



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE CIENCIAS AMBIENTALES Y
BIOTECNOLOGÍA

**“Estudio del perfil metabólico de neonatales chilenos con hiperfenilalaninemia y
fenilcetonuria, nacidos entre los años 2010 al 2022”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Cristóbal Ignacio Zúñiga Sepúlveda

Director del Seminario de Título: Dr. Rodrigo Pulgar Tejo

Patrocinante: Dr. Marco Méndez

Julio, 2023

Santiago – Chile



Informe de Aprobación de Seminario de Título

Se informa a la Escuela de Ciencias Ambientales y Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, que el Seminario de Título, presentado por

Cristóbal Ignacio Zúñiga Sepúlveda

“Estudio del perfil metabólico de neonatales chilenos con hiperfenilalaninemia y fenilcetonuria, nacidos entre los años 2010 al 2022”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de **Ingeniero en Biotecnología Molecular**

Dr. Rodrigo Pulgar Tejo

Director Seminario de Título:

Dr. Marco Méndez

Profesor Patrocinante:

Comisión Revisora y Evaluadora

Dr. Ricardo Cabrera

Presidente Comisión:

Dra. Lorena Santa María

Evaluador:

Santiago de Chile, julio 2023

Índice de contenidos

Resumen	1
Abstract.....	3
Introducción.....	5
Objetivo General.....	10
Objetivos específicos.....	10
Materiales y métodos.....	11
3.1 Origen de los datos y procedimientos de laboratorio	11
3.2 Metabolitos obtenidos en el perfil de aminoácidos y acilcarnitinas.	11
3.3 Población de estudio y criterios de inclusión de entradas utilizadas.....	12
3.4 Preprocesamiento de datos	13
3.5 Subdivisión de pacientes con fenilalanina elevada.....	14
3.6 Análisis estadísticos.....	15
3.7 Reducción de dimensionalidad.....	15
3.8 Distancias de matrices de correlación.	16
3.9 Análisis de agrupamiento jerárquico y abundancia diferencial	16
3.10 Análisis de enriquecimiento del conjunto de metabolitos (MSEA).	17
3.11 Reporte del comité de ética y tratamiento de datos de pacientes neonatales chilenos	18
Resultados.....	19
4.1 Estructuración de la base de datos y descripción de los datos utilizados	19

4.2 Reducción de dimensionalidad sugiere diferencias metabólicas dependiente de fenilalanina.	21
4.3 Cambios en las asociaciones metabolito-metabolito en HPA/PKU	23
4.4 Agrupación de individuos HPA/PKU a partir de sus características metabólicas	28
4.5 Abundancia diferencial de metabolitos releva disparidades en HPA y PKU respecto a los sujetos sanos	31
4.6 Identificación de vías metabólicas moduladas por la concentración de fenilalanina	34
Discusión y proyecciones	38
5.1 Estructuración de datos provenientes de la pesquisa neonatal ampliada en Chile	38
5.2 Exploración metabólica preliminar de pacientes HPA y PKU	40
5.3 Abundancia de aminoácidos en hiperfenilalaninemia/fenilcetonuria	42
5.4 Disminución generalizada de acilcarnitinas	44
5.5 Procesos biológicos subyacentes bajo el fenotipo metabólico observado.....	46
5.6 Limitaciones del estudio	48
Conclusiones.....	51
Bibliografía.....	52

Índice de figuras

Figura 1. Análisis de reducción de dimensionalidad	22
Figura 2. Correlaciones entre parejas de metabolitos.....	25
Figura 3. Agrupación jerárquica de grupos de perfiles metabólicos	29
Figura 4. Análisis de abundancia diferencial de metabolitos	32
Figura 5. Resultados del análisis de enriquecimiento de conjuntos de metabolitos.....	36

Índice de tablas

Tabla 1. Entradas admitidas luego del preprocesamiento de datos.	20
---	----

Lista de abreviaturas

PKU: Fenilcetonuria (**P**henyl**k**etonuria)

HPA: Hiperfenilalaninemia (**H**yper**p**henylalaninemia)

Phe: Fenilalanina (**P**henylalanine)

Tyr: Tirosina (**T**yrosine)

PAH: Fenilalanina hidroxilasa (**P**henylalanine **h**ydroxylase)

PAH^{enu2}: ratones modelos de humano para fenilcetonuria obtenidos por mutagénesis con N-etil-N-nitrosourea (ENU)

PCA: Análisis de Componentes Principales (**P**rincipal **C**omponent **A**nalysis)

t-SNE: Algoritmo de incrustación de vecinos estocásticos (**T**-distributed **S**tochastic **N**eighbor **E**mbedding)

MS/MS: Espectrometría de masas en tándem

μM: micromolar

IQR: Rango intercuartílico (**I**nter **Q**uartile **R**ange)

