

**DIAGNÓSTICO BIOQUÍMICO POR MÉTODO CROMATOGRÁFICO DE LA
ENFERMEDAD DE LA ORINA CON OLOR A JARABE
DE ARCE EN CUBA: 2023-2025**

Jessica Laura Páez Campos ¹ , Gretel Riverón Forment ² ,
Tatiana Acosta Sánchez ³ , Gretell Huertas Pérez ⁴ , Laritza Martínez Rey ⁵ ,
Víctor Jesús Tamayo Chang ⁶ , Dulce María Charón Savón ⁷ ,
Lilia Caridad Marín Padrón ⁸ , Ivette Camayd Viera ⁹ 

1. Lic. en Bioquímica y Biología Molecular. Laboratorio de Genética Bioquímica. Centro Nacional de Genética Médica.
2. Lic. en Bioquímica. MsC. Bioquímica Clínica. Investigador Auxiliar y Profesor Auxiliar. Laboratorio de Genética Bioquímica. Centro Nacional de Genética Médica.
3. Lic. en Bioquímica. Dra. C. Ciencias de la Salud. Profesora Titular e Investigador Auxiliar. Laboratorio de Genética Bioquímica. Centro Nacional de Genética Médica.
4. Médico Especialista 1er Grado Genética Clínica. Profesora Auxiliar. Hospital Pediátrico Docente "Centro Habana". La Habana, Cuba.
5. Médico Especialista 2do Grado Genética Clínica. Profesora Auxiliar. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba.
6. Médico Especialista 2do Grado Genética Clínica. Dr. C. Ciencias de la Salud. Profesor Auxiliar. Hospital Pediátrico Universitario Provincial de Holguín.
7. Lic. en Tecnología de la Salud. Perfil Laboratorio Clínico. Laboratorio de Genética Bioquímica. Centro Nacional de Genética Médica.
8. Lic. en Tecnología de la Salud. Perfil Laboratorio Clínico. MsC. Laboratorio Clínico. Laboratorio de Genética Bioquímica. Centro Nacional de Genética Médica.

9. Lic. en Bioquímica. MsC. Bioinformática. Investigador Auxiliar y Profesor Asistente. Laboratorio de Genética Bioquímica. Centro Nacional de Genética Médica.

EMAIL: griveron352@gmail.com

CORRESPONDENCIA: MsC. Gretel Riverón Forment. Licenciada en Bioquímica, MsC. Bioquímica. Investigador y Profesor Auxiliar. Laboratorio de Genética Bioquímica. Centro Nacional de Genética Médica. ICBP Victoria de Girón. Universidad Médica de la Habana. Ave 31 No. 3102 esq. 146. Cubanacán, Playa. La Habana.

RESUMEN

Introducción: La enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce es un trastorno hereditario, causado por deficiencias en el complejo deshidrogenasa de α -cetoácidos de cadena ramificada, lo que provoca acumulación de valina, isoleucina y leucina en el organismo, generando daño neurológico severo. En Cuba el diagnóstico se ha basado en hallazgos clínicos y en la detección en orina de los α -hidroxiácidos y α -cetoácidos correspondientes, sin la cuantificación de los aminoácidos ramificados a nivel sistémico. **Objetivo:** Analizar los resultados obtenidos a partir del año 2023 en el diagnóstico de esta enfermedad en el país, a partir de la implementación de este método cromatográfico para la cuantificación de los niveles séricos de los aminoácidos ramificados. **Métodos:** Se realizó un estudio de tipo observacional, descriptivo, prospectivo de serie de casos en el laboratorio de Genética Bioquímica del Centro Nacional de Genética Médica (2023-2025). Se desarrolló un método isocrático de cromatografía líquida de alta resolución con derivatización precolumna (o-ftaldehído) y detección fluorescente para la cuantificación de los

aminoácidos de interés para el diagnóstico de la enfermedad. Fueron analizadas cuatro muestras de suero de pacientes con sospecha clínica de la enfermedad. **Resultados:** El método permitió una separación eficiente de los aminoácidos ramificados logrando cuantificaciones precisas. En los pacientes estudiados existieron alteraciones en los niveles de los aminoácidos ramificados y en la relación de Fischer, coincidente con lo descrito en la literatura. Los perfiles bioquímicos obtenidos permitieron proponer la posible variante de la enfermedad en las muestras analizadas. **Conclusiones:** La Cromatografía Líquida de Alta Resolución demostró ser metodología de alto impacto clínico, con potencial para integrarse a protocolos de diagnóstico neonatal y al seguimiento terapéutico de los pacientes con la enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce en el país.

