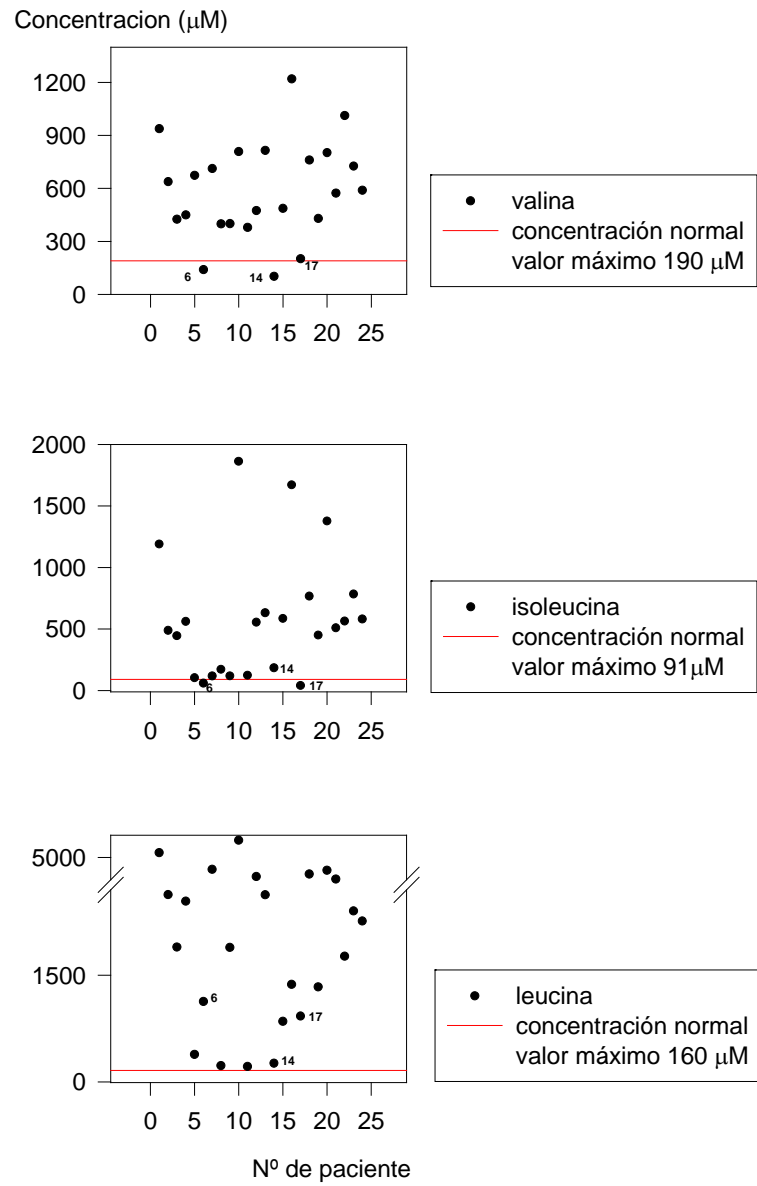


Fig. 7. Concentración de aminoácidos ramificados al momento del diagnóstico.

En la figura 7 llama la atención que los pacientes 6 y 14 presentaron concentraciones de valina dentro de límites normales, y que el paciente 17 presentó valores limítrofes de dicho aminoácido. Estos mismos pacientes (6 y 17) presentaron también niveles normales de isoleucina. La leucina se encontró elevada en todos los pacientes, sin excepción, y en promedio se encontró 17 veces por arriba del valor de referencia (Fig. 7).

El perfil urinario de ácidos orgánicos característico de un paciente con EOJA se puede observar en la figura 8:

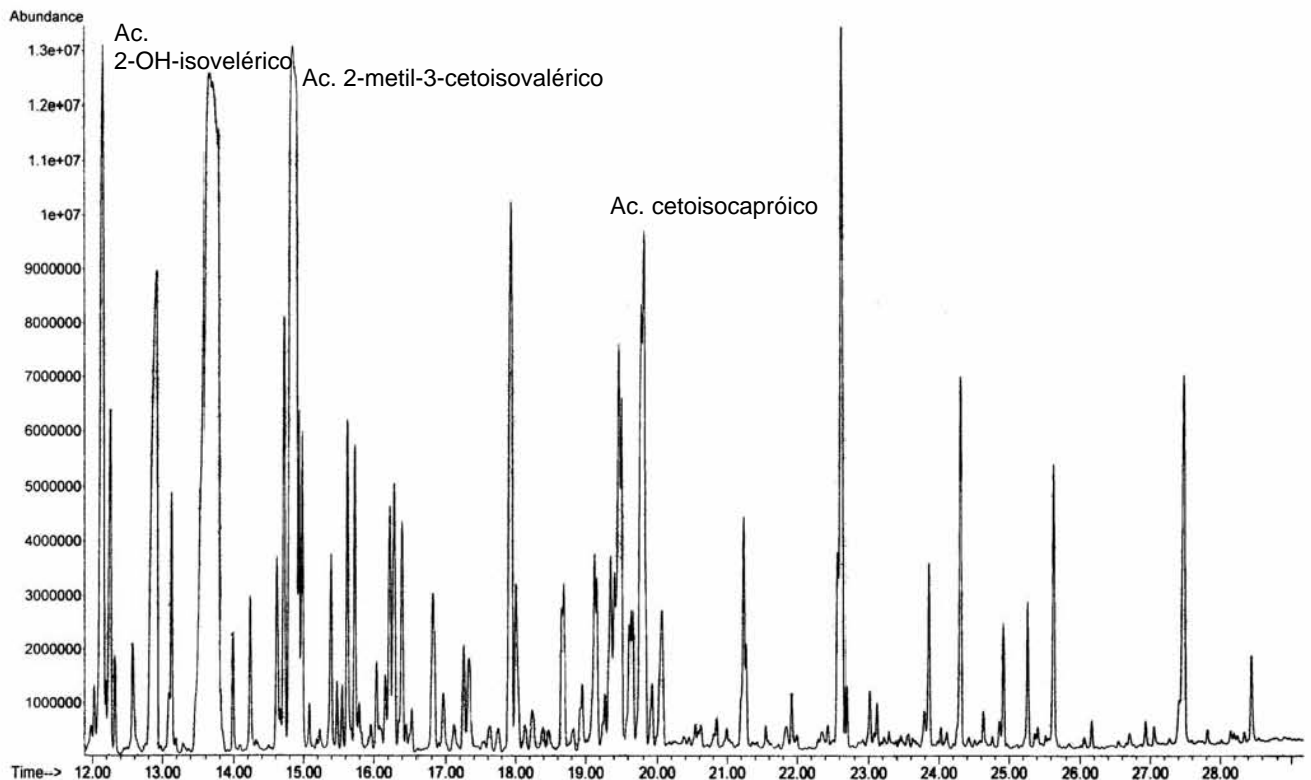


Fig. 8. Cromatograma de perfil de ácidos orgánicos urinarios mediante CGEM.

El cuestionario fue contestado únicamente por 23 padres. El 83% de ellos manifestó haber observado anomalías en sus hijos en la primera semana de vida, por lo que acudieron a consultar con algún médico. En el Cuadro 6 se detallan los signos y síntomas que se encontraron en los pacientes al momento del diagnóstico

Cuadro 6. Signos y síntomas presentes al momento del diagnóstico.

	Dato Clínico	N = 23
NEUROLÓGICOS	Hipotonía	17
	Crisis Convulsivas	13
	Irritabilidad	11
	Letargia	10
	Retraso Psicomotor	10
	Espasticidad	8
	Ataxia	3
DIGESTIVOS	Rechazo al alimento	14
	Vómito	12
	Diarrea	5
RESPIRATORIOS	Apneas	10
FALLA PARA CRECER	Retraso Estatural	8
	Retraso Ponderal	8
ALTERACIONES BIOQUÍMICAS	Acidosis	10
	Hiperamonemia	5
	Cetosis	4
	Hipoglicemia	2
Olor a jarabe de arce	Olor a jarabe de arce	11

En el Cuadro 7 se puede ver el perfil de los médicos que atendieron los casos de forma inicial.

Cuadro 7. Tipo de médico que tuvo el primer contacto con los pacientes de EOJA.

Tipo de médico (n=23)	Tipo de institución		Tipo de localidad	
	Pública	Privada	Urbana	Rural
Médico general 8	7	1	6	2
Médico familiar 5	5	0	5	0
Pediatra 10	9	1	8	2

El 12.5% de los médicos a los que acudieron los padres subestimaron los síntomas considerándolos normales, el 69% prescribió tratamiento sintomático inespecífico (anti-reflujo, cólico, y/o antibiótico), y sólo el 18.5 % sospechó un trastorno metabólico (Cuadro 8).

Cuadro 8. Respuesta de los médicos ante la primera consulta de los padres con un hijo afectado por EOJA

Subestimó los síntomas y/o los consideró normales	3/23 (12.5%)
Dio tratamiento sintomático sin diagnóstico preciso (antirreflujo, cólicos, antibióticos)	16/23 (69%)
Sospechó trastorno metabólico y decidió hacer estudios tamiz metabólico y/o cuantificación de aminoácidos	4/23 (18.5%)

En la figura 9 se observa el intervalo entre el inicio de los síntomas y el diagnóstico de certeza, mismo que tuvo una media de 240 días (con un mínimo de 9 días y un máximo de 73 meses).