IPR: Rango interpercentil (**I**nter **P**ercentile **R**ange)

FDR: Tasa de falsos descubrimientos (**F**alse **D**iscovery **R**ate)

MSEA: Análisis de sobrerepresentación de metabolitos (**M**etabolite **S**et **E**nrichment **A**nalysis)

Resumen

Antecedentes: La fenilcetonuria (PKU) es un desorden metabólico congénito caracterizado por la acumulación del aminoácido fenilalanina (Phe) en la sangre y otros tejidos, condición denominada hiperfenilalaninemia (HPA), principalmente causada por mutaciones en la enzima fenilalanina hidroxilasa (PAH). Esta patología afecta el desarrollo neurológico de los infantes que la padecen, lo que se manifiesta en trastornos cognitivos, retardo en el desarrollo y comportamientos anormales. Si bien la PKU se refiere a un fenotipo exacerbado de HPA, en la actualidad se ha llegado al consenso que un paciente tiene PKU cuando la concentración de Phe en la sangre es mayor a 600 μM al nacer, mientras que es HPA cuando la concentración del aminoácido está entre 120 y 600 μM al nacer. El presente estudio tuvo por objetivo evaluar otras perturbaciones (más allá del metabolismo de fenilalanina) en el perfil metabólico plasmático de individuos neonatales con HPA o PKU al compararlos con individuos neonatales sanos.

Métodos: Este estudio retrospectivo y observacional se basó en datos del perfil metabólico plasmático de recién nacidos chilenos en el periodo 2010 y 2022, provenientes del programa nacional chileno de pesquisa neonatal para fenilcetonuria y otras enfermedades metabólicas. Los perfiles metabólicos sanguíneos de aminoácidos y acilcarnitinas obtenidos por espectrometría de masas en tándem (MS/MS) de 40 recién nacidos con HPA y 63 pacientes neonatales con PKU fueron comparados con una cohorte de 9.594 individuos sanos mediante análisis estadísticos de abundancia diferencial, enriquecimiento de vías metabólicas y distancias de matriz de correlación.

Resultados: Basados en análisis de reducción de dimensionalidad lineales y no lineales (PCA y t-SNE), el perfil metabólico de aminoácidos y acilcarnitinas de recién nacidos con HPA/PKU mostró disposiciones espaciales diferentes respecto a pacientes sanos. Además, las correlaciones entre metabolitos de pacientes con HPA/PKU comparadas con las de pacientes sanos mostraron

diferencias, sugiriendo una adaptación homeostática al aumento de las concentraciones de Phe. Notablemente, el perfil metabólico tanto de individuos con HPA/PKU mostraron una disminución generalizada y significativa de acilcarnitinas junto a un aumento de carnitina libre y algunos aminoácidos. Adicionalmente, el perfil metabólico de sujetos con HPA/PKU mostró un enriquecimiento funcional de diferentes procesos metabólicos celulares, incluyendo vías de biosíntesis y metabolismo de aminoácidos como fenilalanina, valina, arginina, entre otros; y metabolismo de glutatión, sugiriendo una desregulación en respuestas a agentes prooxidantes.

Conclusión: El fenotipo metabólico de recién nacidos hiperfenilalaninémicos y fenilcetonúricos sugiere efectos en diversas vías metabólicas, más allá de lo que se ha reportado como consecuencia directa de la alta concentración de Phe en sangre. Debido a que los datos se obtuvieron de neonatales chilenos al nacer, estos resultados se explican por efectos adaptaciones metabólicas a la condición HPA/PKU, sin los efectos que pueda modular la dieta. Esperamos que estos resultados en su conjunto contribuyan a explicar alguno de los síntomas y características de la enfermedad, más allá de los efectos directos de una concentración elevada de fenilalanina.

Abstract

Background: Phenylketonuria (PKU) is a congenital metabolic disorder characterized by the accumulation of the amino acid phenylalanine (Phe) in the blood and other tissues, a condition called hyperphenylalaninemia (HPA), mainly caused by mutations in the enzyme phenylalanine hydroxylase (PAH). This pathology affects the neurological development of infants who suffer from it, which manifests itself in cognitive disorders, developmental delay and abnormal behaviors. Although PKU refers to an exacerbated phenotype of HPA, there is now a consensus that a patient has PKU when the concentration of Phe in the blood is greater than 600 μM at birth, while it is HPA when the concentration of the amino acid is between 120 and 600 μM at birth. The present study aimed to evaluate other disturbances (beyond phenylalanine metabolism) in the plasma metabolic profile of neonatal individuals with HPA or PKU when compared to healthy neonatal individuals.