PALABRAS CLAVE: Enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce; EOOJA, Perfil de aminoácidos; HPLC-RP; Diagnóstico Bioquímico.

BIOCHEMICAL DIAGNOSIS BY CHROMATOGRAPHIC METHOD OF MAPLE SYRUP URINE DISEASE IN CUBA: 2023-2025

ABSTRACT

Introduction: Maple syrup urine disease is a hereditary disorder caused by deficiencies in the branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex, which leads to the accumulation of valine, isoleucine, and leucine in the body, generating severe neurological damage. In Cuba, the diagnosis is based on clinical findings and the detection of the corresponding α -hydroxy acids and α -keto acids in urine without quantification of the branched-chain amino acids in biological fluids. **Objective:** Implementation of a chromatographic method for the diagnosis of maple syrup urine disease in Cuba. **Methods:** An observational, descriptive, prospective case series study was conducted in the Biochemical Genetics Laboratory of the National Center for Medical Genetics (2023-2025). An isocratic high-performance liquid chromatography method with precolumn derivatization using o-phthaldehyde and fluorescent detection was developed. Four serum samples from patients with clinically suspected disease were analyzed. **Results:** The method allowed efficient separation of branched-chain amino acids, achieving precise quantifications. The patients studied showed alterations in branched-chain amino acid levels and Fisher ratio, consistent with those described in the literature. The biochemical profiles obtained suggested the presence of some variants of disease in the analyzed samples. **Conclusions:** High-performance liquid chromatography has proven to be a high-impact clinical methodology, with the potential to be integrated into neonatal diagnostic protocols.

KEYWORDS: Maple Syrup Urine Disease; MSUD; amino acid profiles; HPLC-RP; Biochemical Diagnostic.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce (EOOJA) es un trastorno en el metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada, específicamente aparece por un déficit en la actividad complejo deshidrogenasa de α -cetoácidos de cadena ramificada (BCKDH), implicado en la segunda reacción del catabolismo de los aminoácidos ramificados (AAR): valina, isoleucina y leucina. (1, 2)

La EOOJA se produce por mutaciones patogénicas en los genes que codifican para cada una de las subunidades la BCKDH, estas presentan un modo de herencia autosómico recesivo. Clínicamente se

describen cinco variantes de la enfermedad: clásica, intermedia, intermitente, sensible a tiamina y deficiencia de subunidad E3. La variante clásica inicia en el período neonatal con niveles muy elevados tanto de los aminoácidos ramificados como de sus α -cetoácidos correspondientes y suele provocar crisis metabólicas graves y muerte temprana. (3, 4)

La forma intermedia aparece en edades variables, con retraso en el desarrollo psicomotor, convulsiones y episodios de descompensación; mientras que la intermitente se manifiesta en episodios agudos desencadenados por infecciones, ayuno o cambios dietéticos, los pacientes se

encuentran asintomáticos fuera de crisis. La forma sensible a tiamina y la deficiencia de la subunidad E3 son menos frecuentes, en el caso de la primera no se presenta enfermedad neonatal aguda, la suplementación con tiamina permite controlar los síntomas; la segunda es la forma más severa de la enfermedad ya compromete otros complejos deshidrogenasas dependientes de E3, esenciales en el metabolismo celular. (4)

En varios países ya se ha introducido la EOOJA dentro de los programas de pesquisa neonatal. En Cuba el diagnóstico de esta entidad se ha basado históricamente en los hallazgos clínicos (olor dulce en la orina y el cerumen, letargo, acidosis metabólica, hipotonía, vómitos, convulsiones y retraso en el neurodesarrollo), complementado con la detección cualitativa de los α -

hidroxiácidos y los α -cetoácidos correspondientes en orina mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).(5) Sin embargo, esta estrategia presenta una limitación crucial, no se dispone de un método que permita la cuantificación de los aminoácidos ramificados séricos. La determinación de estos aminoácidos es indispensable para realizar un diagnóstico bioquímico robusto y un monitoreo metabólico preciso, especialmente en las variantes menos severas o intermitentes.