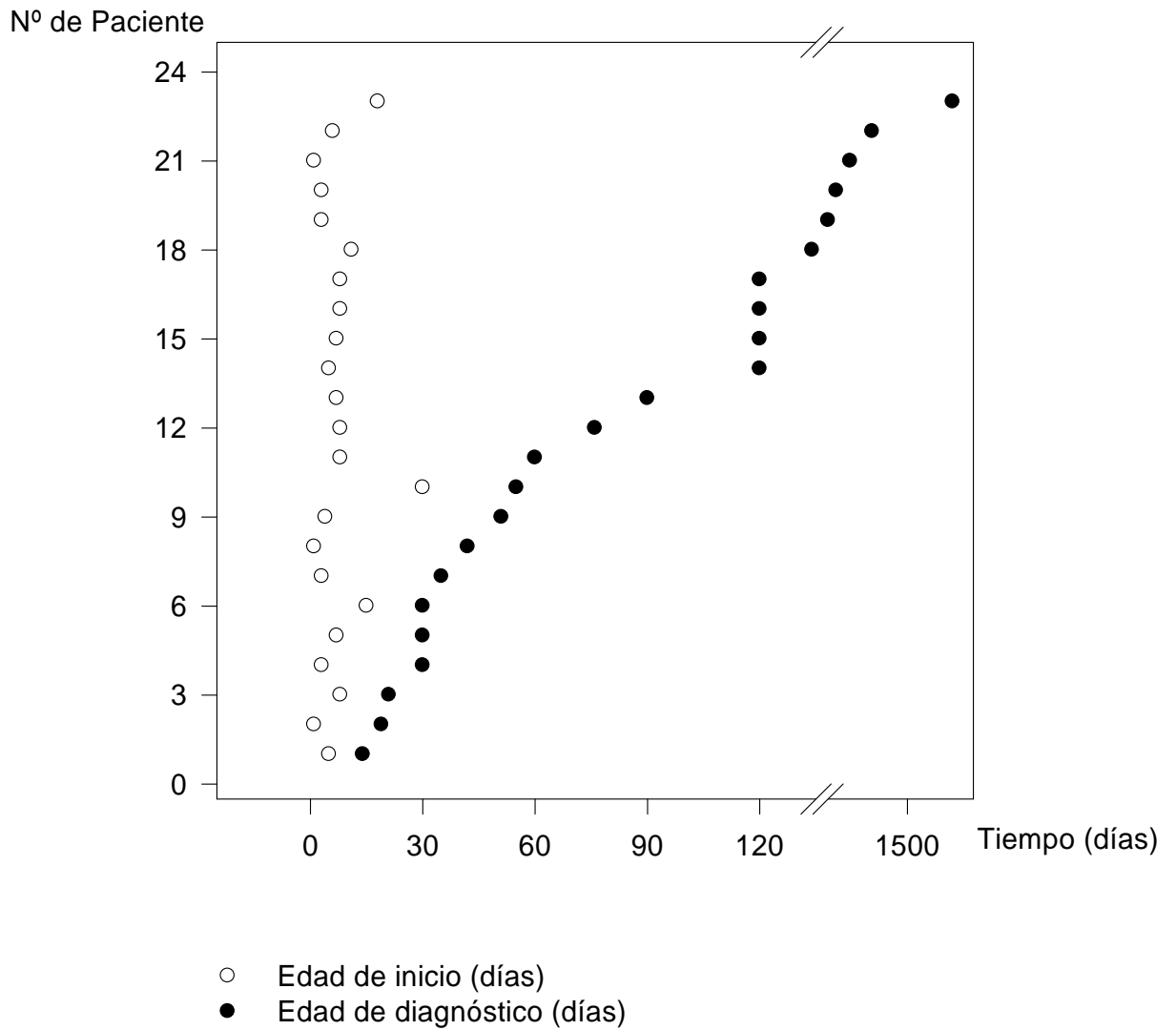


Fig. 9. Edad de inicio de padecimiento y edad al momento del diagnóstico.



De los 33 pacientes con diagnóstico tardío, 17 fallecieron (51.5%). De los 16 casos sobrevivientes 15 (94%) tienen actualmente retraso psicomotor de moderado a grave (Cuadro 9).

Cuadro 9. Cohorte de pacientes mexicanos con EOJA.

Paciente	SEXO	Edad de Inicio de síntomas	Edad al Dx.	Edad actual	Vivo	RPM	Procedencia
1	M	3d	10m	20a	Si	Si	Guanajuato
2	F	sd	12m	11a	Si	SI	Durango
3	F	6d	2a 8m	5a	Si	Si	Guerrero
4	F	3d	1m		No		Aguascalientes
5	M	15d	1m		No		Puebla
6	F	3d	35d		No		Sonora
7	F	16h	1m 12d		No		Quintana Roo
8	M	sd	6m		No		Tamaulipas
9	M	18d	6a	9a	Si	Si	Guanajuato
10	M	8d	21d	6a	Si	Si	Edo. Mex.
11	F	8d	2m 16d		No		Edo. Mex.
12	M	sd	3m		No		sd
13	M	4d	1m 21d	1a8m	Si	Si	Guanajuato
14	M	Nac.	1a 9m	7a	Si	Si	D.F
15	F	8d	2m	16a	Si	Si	Sinaloa
16	M	7d	1m		No		Sinaloa
17	F	asintomática	6d	12a	Si	No	Oaxaca
18	M	11d	4m 14d	16a	Si	Si	Edo. Mex.
19	M	1m	1m 25d	3a	Si	Si	Edo. Mex.
20	M	sd	4m 15d	4a	Si	Si	Honduras
21	F	1a6m	1a 8m	11a	Si	Si	Hidalgo
22	F	1d	19d		No		Michoacán
23	F	23	19d		No		Veracruz
24	M	8d	4m	9a	Si	Si	Nuevo león
25	M	sd	3a		No		Nuevo león
26	M	7d	3m		No		Edo. Mex.
27	M	asintomático	6d		No		Edo. Mex.
28	M	5d	14d		No		Sinaloa
29	M	3d	1a 2m		No		Michoacán
30	F	7 d	4m		No		Tabasco
31	M	sd	9a	35a	Si	No	Guanajuato
32	F	asintomática	3d	4a	Si	No	San Luis Potosí
33	F	8d	4m	3a	Si	Si	Michoacán
34	M	sd	4a		No		sd
35	F	sd	2m		No		sd
36	F	5 d	4m	13a	Si	Si	Edo. Mex.