Methods: This retrospective, observational study was based on plasma metabolic profile data of Chilean newborns in the period 2010 and 2022 from the Chilean national neonatal screening program for phenylketonuria and other metabolic diseases. Blood metabolic profiles of amino acids and acylcarnitines obtained by tandem mass spectrometry (MS/MS) from 40 newborns with HPA and 63 neonatal patients with PKU were compared with a cohort of 9,594 healthy individuals by statistical analyses of differential abundance, metabolic pathway enrichment and correlation matrix distances.

Results: Based on linear and nonlinear dimensional reduction analyses (PCA and t-SNE), the metabolic profile of amino acids and acylcarnitines of newborns with HPA/PKU showed spatial distinction with healthy patients. Furthermore, the correlations between metabolites of HPA/PKU patients compared with those of healthy patients showed differences, suggesting a homeostatic adaptation to increased Phe concentrations. Notably, the metabolic profile of both HPA/PKU

individuals showed a generalized and significant decrease in acylcarnitines along with an increase in free carnitine and some amino acids. Additionally, the metabolic profile of HPA/PKU subjects showed a functional enrichment of diverse cellular metabolic processes, including pathways of biosynthesis and metabolism of amino acids such as phenylalanine, valine, arginine, among others; and glutathione metabolism, suggesting a dysregulation in responses to prooxidant agents.

Conclusion: The metabolic phenotype of hyperphenylalaninemic and phenylketonuric newborns suggests effects on several metabolic pathways, beyond what has been reported as a direct consequence of high blood Phe concentration. Because the data were obtained from Chilean neonatals at birth, these results are explained by metabolic adaptations to the HPA/PKU condition, without the effects that may be modulated by diet. We hope that these results as a whole contribute to explaining some of the symptoms and characteristics of the disease, beyond the direct effects of an elevated phenylalanine concentration.

Introducción

La fenilcetonuria (PKU, OMIM:261600) es un trastorno autosómico recesivo clasificado como una enfermedad metabólica congénita, caracterizada por una acumulación anormal del aminoácido fenilalanina (Phe) en la sangre, cerebro y otros tejidos de los individuos afectados (Blau & cols., 2010). Esta enfermedad es causada principalmente (pero no exclusivamente) por una deficiencia de la proteína fenilalanina hidroxilasa (PAH), enzima que cataliza la oxidación de fenilalanina en tirosina (Tyr) (Flydal & Martinez, 2013).

Se han reportado más de mil mutaciones en el gen *PAH*, el cual codifica a la proteína, que pueden causar una alteración en la actividad de la enzima, ya sea disminuyéndola o generando una pérdida de función, conduciendo a una mayor concentración de fenilalanina en la sangre, condición denominada hiperfenilalaninemia (HPA). Los principales síntomas de esta enfermedad son trastornos neurológicos a largo plazo como alteraciones neurocognitivas, déficits motores, microcefalia, epilepsia, convulsiones, entre otros (van Spronsen & cols., 2021), si es que los pacientes no son tratados oportunamente a través de una intervención dietaria restringida en fenilalanina.

Los niveles de fenilalanina sanguíneos considerados “normales” generalmente se sitúan en una concentración entre 35 y 120 μM (aproximadamente entre 0,58 y 1,98 mg/dl) (van Spronsen & cols., 2021), categorizando sujetos con fenilalanina elevada acorde a valores consensuados. Para un diagnóstico oportuno en edades tempranas de los individuos afectados es crítico para realizar un tratamiento preventivo y evitar el desarrollo anticipado de las consecuencias neurológicas previamente mencionadas, mejorando la calidad de vida a largo plazo de los individuos. Una vez diagnosticada la enfermedad, el tratamiento tiene como objetivo mantener la concentración sanguínea de fenilalanina bajo un umbral definido según la edad y las guías médicas de cada país o región geográfica.

Aunque este tratamiento se muestra eficaz para evitar secuelas neurológicas negativas en las primeras etapas de vida del individuo (niñez y adolescencia), diversos estudios han evaluado consecuencias a largo plazo reportando que sólo mantener bajo control los niveles de fenilalanina en sangre puede ser insuficiente para evitar alteraciones neurológicas (Bilder & cols., 2016; Camp & cols., 2014; Koch & cols., 1984; White & cols., 2002).

Además, la fisiopatología de la enfermedad no ha sido completamente dilucidada hasta la fecha, lo cual va unido a la complejidad que proporciona la alta variabilidad tanto en sintomatología como en el desarrollo de diferentes fenotipos de esta enfermedad. Se han planteado varias hipótesis sobre el mecanismo por el que la acumulación de fenilalanina en órganos y tejidos conduce al deterioro neurológico, atribuyendo en mayor o menor medida la contribución hacia el desarrollo de la enfermedad. Se han propuesto procesos como una disminución de la tirosina disponible (consecuencia de la pérdida de función de la enzima PAH), una alteración del transporte de aminoácidos al cerebro que conduce a una disminución de determinados neurotransmisores, o daños en la sustancia blanca. Sin embargo, se ha planteado que los mecanismos por los que los niveles elevados de fenilalanina causan disfunción cerebral y deterioro neurológico pueden ser multifactoriales y afectar a diversas funciones metabólicas en los individuos.