En este contexto el Centro Nacional de Genética Médica ha trabajado en la introducción de un método para el análisis de los niveles séricos de los AAR mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). De ahí que, el objetivo del presente trabajo sea analizar los resultados

obtenidos a partir del año 2023 en el diagnóstico de la EOOJA en el país, a partir de la implementación de este método cromatográfico para la cuantificación de los niveles séricos de los aminoácidos ramificados.

Metodología

La presente investigación se desarrolló durante el período comprendido entre enero 2023 a diciembre 2024. Se trata de un estudio observacional, descriptivo, prospectivo de serie de casos.

Selección de la muestra

La muestra en estudio fue seleccionada a partir de los 203 participantes en un proyecto de investigación aprobado por el Comité de Ética del Centro Nacional de Genética Médica (CNGM), llevado a cabo por el Laboratorio de Genética Bioquímica en el período comprendido entre los años

2023 y 2025. Del total de casos estudiados, solo 4 de ellos tenían indicación del estudio por la sospecha clínica de EOOJA.

Reactivos

Todos los reactivos empleados estaban aptos para el uso: acetato de sodio 99% (BDH), ácido Bórico (Panreac), hidróxido de sodio (Sigma-Aldrich), o-ftalaldehído (OPA) (Sigma-Aldrich), ácido 3-mercaptopropiónico (3-MPA) (Alfa Aesar), metanol grado HPLC (Titolchimica), L-aminoácidos (Leu, Val, Ile, Orn) (Sigma-Aldrich), ácido acético (Sigma-Aldrich).

Los reactivos y soluciones de trabajo empleadas fueron preparadas según la técnica descrita por Babu et al., 2002. (6) Para la preparación del buffer acetato 0,05 M pH=6,5 se pesaron 4,101 g de acetato de sodio para 1 L de H₂O y la misma se ajusta

añadiendo a esta solución ácido acético glacial. El buffer borato 0,5 M se preparó a partir de una solución de ácido bórico (15,45 g en 500 mL de H₂O), la que se ajustó a pH=10,5 añadiendo una solución de hidróxido de sodio 0.5 M (10,0 g /500 mL). El reactivo derivatizante se preparó pesando 0,020 g de OPA, al que se le añadieron 1800 µL de metanol, 200 µL de buffer borato 0,5 M y 10 µL de 3-MPA.

Muestras biológicas

Las muestras de suero fueron remitidas desde los servicios de Genética Clínica de hospitales y centros provinciales que conforman la Red Nacional de Genética Médica del país ante la hipótesis diagnóstica de la EOOJA, en uno de los casos se colectó suero en dos momentos

(en crisis e intercrisis), dada la sospecha por el especialista de la variante intermitente de la EOOJA.

Los sueros fueron trasladados al laboratorio en condiciones de conservación adecuadas para su posterior procesamiento.

Pre-tratamiento y derivatización de las muestras

Todas las muestras fueron desproteinizadas con acetonitrilo, en relación 2:1 (v:v), se almacenaron a -20 °C hasta la determinación de los niveles de aminoácidos. Previo al ensayo las muestras son centrifugadas a 10000 r.p.m. durante 15 minutos. Posteriormente, se extraen 100 µL del sobrenadante. En los tubos de inyección de HPLC son añadidos 10 µL de acetonitrilo (blanco reactivo), soluciones estándares de aminoácidos o muestra

desproteínizada, a lo que se adicionan 500 μ L de metanol, 200 μ L de buffer borato 0,5 M y 100 μ L de reactivo derivatizante para ser analizados.