(sd= sin dato)

## DISCUSIÓN.

La amplia diversidad fenotípica encontrada en esta cohorte refleja la heterogeneidad genética de la enfermedad, que puede ser explicada por los loci que codifican el complejo BCKD; se han identificado las mutaciones en los diferentes fenotipos, y se sabe en general que una menor actividad enzimática está asociada con las formas más severas<sup>12, 22</sup>. Por otro lado, debido a que en la cohorte estudiada proviene de toda la República y no hay una mayoría en particular, no podemos hacer inferencias epidemiológicas mayores, dado el pequeño número de pacientes analizados.

Nuestros resultados señalan que en este grupo de pacientes el diagnóstico se realizó de manera tardía y que únicamente los que nacieron en el extranjero recibieron tratamiento oportuno (fig. 10).



Fig. 10. Paciente diagnosticada oportunamente (6 días) mediante TN, inició su tratamiento inmediatamente después del diagnóstico, actualmente tiene 12 años de edad y presenta desarrollo neurológico de acuerdo a su edad.

En la cohorte estudiada tenemos un paciente (No. 31, cuadro 9) que actualmente tiene 35 años de edad, no presenta retraso psicomotor y tiene una licenciatura en contaduría pública. Su historia clínica coincide con la forma intermitente de la enfermedad reportada en la literatura<sup>22</sup>. Se presentó en nuestra Unidad a los 9 años de edad con descompensación metabólica causada por un evento infeccioso. La madre del paciente refirió que antes de presentar este evento de estrés, el paciente se encontraba sano y sin haber presentado previamente ninguna enfermedad que ameritara atención hospitalaria, sin embargo, sí notaba un olor dulce en los fluidos biológicos del paciente. El desarrollo psicomotor del paciente era acorde a su edad cronológica, al cuantificar su perfil de aminoácidos se encontró marcada elevación de los aminoácidos ramificados, lo que llevó a realizar el diagnóstico de EOJA. Se instauró de inmediato el tratamiento dietético y el paciente fue dado de alta hospitalaria. Para las siguientes visitas de control, el paciente tenía los valores de aminoácidos ramificados dentro de los valores de referencia.

Llama la atención que cuando se interrogó a los padres que contestaron el cuestionario, éstos refieren haber notado síntomas de la enfermedad desde los primeros días de vida del recién nacido, en promedio desde los 6 días de vida. En 48% (11/23) de los casos, los padres refirieron haber percibido desde los primeros días de vida el olor dulzón característico a miel de arce y también refieren haberle mencionado a su médico o pediatra, desde la

primera consulta, la presencia de dicho olor extraño. Aparentemente ninguno de los médicos tomó en cuenta este dato de manera inicial.

Como se puede ver en la figura 9, existe un enorme intervalo desde el inicio de los síntomas hasta el momento del diagnóstico realizado en nuestra unidad, lo cual refleja la dificultad diagnóstica de esta enfermedad, e indirectamente señala la necesidad de implementar en nuestro país, a la brevedad, programas eficientes de detección presintomática (TNA), y capacitación para que los médicos sospechen este padecimiento y sepan cómo confirmarlo y tratarlo<sup>25</sup>. En este aspecto el químico juega un papel fundamental, puesto que el análisis bioquímico constituye la base del diagnóstico.

La mortalidad tan elevada encontrada en esta cohorte, en la que 1 de cada 2 pacientes con EOJA murió, así como la alta proporción de sobrevivientes que presentaron como secuela retraso psicomotor (83.3%), nos obliga a establecer estrategias preventivas que han sido exitosas en otros países<sup>25, 66, 67</sup>.

Resaltamos que la prueba de dinitrofenilhidrazina es un buen indicador de la enfermedad y es útil en los pacientes que ya tienen la descompensación metabólica, aguda o crónica. Esta prueba urinaria, dada su sencillez y bajo costo, debería estar disponible en todos los servicios de urgencias pediátricas y sería conveniente realizarla de manera rutinaria a todo aquel paciente pediátrico (especialmente si se trata de un recién nacido) que súbitamente inicia con trastornos del estado de conciencia, crisis convulsivas,

rechazo al alimento, vómito, trastornos respiratorios y acidosis metabólica que no tengan explicación.