Para dilucidar completamente la fisiopatología de la fenilcetonuria, los estudios con aproximaciones metabólicas han demostrado que las diferencias en el estado metabólico de los individuos con esta enfermedad están presentes más allá del metabolismo directamente relacionado a fenilalanina. Como investigó Bakkali (2021), se han realizado algunos estudios con aproximaciones metabólicas en pacientes humanos principalmente en el periodo de adolescencia y adultez, quienes han mostrado que el metabolismo de ciertos compuestos como arginina y carnitina (entre otros) presentan cambios en comparación a las cohortes de sujetos sanos de forma consistente (Cannet & cols., 2020; Kanzelmeyer & cols., 2012; Mütze & cols., 2012;

Maria A. Vilaseca & cols., 2010; Yi & cols., 2011). En ratones PAH^{enu2} de tres meses de edad (equivalentes a adultos jóvenes en humanos) se encontraron alteraciones en las vías energéticas y en la respuesta ante agentes oxidantes cuando se compararon los metabolitos cerebrales con los de ratones controles (Dobrowolski & cols., 2022).

La mayoría de estos enfoques se han realizado con las dietas restringidas en fenilalanina como foco de investigación, y en cómo esta impacta en el metabolismo de los individuos tratados. Además, la población de pacientes generalmente considera niños, adolescentes o adultos, pero existe una falta de estudios en edades neonatales o en meses de vida, que es cuando la enfermedad comienza a generar daños a largo plazo si no hay tratamiento adecuado.

Los programas de pesquisa neonatal en todo el mundo han sido clave para la vigilancia masiva de múltiples errores congénitos del metabolismo, incluida la fenilcetonuria, midiendo eficazmente varios biomarcadores asociados a estas enfermedades como prueba de prediagnóstico. En el año 1963, Robert Guthrie y Ada Susi desarrollaron una prueba que utilizaba gotas de sangre como muestra para identificar niveles elevados de fenilalanina, lo cual simplificó la manera de detectar la enfermedad al igual que permitir que un único técnico pudiera evaluar un centenar de muestras de manera rutinaria (Guthrie & Susi, 1963). Décadas más tarde, los avances tecnológicos en materia de análisis e identificación química han permitido pasar de las pruebas bioquímicas a una forma más rápida y precisa del cribado de muestras, como la implementación de la espectrometría de masas en tándem (Chace & cols., 2002). Esta técnica permite una identificación precisa de múltiples biomarcadores al mismo tiempo que están relacionados con diferentes enfermedades asociadas a defectos en el metabolismo.

En todo el mundo, los aminoácidos se miden activamente en busca de patologías denominadas “aminoacidopatías”. Los aminoácidos participan en diversos procesos celulares, actuando como

unidades básicas en la formación de proteínas, y también participando como intermediarios en rutas metabólicas asociadas a la obtención de energía, al metabolismo de especies nitrogenadas y a la mantención del equilibrio del estado oxidativo de la célula, entre otras (Nelson & Cox, 2021). Por ende, una desregulación de estos causada por mutaciones genéticas en enzimas claves de su metabolismo (como ya fue ejemplificado en la fenilcetonuria) pueden llevar a múltiples alteraciones a nivel celular, provocando enfermedades con graves desenlaces para la salud (Ferreira & van Karnebeek, 2019). Por otro lado, la carnitina libre y las acilcarnitinas, también son especies pesquisadas en etapas neonatales ya que revelan una serie de defectos de naturaleza mitocondrial (Wanders & cols., 2010). Estos compuestos están implicados principalmente en la beta oxidación de los ácidos grasos, actuando como una transformación transitoria de ácidos grasos que permite su entrada a la mitocondria. Este proceso es fundamental como una vía alternativa en la obtención de energía para la célula, pero utilizando lípidos y no carbohidratos como precursor.

Dado que tanto aminoácidos como acilcarnitinas participan en el metabolismo y la regulación energética de la célula, ambos compuestos comparten rutas metabólicas e intermediarios que, a su vez, retroalimentan los procesos catabólicos y anabólicos de las especies mencionadas (Nelson & Cox, 2021). Por ejemplo, la beta oxidación de ácidos grasos conlleva a la producción de acetil coenzima A (acetil-CoA), intermediario que también es producto de los procesos de degradación de diversos aminoácidos tales como leucina, isoleucina, fenilalanina, tirosina, entre otros. El acetil-CoA, dentro de múltiples vías donde participa, puede ser carboxilado para producir malonil-CoA, el cual actúa directamente como inhibidor de la enzima carnitina palmitoiltransferasa I (CPT1), la cual se encarga de intercambiar el grupo CoA de los ácidos grasos por carnitina para permitir la entrada de estos últimos a la mitocondria (Rasmussen & cols., 2002). Además, aminoácidos con cadena ramificada (branched-chain amino acids, BCAAs) tales como leucina, isoleucina o valina,

han sido reportados como posibles reguladores de la beta oxidación (Kainulainen & cols., 2013), sugiriendo una relación metabólica entre aminoácidos y acilcarnitinas.