Condiciones cromatográficas

El análisis de las muestras se realizó en un equipo de HPLC (Shimadzu) compuesto por: una bomba cuaternaria LC-20AT, un autoinyector SIL-20A, detector de fluorescencia RF-10AXL y un horno CTO-20AC. El método cromatográfico empleado fue descrito por Liu, 2006. (7) El mismo consistió en un método isocrático en fase inversa con derivatización precolumna, empleando OPA, al que se le introdujeron cambios en la composición de la fase móvil y el método de elución para la determinación de las concentraciones séricas de los aminoácidos: leucina (Leu),

isoleucina (Ile), valina (Val) y Ornitina (Orn).

La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna Lichrosorb RP-18 (Supelco) de 250 mm de longitud y 5 μ m de tamaño de partícula. Para separar estos aminoácidos se utilizó como fase móvil una solución de Buffer Acetato 0,05 M y Metanol en una proporción 60:40 (v/v), respectivamente. El flujo de la fase móvil fue 1 ml/min. La temperatura de la columna se controló a 40°C y el volumen de inyección fue de 20 μ L. La detección se realizó a una longitud de onda de excitación 330 nm y de emisión de 440 nm. La adquisición y procesamiento de las señales cromatográficas se realizó con el programa *LCSolution ver. 1.25 SP 3, 2011*.

Adicionalmente se determinaron las concentraciones séricas de tirosina y fenilalanina mediante un método

cromatográfico descrito previamente por el grupo de trabajo del Laboratorio. (8)

Análisis de los resultados

La cuantificación de los aminoácidos se realizó mediante el método del patrón externo empleando curvas de calibración a partir de soluciones estándar de los aminoácidos correspondientes en el rango de 50 a 1500 $\mu\text{mol/L}$. Las concentraciones se expresaron en $\mu\text{mol/L}$ y se compararon con los valores de referencia internacionales reportados en la literatura para métodos de HPLC-RP similares al empleado en la presente investigación. (9) También se calculó la relación de Fischer dada por la sumatoria de los niveles de los aminoácidos ramificados (leucina, isoleucina y valina) dividida por la sumatoria de los niveles séricos de los aminoácidos

aromáticos (fenilalanina y tirosina). Según la siguiente fórmula:

$$\text{Relación Fisher} = \frac{(\text{Leu} + \text{Ile} + \text{Val})}{(\text{Tyr} + \text{Phe})}$$

Aspectos éticos

El proyecto de investigación de los cuales se derivan los resultados presentados fue revisado y aprobado por los órganos científicos del CNGM. En todo momento el proyecto se rigió por los principios éticos para la investigación médica con seres humanos, establecidos en la Declaración de Helsinki. (10)

Resultados

El método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución implementado para el

diagnóstico bioquímico de la enfermedad EOOJA permitió la cuantificación precisa de aminoácidos ramificados (AAR) y la ornitina en las muestras de suero procesadas. En la figura 1 se ilustran los cromatogramas obtenidos mediante el método por HPLC-RP implementado en el Laboratorio del CNGM. El método introducido presentó tiempos de retención claramente definidos para los AAR y la ornitina, los cuales mostraron picos cromatográficos bien resueltos sin

interferencias compuestos endógenos (Figura 1A). Como se puede evidenciar, en los cromatogramas obtenidos para los pacientes (Figura 1 B al D), se obtienen picos anchos y asimétricos, así como fenómenos de sobresaturación del detector en las muestras de los pacientes, lo que es indicativo de la presencia de elevadas concentraciones de estos aminoácidos en las muestras analizadas.