En nuestro estudio encontramos que la cuantificación simultánea de aminoácidos ramificados en sangre es una herramienta útil para la confirmación diagnóstica de la EOJA, sin embargo dichos aminoácidos deben ser interpretados cuidadosamente, especialmente en los pacientes desnutridos, ya que en ocasiones pueden estar en límites normales, tal como sucedió en los pacientes 6, 14 y 17. Como una observación adicional encontramos que en 43.5% de los pacientes, los niveles de otros aminoácidos (diferentes a los ramificados) estaban por debajo de los límites normales, lo cual puede ser indicio de desnutrición; este fenómeno, seguramente fue secundario al manejo nutricional inicial inadecuado que se les practicó, al prescribirles dietas bajas en proteínas, sin contemplar que a estos pacientes únicamente se les deben restringir los aminoácidos ramificados y que necesitan recibir un aporte suficiente de proteínas para crecer y desarrollarse adecuadamente. Además estos pacientes, dado su estado crítico, frecuentemente son sometidos a ayunos prolongados, lo cual incrementa el catabolismo y agrava el cuadro metabólico. Se sabe que deficiencias prolongadas de aminoácidos esenciales causadas por una dieta restringida en proteínas causan pobre crecimiento, anemia y lesiones en la piel que hacen al paciente susceptible a infecciones, inmunodeficiencias, desmielinización y retraso global del crecimiento, fenómenos que pueden llegar a ser tan o más graves que el padecimiento original<sup>50, 55, 68</sup>.

En la figura 11 se muestra un ejemplo de las lesiones de la piel ocasionadas por deficiencia de isoleucina, que presentaron 6 pacientes de esta cohorte.



Fig11. Paciente diagnosticada tardíamente, presenta lesiones en la piel características de deficiencia de isoleucina.

Después del inicio del tratamiento, los pacientes se recuperan por completo de dichas lesiones, como se puede observar en la figura 12.



Fig. 12. Misma paciente después de inicio del tratamiento.

En México, el no incluir, de manera consensuada y equitativa, a los EIM (como la EOJA) en los programas nacionales de tamiz neonatal, aunado al pobre conocimiento que los médicos tienen sobre estas patologías, tiene como consecuencia a niños con discapacidad y muertes innecesarias. Estos pacientes con afecciones genéticas-metabólicas con diagnóstico y tratamiento tardíos, implican mayor gasto en hospitalizaciones repetidas, rehabilitación y tratamiento de secuelas crónicas<sup>50</sup>.

Morton y colaboradores (2002) calculan que el costo del internamiento inicial, con una estancia promedio de 14 días, para un neonato con EOJA descompensado, es de \$55,462 dólares<sup>50</sup>. En México no existe ningún estudio similar que calcule el costo de atención de dichos pacientes, sin embargo en nuestra experiencia sabemos que requieren hospitalizaciones frecuentes y prolongadas. Si consideramos que el costo día/cama en la Unidad de Terapia Intensiva del Instituto Nacional de Pediatría es de \$1,467 pesos (sin tomar en cuenta medicamentos, estudios de laboratorio y gabinete, valoraciones médicas, procedimientos, etc.), podemos decir que tan sólo el gasto de hospitalización de estos 33 niños fue aproximadamente de \$677,754 pesos, cantidad más que suficiente para implementar un sistema institucional de detección masiva de EOJA.

En nuestro país los pacientes con EIM no son diagnosticados oportunamente y dado que no existe un registro nacional eficiente de dichas patologías, no se visualiza su importancia epidemiológica, no se implementan medidas de Salud Pública (TNA), ni se previenen nuevos casos mediante la orientación

adecuada a las familias afectadas por medio del asesoramiento genético oportuno.

Además, dado que se les resta importancia a estas enfermedades, los médicos no reciben la preparación adecuada y no saben interpretar los resultados del TNA, no saben actuar ante un caso sospechoso, ni conocen la existencia de centros especializados de referencia para EIM (como el nuestro) para inicio de tratamiento.

Experiencias como la mostrada en este trabajo, indican la necesidad de implementar programas eficientes de atención integral para estos padecimientos genéticos, así como difundir la existencia de centros especializados en estos trastornos, entre todo el gremio médico.



## **CONCLUSIONES.**

A diferencia de los países desarrollados, la EOJA en México es un trastorno que se asocia con una elevada mortalidad. En esta cohorte todos los pacientes llegaron a nuestra institución en forma tardía y con graves secuelas neurológicas, excepto aquéllos a los que se les realizó el TNA en el extranjero y que recibieron tratamiento inmediato y el paciente con la forma intermitente de la enfermedad. Nuestro estudio señala que esta enfermedad puede ser detectada mediante la aplicación de la prueba de DNPH y la cuantificación de aminoácidos ramificados en sangre.

Es necesario establecer en México un modelo de atención integral para la EOJA, mismo que comprenda desde el tamiz neonatal ampliado hasta el seguimiento a largo plazo y el asesoramiento genético.