Además del metabolismo energético, en las últimas décadas se han descrito roles de las acilcarnitinas en diferentes vías metabólicas y procesos celulares, más allá de su función como biomarcadores, entre las que se destacan su actividad en la neuro-protección o la mitigación del estrés oxidativo, contribuyendo potencialmente al desarrollo o no de una enfermedad (Aureli & cols., 2000; Zanelli & cols., 2015). Si bien, algunos estudios en adultos han mostrado que la abundancia de acilcarnitinas es distinta entre pacientes con PKU comparados con pacientes normales, estas diferencias se han asociado a la restricción dietaria asociada al tratamiento de los pacientes.

Esta investigación se planteó como una forma retrospectiva de estudiar el fenotipo metabólico subyacente a la HPA y PKU utilizando datos metabólicos plasmáticos (obtenidos desde gotas de sangre seca) de recién nacidos (entre 2010 y 2022) chilenos ya disponibles del Programa Nacional de Pesquisa Neonatal que se realiza en el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA) de la Universidad de Chile. El foco en neonatales lactantes tuvo como propósito que la dieta no sea un factor determinante en el perfil metabólico de los pacientes estudiados. Para ello, se examinaron y compararon 45 metabolitos sanguíneos (incluyendo aminoácidos y acilcarnitinas) provenientes de los perfiles metabólicos plasmáticos de 103 pacientes con HPA/PKU y 9.594 individuos sanos. La comparación de cada metabolito entre los grupos HPA/PKU versus sanos, permitió calcular diferencias en su abundancia, actividad de procesos biológicos y relaciones más allá del metabolismo de la fenilalanina que pudieran contribuir al desarrollo de la enfermedad con consecuencias neurológicas a largo plazo.

Objetivo General

Evaluar las diferencias metabólicas entre pacientes neonatales chilenos con HPA/PKU y sujetos sanos, utilizando su perfil sanguíneo de aminoácidos y acilcarnitinas.

Objetivos específicos

- Estructurar una base de datos de mediciones sanguíneas de 45 metabolitos de pacientes chilenos obtenidas mediante espectrometría de masas en tándem.
- Examinar las características metabólicas de pacientes neonatales HPA/PKU contrastándolas con sujetos sin la enfermedad.

Materiales y métodos

3.1 Origen de los datos y procedimientos de laboratorio

Las entradas utilizadas para la estructuración de la base de datos corresponden a los resultados del perfil de aminoácidos y acilcarnitinas del análisis de espectrometría de masas en tándem (MS/MS) de muestras sanguíneas procesadas en el Laboratorio de Enfermedades Metabólicas (LEM) del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Chile entre los años 2010 y 2022. La base de datos original consistió en datos de 109.515 individuos (entradas), la cual fue posteriormente acotándose según los criterios de inclusión/exclusión y filtros realizados. Para realizar el análisis mencionado, se recolectaron gotas de sangre seca (GSS) de los individuos al nacer, mediante una punción del talón y posterior recolección con papel filtro, siguiendo los protocolos definidos por el Ministerio de Salud (Ministerio de Salud, Republica de Chile, 2007). El disco de papel filtro fue retirado y colocado en una placa multipocillo junto a una solución de trabajo y puesta en agitación a 45°C por 45 minutos a una velocidad de 750 rpm según lo descrito en protocolos anteriores utilizados en el LEM (Schulze & cols., 2003). La solución resultante fue extraída y analizada por el sistema de espectrómetro de masas en tándem Micromass Quattro Micro™ (MicroMass, Waters Corporation, Milford, EE. UU.), determinándose a partir del espectro obtenido la concentración (μM) de los analitos determinados, actividad realizada en el LEM del INTA de la Universidad de Chile.