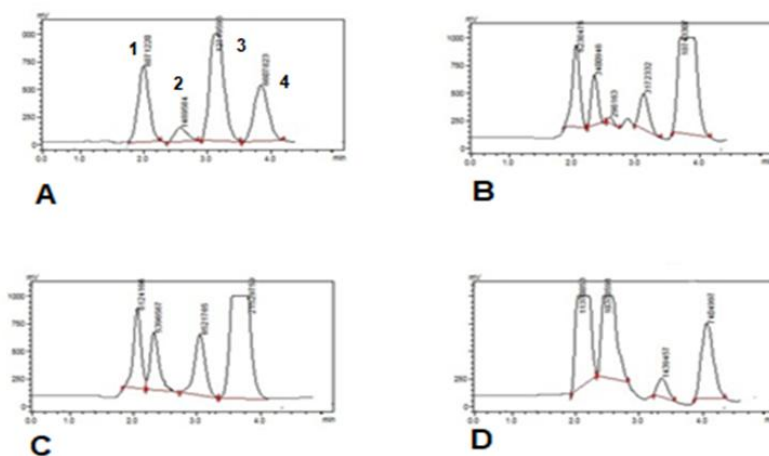


Figura 1. A: Cromatograma con estándares de los aminoácidos ramificados y ornitina. (1: Val; 2: Orn; 3: Ile; 4: Leu). **B al D:** Cromatogramas de los pacientes P1, P3 y P64, respectivamente. Todos fueron obtenidos por el método de HPLC-RP implementado en el Laboratorio.

En la tabla 1 se resumen las concentraciones séricas de leucina, isoleucina, valina y la relación de Fischer obtenidas en las muestras de los cuatro pacientes con sospecha clínica de EOOJA. Estos hallazgos analíticos permitieron proponer como posible diagnóstico la presencia de EOOJA en las muestras analizadas. Así mismo, teniendo en cuenta

el perfil bioquímico obtenido se propuso una posible clasificación del subtipo que pudieran presentar los pacientes identificados.

Tabla 1. Concentraciones séricas de aminoácidos ramificados en los pacientes con sospecha de EOOJA y valores de referencia internacionales.

Aminoácido	Valor de referencia internacional ($\mu\text{mol/L}$)	Muestras de los pacientes codificadas			
		P1	P3	P64	P108
Leucina (Leu)	60-230	1657,4*	1025,7*	448,3*	441,7*
Valina (Val)	140 – 350	372,6*	274,4	661,9*	269,0
Isoleucina (Ile)	30-130	331,1*	173,7*	78,8	116,5
Relación de Fischer	0,7-3,3	9,2*	3,8*	0,8	3,6*
Aminoácido	Valor de referencia internacional ($\mu\text{mol/L}$)	Muestras de los pacientes codificadas			
		P1	P3	P64	P108
Leucina (Leu)	60-230	1657,4*	1025,7*	448,3*	441,7*
Valina (Val)	140 – 350	372,6*	274,4	661,9*	269,0
Isoleucina (Ile)	30-130	331,1*	173,7*	78,8	116,5
Relación de Fischer	0,7-3,3	9,2*	3,8*	0,8	3,6*
Aminoácido	Valor de referencia internacional ($\mu\text{mol/L}$)	Muestras de los pacientes codificadas			
		P1	P3	P64	P108
Leucina (Leu)	60-230	1657,4*	1025,7*	448,3*	441,7*
Valina (Val)	140 – 350	372,6*	274,4	661,9*	269,0
Isoleucina (Ile)	30-130	331,1*	173,7*	78,8	116,5

Relación de Fischer	0,7-3,3	9,2*	3,8*	0,8	3,6*
----------------------------	---------	------	------	-----	------

Leyenda: *Valores elevados

Fuente: Elaboración propia

Se resalta que los resultados del paciente P1 mostraron una elevación marcada de los tres aminoácidos ramificados, superando ampliamente los valores de referencia establecidos, con una relación de Fischer de 9,2, indicativa de un desbalance metabólico severo. Este perfil bioquímico pudiera corresponderse con la presencia de la forma clásica de la EOOJA en este caso, atendiendo además que la enfermedad tuvo un debut neonatal con un desenlace fatal.