Este trabajo refleja la necesidad de sensibilizar y capacitar a médicos y autoridades en Salud Pública sobre la existencia de pacientes con EIM y su creciente importancia en la pediatría.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Vela M, Ibarra I, Velázquez A.** Guía para el diagnóstico de errores innatos del metabolismo. En: Programa de Actualización en Pediatría. Academia Mexicana de Pediatría (Ed.), Intersistemas, edición actualizada, Ciudad de México, México, 2005, pp 1087-1179.
2. **Jiménez-Sánchez G, Childs B, Valle D,** The Effect of mendelian disease on human health. En: The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. Scriver CR, Beaudet AL, Valle D (Eds.) McGraw-Hill Inc., 8a Edición, New York, EUA, 2001, pp 167-174.
3. Organización Europea para Enfermedades Raras. Disponible en: [www.eurodis.org](http://www.eurodis.org). Consultada: agosto 8, 2007.
4. **Enns GM, MB, ChB, Packman S.** Diagnosing inborn errors of metabolism in the newborn: Laboratory Investigations. Neo Reviews 2001; 8: c192-c199.
5. **Ibarra GI.** Extracción y cuantificación por cromatografía de líquidos de aminoácidos en muestras de sangre total colectada en papel filtro. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, 1995.
6. **Saudubray JM, Sedel F, Walter JH.** Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: An introduction. J Inherit Metab Dis 2006; 29: 261-274.
7. **Garg U, Dasouki M.** Expanded newborn screening of inherited metabolic disorders by tandem mass spectrometry: Clinical and laboratory aspects. Clin Biochem 2006; 39:315-332.

8. **Simon E, Wendel U, Schadewaldt P.** Maple syrup urine disease-treatment and outcome in patients of turkish descent in Germany. *Turk J Pediatr* 2005; 47: 8-13.
9. **Cederbaum S.** Phenylketonuria: an update. *Curr Opin Pediatr* 2002; 14:702-706.
10. **Zytkovicz TH, Fitzgerald EF, Marsden d, Larson CA, Shih VE, JohnsonDM, et al.** Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: A two-year summary from the New England newborn screening program. *Clin Chem* 2001; 47: 1945-1955.
11. **Chuang DT, Chuang JL, Wynn RM.** Lessons from genetic disorders of branched-chain amino acid metabolism. *J Nutr* 2006; 136 (1 Suppl):243S-249S.
12. **Kaye CI, Committee on Genetics; Accurso F, La Franchi S, Lane PA, Hope N, et al.** Newborn screening fact sheets. *Pediatrics* 2006; 118: 934-963.
13. **Piraud M, Vianey-Saban C, Petritis K, Elfakir C, Steghens JP, Morios A, et al.** ESI-MS/MS analysis of underivatized amino acids: a new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acid metabolism. Fragmentation study of 79 molecules of biological interest in positive and negative ionisation mode. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2003; 17: 1298-1311.
14. **Veledo MT, de Frutos M, Díez-Masa JC.** On capillary derivatization and analysis of amino acids in human plasma by capillary

electrophoresis with laser-induced fluorescence detection: Application to diagnosis of aminoacidopathies. *Electrophoresis* 2006; 27: 3101-3107.

15. **Qu Y, Slocum RH, Fu J, Rasmussen WE, Rector HD, Miller JB, et al.** Quantitative amino acid analysis using a Beckman system gold HPLC 126AA analyzer. *Clinica Chimica Acta* 2001; 312: 153–162.
16. **Moeller SE.** Quantification of physiological amino acids by gradient ion-exchange high performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1993; 613: 223-230.
17. **Schwarz EL, Roberts WL, Pasquali M.** Analysis of plasma amino acids by HPLC with photodiode array and fluorescence detection. *Clinica Chimica Acta* 2005; 354: 83-90.
18. **Shen Z, Deng C, Wang B, Dong L.** Quantification of trimethylsilyl derivatives of amino acid disease biomarkers in neonatal blood samples by gas chromatography- mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2006; 384: 931-938.
19. **Velázquez A, Vela M, Ciceron I, Ibarra I, Pérez M, Olivarez Z, et al.** Diagnosis of inborn errors of metabolism. *Arch Med Res* 2000; 31: 145-150.
20. **Concha V, Torres J, Vivo G, García M.** A comparative study of the performance of acetonitrile and methanol in the multi-linear gradient separation of proteic primary amino acids. *Anal Chim Acta* 2007; 23;582:250-258.

- 21. Seiler N.** Fluorescent derivatives. En: Handbook of derivatives for chromatography. Blau K, Halket J (Eds.) John Wiley & Sons Inc., 2a edición, Londres, Reino Unido, 1993, pp 176-213.
- 22. Chuang DT, Shih VE.** Maple syrup urine disease (Branched-Chain Ketoaciduria). En: The metabolic and molecular basis of inherited disease. Scriver CR, Beaudet AL, Valle D (Eds.) McGraw-Hill Inc., 8a Edición, New York, EUA, 2001, pp 1991-1995.
- 23.** Centro Nacional de Información Biontecnológica. OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man [database]. Disponible en: [www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db\\_OMIM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db_OMIM). Consultada sept 18, 2006.
- 24. Sweetman L, Williams JC.** Branched chain organic acidurias. En: The metabolic and molecular basis of inherited disease. Scriver CR, Beaudet AL, Valle D (Eds.) McGraw-Hill Inc., 8a Edición, New York, EUA, 2001, pp 1991-1995.
- 25. Heldt K, Schwahn B, Marquardt I, Grotzke M, Wendel U.** Diagnosis of MSUD by newborn screening allows early intervention without extraneous detoxification. *Mol Genet Metab* 2005; 84: 313-316.
- 26. Schadewaldt P, Bodner A, Hammen H, Wendel U.** Significance of L-alloisoleucine in plasma for diagnosis of maple syrup urine disease. *Clin Chem* 1999; 45: 1734-1740.
- 27. Menkes JH, Hurst PL, Craig JM.** A new syndrome: progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance. *Pediatrics* 1954; 14: 462 – 467.