3.2 Metabolitos obtenidos en el perfil de aminoácidos y acilcarnitinas.

Los metabolitos analizados por MS/MS bajo el programa de pesquisa neonatal ampliada corresponden a 45 biomarcadores de distintas patologías metabólicas, de los cuales 13 corresponden a aminoácidos, uno a un ácido orgánico y 31 al grupo de acilcarnitinas (incluyendo carnitina libre). Los metabolitos ordenados según su categoría se listan a continuación. Aminoácidos: alanina (Ala), arginina (Arg), ácido aspártico (Asp), citrulina (Cit), ácido glutámico

(Glu), glicina (Gly), leucina e isoleucina (Leu_Ile), metionina (Met), ornitina (Orn), fenilalanina (Phe), prolina (Pro), tirosina (Tyr), valina (Val). Ácido orgánico: succinilacetona (SuAc). Acilcarnitinas: carnitina libre (C0), acetilcarnitina (C2), propionilcarnitina (C3), butirilcarnitina (C4), 3-OH-isobutiril y malonil carnitinas (C4.OH_C3DC), 3-OH-isovaleril y metilmalonil carnitinas (C5-OH_C4DC), isovalerilcarnitina (C5), tigililcarnitina (C5:1), glutarilcarnitina (C5DC), hexanoilcarnitina (C6), metilglutarilcarnitina (C6DC), octanoilcarnitina (C8), octenoilcarnitina (C8:1), decanoilcarnitina (C10), decenoilcarnitina (C10:1), decadienoilcarnitina (C10:2), dodecanoilcarnitina (C12), dodecenoilcarnitina (C12:1), miristoilcarnitina (C14), tetradecenoilcarnitina (C14:1), tetradecadienoilcarnitina (C14:2), 3-OH-tetradecanoilcarnitina (C14-OH), hexadecanoilcarnitina (C16), 3-OH-hexadecanoilcarnitina (C16-OH), hexadecenoilcarnitina (C16:1), 3-OH-hexadecenoilcarnitina (C16:1-OH), octadecanoilcarnitina (C18), hidroxioctadecanoilcarnitina (C18-OH), octadecenoilcarnitina (C18:1), hidroxioctadecenoilcarnitina (C18:1-OH) y octadecadienilcarnitina (C18:2).

3.3 Población de estudio y criterios de inclusión de entradas utilizadas

El presente estudio se centró en individuos provenientes del programa nacional de tamizaje de recién nacidos de Chile. Por ello, dentro de los criterios de inclusión de este estudio, se utilizaron sólo las entradas que presentaran disponibles los siguientes factores: fecha de creación del informe técnico generado (perfil de aminoácidos y acilcarnitinas), fecha de nacimiento del individuo, sexo biológico definido e informado, y una diferencia menor o igual a 31 días entre la fecha de nacimiento y la fecha del informe, obteniéndose así solo la primera medición de diagnóstico (previas a la alimentación y potencial tratamiento dietario) de individuos neonatales.

Luego, para definir el grupo de individuos sanos (control o referencia), se aplicaron dos requisitos adicionales: que tanto las mediciones en sangre de fenilalanina y tirosina fueran mayores a cero, y que la concentración sanguínea de fenilalanina fuera menor a 120 µM. Por otra parte, se obtuvieron

las entradas correspondientes a individuos neonatales que presentaron un resultado positivo para fenilcetonuria o hiperfenilalaninemia, según diagnóstico clínico realizado en el Laboratorio de Enfermedades Metabólicas (LEM, parte del Centro de Diagnóstico del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, CEDINTA).

Con estos criterios de inclusión se obtuvieron 12.239 registros asociados a individuos sanos y 133 registros correspondientes a individuos con resultado positivo para HPA/PKU.

3.4 Preprocesamiento de datos

Una vez obtenidas las entradas resultantes de los criterios de inclusión, se realizó el preprocesamiento de los datos asociado a la eliminación de valores atípicos y a la imputación de los datos faltantes. La eliminación de los perfiles metabólicos con valores atípicos (valores anómalos que dentro del estudio podían implicar la presencia de otros trastornos metabólicos) se realizó utilizando una modificación del método del rango intercuartílico (IQR) para la detección de valores atípicos, con el fin de minimizar la eliminación de las escasas entradas de individuos con fenilalanina alterada. El método por IQR modificado consistió en calcular para cada metabolito la diferencia entre el percentil noventa y el percentil diez (denominado rango “inter-percentil”, IPR), y se utilizó dicha diferencia para definir los límites inferior y superior a partir de una función dada por los cuartiles de la distribución de datos (límite inferior = $Q1 - 1,5*IPR$; límite superior = $Q3 + 1,5*IPR$).

Con los límites definidos para cada metabolito, se descartaron las entradas de datos completas (el perfil de determinado individuo) si estas presentaban una medición de cualquier metabolito respectivo fuera de los límites establecidos. Esta eliminación de observaciones atípicas se realizó de forma independiente para los conjuntos de individuos sanos y con fenilalanina alterada, lo que

dio como resultado 9.594 entradas de recién nacidos sanos y 103 entradas de pacientes con HPA o PKU, para ser utilizadas en los análisis posteriores.