Por otra parte, como se refleja en la Tabla 2, el paciente P3, muestra un aumento significativo de las concentraciones séricas

de los AAR, así como alteraciones en la relación de Fischer, en el momento de la crisis, pero posterior a la implementación de una dieta restringida en proteínas, se observó un descenso significativo de las concentraciones séricas de estos aminoácidos y normalización de la relación de Fischer, por lo que se pudiera plantear como posible diagnóstico la presencia de la variante intermitente de la enfermedad, además de que el momento de la presentación de la crisis no fue neonatal según se refiere la indicación enviada al laboratorio.

Tabla 2. Niveles séricos de aminoácidos ($\mu\text{mol/L}$) en la muestra del paciente P3 y relación de Fischer en el momento de la crisis y posterior a las correcciones dietéticas.

Aminoácidos	P3 (muestra en crisis)	P3 (muestra luego de tratamiento)
Leucina (Leu)	1025,7	31,1
Valina (Val)	274,4	76,9
Isoleucina (Ile)	173,7	55,1
Relación de Fischer	3,8	1,9

Fuente: Elaboración propia

Los pacientes P64 y P108 presentaron perfiles bioquímicos más compatibles con la forma intermedia de la enfermedad con elevaciones moderadas de leucina y valina. La relación de Fischer se encontraba elevada en uno de los casos (P108), pero sin alcanzar los niveles observados en el caso clásico. En ambos casos el debut fue neonatal.

Discusión

La cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (HPLC-RP) se ha consolidado como una herramienta analítica de alta precisión y especificidad para la cuantificación de los aminoácidos de cadena ramificada en pacientes con EOOJA.

En el contexto cubano, esta primera experiencia de implementación de la

metodología permitió identificar perfiles bioquímicos característicos de algunas de las variantes clínicas de la enfermedad, demostrando su aplicabilidad tanto para el diagnóstico como para el monitoreo terapéutico. Desde el punto de vista metodológico, la elección del OPA como agente derivatizante resultó ser altamente eficiente para la detección fluorométrica de aminoácidos en suero, lo que permitió obtener de cromatogramas con excelente resolución y sensibilidad. Este aspecto es fundamental para la aplicación rutinaria en laboratorios clínicos, especialmente en contextos donde tecnologías como la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) no están disponibles. (11)

En relación con los valores de los AAR encontrados en las muestras analizadas estas son compatibles con la alteración del

metabolismo de estos aminoácidos, lo que sugiere la presencia de la EOOJA. En este sentido las concentraciones séricas de leucina superiores a 1500 $\mu\text{mol/L}$, es característico de la forma clásica de esta enfermedad según lo descrito en la literatura. (12,13) Estos niveles de leucina se consideran neurotóxicos y responsables de las manifestaciones clínicas severas descritas para esta variante, como la encefalopatía progresiva, la acidosis metabólica y el coma. (12,13) Este perfil bioquímico es típico en individuos con deficiencia casi total de la actividad del complejo deshidrogenasa de α -cetoácidos de cadena ramificada (BCKDH), lo cual justifica la sintomatología de inicio neonatal, como resultó en el caso identificado en el presente estudio.

Por otra parte, los pacientes con las formas intermedias pueden presentar niveles de AAR elevados ($>400 \mu\text{mol/L}$), los que resultan inferiores a los observados en la variante clásica, lo cual es congruente con una actividad residual parcial del complejo enzimático BCKDH, lo que podría estar evidenciado en dos de las muestras analizadas. Esta correlación entre la actividad enzimática y la severidad bioquímica ha sido ampliamente descrita en cohortes recientes, donde se reporta que pacientes con actividad enzimática entre el 3% y el 30% suelen presentar un fenotipo intermedio, caracterizado por episodios de descompensación metabólica ante estrés catabólico, pero con mejor pronóstico neurológico. (14,15)