- 28. Westall RG, Dancis J, Miller S.** Maple syrup urine disease. *Am J Dis.* 1957; 94: 571.
- 29. Menkes J.** Maple syrup urine disease. Investigations into the metabolic defect. *Neurology* 1959; 9: 826.
- 30. Dancis J, Hutzler J, Levitz M.** Metabolism of white blood cells in maple syrup urine disease. *Biochim Biophys Acta* 1960; 43: 342 – 343.
- 31. Chuang JL, Wynn RM, Clint CM, Song J, Li J, Awad N, et al.** Structural and biochemical basis for novel mutations in homozygous Israeli maple syrup urine disease patients. *J Biol Chem* 2004; 279: 17792-177800.
- 32. De Luis Roman DA, Izasola JO.** Maple syrup disease: a rare entity that we must know. Review of its dietetic management. *An Med Interna* 2005; 22: 493-497.
- 33. Mitsubuchi H, Owada M, Endo F.** Markers associated with inborn errors of metabolism of branched chain amino acids and their relevance to upper levels of intake in healthy people: an implication from clinical and molecular investigations on maple syrup urine disease. *J Nutr* 2005; 135: 1565S-1570S.
- 34. Hutson S, Hall T.** Identification of the mitochondrial branched chain aminotranferase as a branched chain  $\alpha$ -ketoacid transport protein. *J Biol Chem* 1993; 268: 3084- 3091.
- 35. Aevansson A, Chuang J, Wynn M, Truley S, Sokatch J, Hol W.** Crystal structure of 2-oxoisovalerate and dehydrogenase and the

architecture of 2-oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes.  
Nature Struct Biol 1999; 6: 785 – 792.

**36. Wynn R, Chuang J, Sansaricq C, Mandel H, Chuang D.** Biochemical basis of type IB (E1 $\beta$ ) mutations in maple syrup urine disease. J Biol Chem 2001; 276: 36550-36556.

**37. Mitsubuchi H, Nobukuni Y, Endo F, Matsuda I.** Structural organization and chromosomal localization of the gene of the E1 $\beta$  subunit of human branched chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase. J Biol Chem 1991; 266: 14686 – 14691.

**38. Zneimer SM, Lau KS, Eddy RL, Shows TB, Chuang JL, Chuang DT, et al.** Regional assignment of two genes of the human branched chain  $\alpha$ -cetoacid dehydrogenase complex: The E1  $\beta$  gene (BCKDHB) to chromosome 6p21-22 and the E2 gene (DBT) to chromosome 1p31. Genomics 1991; 10: 740 – 747.

**39. Lau KS, Eddy RL, Shows TB, Fisher CW, Chuang DT, Cox RP.** Localization of the dihydrolipoamide branched-chain transacylase gene (DBT) of the human branched chain keto acid dehydrogenase complex to chromosome 1. Cytogenet Cell Genet 1991; 56: 33 – 35.

**40. Johanning GL, Morris JI, Madhusudhan KT, Samols D, Patel MS.** Characterization of the transcriptional regulatory region of the human dihydrolipoamide dehydrogenase gene. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 10964 – 10968.

- 41. Danner D, Doering C.** Human mutations affecting branched chain – ketoacid dehydrogenase. *Front Biosci* 1998; 3:d517-524.
- 42. Rodríguez P, Navarrete R, Merinero B, Gómez P, Ugarte M.** Mutational spectrum of maple syrup urine disease in Spain. *Hum Mutat* 2006; 27: 715-728.
- 43. Matsuda I, Nobukuni Y, Mitsubuchi H, Indo Y, Endo F, Asaka J, et al.** A T-to-A substitution in the E1 $\alpha$  subunit gene of the branched chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase complex in two cell lines derived from Mennonite maple syrup urine disease patients. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 172: 646 – 651.
- 44. Fisher CR, Fisher CW, Chuang DT, Cox RP.** Occurrence of a Tyr 393 Asn (Y393N) mutation in the E1 $\beta$  gene of the branched chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase complex in maple syrup urine disease patients from a Mennonite population. *Am J Hum Genet* 1991; 49-429.
- 45. Shaag A, Saada A, Berger I, Mandel H, Joseph A, Feigenbaum A, et al.** Molecular basis of lipoamide dehydrogenase deficiency in Ashkenazi Jews. *Am J Med Genet* 1999; 82: 177 – 182.
- 46. Bridi R, Latini A, Braum C, Zorzi G, Wajner M, Lissi E, et al.** Evaluation of the mechanisms involved in leucine-induced oxidative damage in cerebral cortex of young rats. *Free Radical Research* 2005; 39: 71-79.