Por otro lado, actualizaciones en los protocolos de diagnóstico basado en espectrometría de masas en tándem a lo largo de la década incluyeron la medición de ciertos metabolitos dentro de la pesquisa neonatal, por lo cual las entradas más antiguas carecen de algunos metabolitos recientemente incluidos en los resultados. Para incluir estos registros en nuestro proceso de análisis, se utilizó una herramienta de imputación basada en árboles de decisión y en el algoritmo XGBoost (Chen & Guestrin, 2016), los que permiten determinar el valor más probable de una variable basado en una serie de decisiones dadas por el resto de las variables de manera iterativa. Esto se implementó con la función *mixgb* del paquete "mixgb" en R (versión 0.1.0; Deng & Lumley, 2023) para completar los datos ausentes.

3.5 Subdivisión de pacientes con fenilalanina elevada

Las 103 entradas de los individuos diagnosticados clínicamente por el LEM fueron divididos en dos grupos en función de sus niveles de fenilalanina sanguíneos al momento de la medición, utilizando una concentración de corte de 600 μM definida por Camp & cols. (2014), quienes diferencian a los pacientes con hiperfenilalaninemia "leve" de una fenilcetonuria "leve". Esto dio lugar a las dos clasificaciones denominadas para este estudio HPA ($120 \mu\text{M} \leq [\text{Phe}] < 600 \mu\text{M}$, $n = 40$) o PKU ($600 \mu\text{M} \leq [\text{Phe}]$, $n = 63$), nombres otorgados por la semejanza en los niveles de fenilalanina con el "grado" clínico de la enfermedad.

Para el subsecuente análisis de agrupación jerárquica, se subdividió a los pacientes en cinco rangos más acotados de concentración de fenilalanina, definidos en la ponencia mencionada anteriormente, utilizando los siguientes límites de fenilalanina plasmática: $120 \mu\text{M} \leq [\text{Phe}] < 360$

μM ; $360 \mu\text{M} \leq [\text{Phe}] < 600 \mu\text{M}$; $600 \mu\text{M} \leq [\text{Phe}] < 900 \mu\text{M}$; $900 \mu\text{M} \leq [\text{Phe}] < 1200 \mu\text{M}$; $1200 \mu\text{M} \leq [\text{Phe}]$.

3.6 Análisis estadísticos

El análisis de datos y el cálculo de medidas de tendencia central y de dispersión como la media, la mediana, y la desviación estándar se obtuvieron utilizando las funciones integradas del lenguaje de programación R (versión 4.0.5, <https://www.r-project.org/>) en el entorno de desarrollo Rstudio (<https://posit.co/>). La reducción de la dimensionalidad se llevó a cabo con el lenguaje de programación Python (versión 3.10.11; <https://www.python.org/>) en el entorno de desarrollo Visual Studio Code (versión 1.76.2; <https://code.visualstudio.com/>), mientras que los análisis de abundancia diferencial, enriquecimiento de rutas metabólicas y correlación se realizaron con paquetes específicos en el ambiente de R. Previo a los análisis, se observó la distribución de los datos para cada metabolito y se analizó su normalidad mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, observándose un comportamiento alejado al normal (p valor $< 0,05$) para todos los metabolitos. En consecuencia, todos los procedimientos estadísticos se realizaron mediante el uso de pruebas no paramétricas.

3.7 Reducción de dimensionalidad

El análisis de reducción dimensional se realizó en Python utilizando las funciones *PCA* y *t-SNE* del paquete “Scikit-Learn” (versión 1.2.0; Pedregosa & cols., 2011; van der Maaten & Hinton, 2008). Los datos se escalaron utilizando el escalado de Pareto para dar cuenta de los diferentes órdenes de magnitud en los metabolitos medidos (van den Berg & cols., 2006), y los resultados fueron visualizados mediante el paquete “plotly” (versión 5.11.0; <https://plot.ly>).

3.8 Distancias de matrices de correlación.

El análisis de correlación se realizó utilizando la función *associate* del paquete “microbiome” (mia - Microbiome analysis, 2021), realizando una prueba de correlación por rangos de Spearman para cada metabolito utilizando los conjuntos de datos de cada grupo de manera independiente (es decir, el grupo sano, HPA o PKU). Los valores p resultantes se corrigieron mediante el ajuste de la tasa de falsos descubrimientos (FDR), considerando la significancia estadística en un valor p ajustado menor a 0,05. Los cambios entre las correlaciones se calcularon como una función de distancia del error cuadrado entre los coeficientes del grupo con fenilalanina elevada y el valor del coeficiente del grupo sano. Las visualizaciones de datos no especializadas se realizaron utilizando los paquetes de R “ggplot2” (Wickham, 2016) y “ggpubr” (Kassambara, 2023).