Los casos con la variante intermitente presentan en fase de crisis valores AAR

elevados de manera similar a los casos con las variantes clásicas. Strauss y colaboradores, señalan que las formas intermitentes pueden alcanzar concentraciones propias de las variantes clásicas en situaciones de catabolismo acelerado. (16) Este pudiera ser el contexto de presentación del caso analizado en el presente estudio, con la posible forma de presentación intermitente de esta enfermedad. Lo más relevante fue el comportamiento bioquímico de este paciente tras la instauración de restricción proteica estricta, donde presentó valores de AAR dentro del rango de referencia y una relación de Fischer próxima a la de pacientes sanos. Esto respalda la eficacia de la intervención dietética como estrategia terapéutica primaria en las formas menos severas de EOOJA, como se ha evidenciado

en estudios longitudinales donde la adherencia a la dieta hipoproteica reduce significativamente las crisis metabólicas y mejora la calidad de vida. (17)

Un aspecto a resaltar es la introducción en el algoritmo de diagnóstico bioquímico, el calculo de la Relación de Fischer como un segundo criterio, parámetro que se podría emplear además como un marcador indirecto del estado neurotóxico en los pacientes con sospecha clínica de la presencia de la EOOJA. En este sentido se describe que la acumulación masiva de AAR desplaza competitivamente a otros aminoácidos neutros y aromáticos en los sistemas de transporte a través de la barrera hematoencefálica, alterando la síntesis de neurotransmisores y exacerbando la encefalopatía. (18) El aumento de esta relación en los pacientes

con EOOJA confirma su utilidad como biomarcador de gravedad metabólica, en concordancia con estudios metabólicos recientes que la proponen como indicador pronóstico. (16, 19)

Cabe destacar que, aunque la espectrometría de masas ofrece una mayor sensibilidad, el uso de HPLC-RP continúa siendo la técnica de elección en numerosos centros de referencia debido a su menor costo operativo, menor complejidad técnica y su capacidad para realizar un análisis detallado de perfiles de aminoácidos sin requerir equipamiento de alta gama. La implementación de este método en el contexto del diagnóstico neonatal precoz en Cuba podría impactar significativamente en la identificación temprana de esta enfermedad así como disminuir la morbilidad asociada a la EOOJA,

permitiendo llevar a cabo un abordaje terapéutico temprano y dirigido.

En conclusión, los hallazgos de este estudio reafirman la importancia de la utilización de la cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa como herramienta diagnóstica y de seguimiento clínico en pacientes con sospecha clínica de EOOJA. Lo que la posicionan como una metodología de alto impacto clínico, con un potencial para integrarse a protocolos de diagnóstico neonatal ampliado y de vigilancia terapéutica en el país. A pesar de la robustez del método, se reconoce la limitación del pequeño tamaño muestral analizado. Futuros estudios deberán ampliar el número de casos para consolidar la utilidad de esta metodología y validar su integración en el programa de pesquisa neonatal.

REFERENCIAS

1. Wasim M, Awan FR, Khan HN, Tawab A, Iqbal M, Ayesha H. Aminoacidopathies: Prevalence, etiology, screening, and treatment options. *Biochemical Genetics*, 2018; 56(1):7–21. <https://doi.org/10.1007/s10528-017-9825-6>
2. Khalifa OA, Imtiaz F, Ramzan K, Zaki O, Gamal R, Elbaik L. Genotype-phenotype correlation of 33 patients with maple syrup urine disease. *Molecular Genetics and Metabolism* 2020;182(11):2486–2500.
3. Amaral AU, Wajner M. Pathophysiology of maple syrup urine disease: Focus on the neurotoxic role of the accumulated branched-chain amino acids and branched-chain α -keto acids. *Neurochemistry International* 2022;157:105360. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2022.105360>
4. Álvarez A, Bermejo S, Stapper S. Reporte de caso y revisión de literatura: Enfermedad de orina con olor a jarabe de arce. *Revista*

Pediatría 2020;53(1):30.