- 47. Tavares R, Santos C, Tasca C, Wajner M, Souza D, Dutra C.** Inhibition of glutamate uptake into synaptic vesicles from rat brain by 3-nitropropionic acid *in vitro*. *Exp Neurol* 2001; 172: 250-254.
- 48. Araujo P, Wassermann G, Tallini K, Furlanetto V, Vargas C, Wannmacher C, et. al.** Reduction of large neutral amino acid levels in plasma and brain of hyperleucinemic rats. *Neurochem Int* 2001; 38: 529-537.
- 49. Ogier de Baulny H, Saudubray JM.** Branched-chain organic acidurias. En: *Inborn metabolic diseases diagnosis and treatment*. Fernandes J, Saudubray JM, Van den Berghe G (Eds.) Springer, 3a Edición, New York, EUA, 2000, p 197.
- 50. Morton DH, Strauss KA, Robinson DL, Puffenberger EG, Kelley RI.** Diagnosis and treatment of maple syrup urine disease: A study of 36 Patients. *Pediatrics* 2002; 109: 999-1007.
- 51. Kovac P.** Alkilation. En: *Handbook of derivatives for chromatography*. Blau K, Halket J (Eds.) John Wiley & Sons Inc., 2a edición, Londres, Reino Unido, 1993, pp 109-129.
- 52. Evershed R.** Advances in silylation. En: *Handbook of derivatives for chromatography*. Blau K, Halket J (Eds.) John Wiley & Sons Inc., 2a edición, Londres, Reino Unido, 1993, pp 51-108.
- 53. Ibarra GI.** Estudio de la excreción urinaria de ácidos orgánicos en niños con desnutrición energético - proteínica. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, 1998.

- 54. Bradenberger R, Bradenberger H.** Derivative formation by ketone-base condensation. En: Handbook of derivatives for chromatography. Blau K, Halket J (Eds.) John Wiley & Sons Inc., 2a edición, Londres, Reino Unido, 1993, pp 130-140.
- 55. Korein J, Sansaricq C, Kalmijn M, Honig J, Lange B.** Maple syrup urine disease: clinical, EEG, and plasma amino acid correlations with a theoretical mechanism of acute neurotoxicity. *Int J Neurosci* 1994; 79: 21-45.
- 56. Hoffmann B, Helbling C, Schadewaldt P, Wendel U.** Impact of longitudinal plasma leucine levels on the intellectual outcome in patients with classic MSUD. *Pediatr Res* 2006; 59: 17-20.
- 57. Khanna A, Hart M, Nyhan WL, Hassanein T, Panyard-Davis J, Barshop BA.** Domino liver transplantation in maple syrup urine disease. *Liver Transpl* 2006; 12:876-882.
- 58. Strauss KA, Mazariegos GV, Sindhi R, Squires R, Finegold DN, Vockley G, et al.** Elective liver transplantation for the treatment of classical maple syrup urine disease. *Am J Transplant* 2006; 6:557-564.
- 59. le Roux C, Murphy E, Lilburn M, Lee PJ.** The longest-surviving patient with classical maple syrup urine disease. *J Inherit Metab Dis.* 2006; 29: 190-194.
- 60. Ronbinson D, Drumm LA.** Maple syrup disease: a standard of nursing care. *Pediatr Nurs* 2001; 27: 255-258.
- 61. Snyderman SE.** In response to le Roux et al. *J Inherit Metab Dis* 2006; 29:690 – 690.

- 62.** Norma Oficial Mexicana-007-SSA2-1993. Atención a la mujer durante el embarazo, parto y puerperio y del RN, criterios y procedimientos para la prestación del servicio. Diario Oficial de la Federación Tomo CDXCVI No.5 México, D.F. viernes 6 de enero de 1995.
- 63. Ibarra I, Fernández C, Belmont L, Vela M.** Elevada mortalidad y discapacidad en niños mexicanos con enfermedad de orina con olor a jarabe de arce. *Gac Med Mex* 2007; 143: 197-201.
- 64. Sweetman L.** Organic acid analysis. En: *Techniques in diagnostic human biochemical genetics: A laboratory manual*. Hommers A. Ed. Wiley-Liss, New York, EUA, 1991, pp. 143-176.
- 65. O'Brien D, Ibbott F, Rodgerson D.** *Laboratory manual of pediatric micro-biochemical techniques*. Hoeber Medical Division 4<sup>o</sup> edición, New York, EUA, 1968, pp. 114-116.
- 66. Lin J, Chiu P, Hsu H, Lin S, Chen Y, Hsieh K.** An early diagnosis leads to a good prognosis: a patient with maple syrup urine disease screened by tandem mass spectrometry. *Acta Pediatr Taiwan* 2004; 45: 287-289.
- 67. Lloyd M, Tonninges T, van Dick P, Mann M, Brin A, Johnson K, et al.** American academy of pediatrics newborn screening task force recommendations: how far have we come?. *Pediatrics* 2006; 117: S194-S211.
- 68. Riviello J, Rezvani I, DiGeorge A, Foley C.** Cerebral edema causing death in children with maple syrup urine disease. *J Pediatr* 1991; 119: 42-45.

## **Anexo 1**

El material fotográfico de los pacientes mostrado en este trabajo, cuenta con las cartas de consentimiento informado firmadas por los padres, para su publicación.

## **Anexo 2**

Este trabajo fue publicado en la Revista Gaceta Médica de México, cuya referencia bibliográfica es: Gac Med Mex 2007; 143: 197-201.