<https://doi.org/10.14295/rp.v53i1.158>

5. Camayd I, Martínez L, Pacheco B, Concepción A. Diagnóstico de la enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce en Cuba en el período 2013-2022. En Convención Internacional de Salud 2022 [Congreso]. La Habana, Cuba. <https://convencionsalud.sld.cu/index.php/convencionsalud22/2022/paper/download/2617/1357>

6. Liu, H. Measurement of blood plasma amino acids in ultrafiltrates by high-performance liquid chromatography with automatic precolumn o-phthaldialdehyde derivatization. En H. Cooper (Ed.) Amino Acid Analysis Protocols 2000:pp.123–140. Humana Press. Disponible en: <https://www.fbise.edu.pk/LIBRARY/3455.pdf>

7. Babu SS, Shareef M, Shetty APK, Shetty KT. HPLC method for amino acids profile in biological fluids and inborn metabolic disorders of aminoacidopathies. Indian Journal of Clinical Biochemistry 2002;17(1):7–26. <https://doi.org/10.1007/BF02867967>

8. Contreras J, Alonso E, Fuentes, LE. HPLC for confirmatory diagnosis and biochemical monitoring of Cuban patients with hyperphenylalaninemias. MEDICC Review 2015;17(1):23–8.

9. Imanzadeh F, Emadi B, Rohani P, Hosseini A, Khatami K, Dara N. Assessment of serum amino acid chromatography in children with inflammatory bowel diseases. Iranian Journal of Pediatrics 2019;7(1):8853–60. <https://doi.org/10.22038/ijp.2018.33721.2981>

10. World Medical Association. Declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human participants 2013. Disponible en: <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki/>

11. Marino MA, Raggi MA, Bugamelli F. High-performance liquid chromatography in the clinical laboratory: Role in the analysis of amino acids. Clin Chim Acta 2018;484, 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.05.018>

12. Chuang DT, Shih VE. Maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria). En D. Valle, S. Antonarakis, A. Ballabio, et al. (Eds.), The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease 2020. McGraw-Hill.

13. van Karnebeek CDM. Metabolic evaluation of encephalopathy: What does HPLC offer today? Molecular Genetics and Metabolism 2019;128(4), 329–337.
<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2019.10.003>

14. Qu W, Zhang Y, Bai Y, Li Y, Wang Z. Clinical and biochemical heterogeneity in maple syrup urine disease: A review. Journal of Clinical Laboratory Analysis 2019;33(1), e22616.
<https://doi.org/10.1002/jcla.22616>

15. Zhou Y, Li H, Wang J. Advances in dietary intervention and gene therapy for branched-chain amino acid metabolism disorders. Frontiers in Nutrition 2023;10, 1163421.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1163421>

16. Strauss KA, Carson VJ, Soltys K, Young ME, Bowser LE, Puffenberger EG, Brigatti KW,

Williams KB, Robinson DL, Hendrickson C, Beiler K, Taylor CM, Haas-Givler B, Chopko S, Hailey J, Muelly ER, Shellmer DA, Radcliff Z, Rodrigues A, Loeven K, Heaps AD, Mazariegos GV, Morton DH. Branched-chain a-ketoacid dehydrogenase deficiency (maple syrup urine disease): Treatment, biomarkers, and outcomes.

Molecular Genetics and Metabolism 2020;129(3), 193–206.
<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2020.01.006>

17. Saad SM, Fahim MA, Yassin AS. Nutritional management in MSUD: New perspectives and challenges. Molecular Genetics and Metabolism Reports 2020: 24, 100627.
<https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2020.100627>

18. Tsunekawa K, Matsumoto R, Ushiki K, Martha L, Shoho Y, Yanagawa Y, Ishigaki H, Yoshida A, Araki O, Nakajima K, Kimura T, Murakami M. Significance of serum branched-chain amino acid to tyrosine ratio measurement in athletes with high skeletal muscle mass. BMC Sports Science, Medicine and Rehabilitation 2021;13(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s13102-020-00229-1>

19. Reinecke CJ, Smuts I, Louw R. Amino acid disorders: Diagnosis and monitoring using advanced analytical techniques. *Bioanalysis* 2022;14(2):125–36.
<https://doi.org/10.4155/bio-2021-0204>

20. Abdenur JE, Chamoles NA, Schenone AB. Diagnosis of maple syrup urine disease by newborn screening: A biochemical and molecular overview. *Clinical Biochemistry* 2016;49(18):1269-77. Disponible en:
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.06.007>.