3.9 Análisis de agrupamiento jerárquico y abundancia diferencial

Para evaluar una diferencia de abundancia entre los distintos grupos comparados, se realizó una prueba de suma de rangos de Wilcoxon para cada metabolito y los valores p resultantes se ajustaron mediante tasa de falsos descubrimientos (FDR) de Benjamini-Hochberg utilizando las funciones incorporadas de base en R. La significancia estadística fue considerada con un valor p ajustado (*p*adjust) menor a 0,05. Además, se calcularon las veces de cambio de cada metabolito utilizando la mediana de la concentración obtenida para cada categoría de individuos, y realizando la razón entre los valores del grupo con fenilalanina elevada sobre el valor del grupo sano; finalmente calculando el logaritmo en base dos de dicha razón para la visualización.

Como primera aproximación, se realizaron análisis de agrupamiento jerárquico con cinco subcategorías de pacientes con fenilalanina elevada, dividiéndolos según su concentración sanguínea de fenilalanina y utilizando las veces de cambio de cada metabolito como entradas de cada subcategoría para el cálculo del agrupamiento jerárquico. Para este análisis, si la prueba

estadística de Wilcoxon entregaba un valor p ajustado no significativo (mayor a 0,05), se ajustó el logaritmo de las veces de cambio a cero. El análisis de agrupamiento y su visualización se realizó utilizando el paquete “ComplexHeatmap” (versión 2.6.2; Gu & cols., 2016), junto con la función *hclust* del paquete “FastCluster” (versión 1.2.3) con las estrategias de método de “clustering” de distancias por coseno y distancias calculadas por el método de Ward.

Posteriormente, utilizando los grupos de pacientes con fenilalanina elevada definidos en el análisis de agrupamiento jerárquico, se recalcularon las pruebas estadísticas y las veces de cambio de cada metabolito por grupo generado. Para la visualización de los resultados de abundancia diferencial, se calculó el negativo del logaritmo en base diez del valor p previamente ajustado. Con estos resultados, se utilizó el paquete “EnhancedVolcano” (Blighe & cols, 2023) para la generación de las figuras pertinentes.

3.10 Análisis de enriquecimiento del conjunto de metabolitos (MSEA).

El análisis de enriquecimiento se realizó utilizando el paquete “MetaboAnalystR” 3.0 (Pang & cols., 2020) implementado localmente en R. Se utilizó la lista de identificadores previamente curados de la base de datos del metaboloma humano (HMDB IDs) de los metabolitos diferencialmente abundantes, los cuales son “mapeados” ante conjuntos (“sets”) determinados de metabolitos definidos a partir de estudios en pacientes humanos. El análisis de enriquecimiento se realizó contra la base de datos de Kyoto “KEGG Human Metabolic Pathways”, realizándose un análisis de sobrerrepresentación donde se determina si el número de metabolitos en un cierto set entregado es mayor que lo esperado por azar. La razón de enriquecimiento se calcula dividiendo el número de metabolitos mapeados en un set dividido por el número esperado por azar de metabolitos, y la significancia estadística se calcula mediante una prueba hipergeométrica.

3.11 Reporte del comité de ética y tratamiento de datos de pacientes neonatales chilenos

El estudio transversal realizado entre los años 2010 y 2022 mediante el uso de la medición de diagnóstico de perfiles metabólicos de recién nacidos en Chile, fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA) de la Universidad de Chile bajo el código del proyecto P3-2021 (aprobado el 20 de enero del 2021), resguardando la protección de los derechos de las personas y manteniendo la confidencialidad de los datos personales, realizando los estudios de forma anónima cambiando del nombre y RUT de los individuos por números dentro de la base de datos instaurada.

Resultados

4.1 Estructuración de la base de datos y descripción de los datos utilizados

A partir de las muestras sanguíneas de individuos chilenos obtenidas por el Laboratorio de Enfermedades Metabólicas (LEM) del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos entre los años 2010 y 2022, se compiló manualmente una base de datos relacionada con los resultados de mediciones por espectrometría de masas en tándem de 45 metabolitos, con lo que se recuperó la mayor información posible de los individuos a partir de los informes generados por dicho laboratorio. Se alcanzó un total de 109.515 perfiles metabólicos de individuos independientes (entradas) que presentaban al menos la medición de fenilalanina y tirosina dentro de los datos disponibles.

Tras el preprocesamiento de datos (aplicando los criterios de inclusión) y la eliminación de valores atípicos, se consideraron para este estudio las entradas correspondientes a 103 recién nacidos con una concentración de fenilalanina en sangre superior o igual a 120 μM al momento de la toma de muestra y posteriormente diagnosticados clínicamente con HPA o PKU; y 9.594 recién nacidos que fueron denominados sanos al presentar todos sus metabolitos al momento de toma de muestra dentro de los límites “normales” establecidos para este estudio. Para ambos grupos de estudio, el porcentaje de datos ausentes en cada metabolito (“columna”) varió entre 0 (sin valores ausentes) y 14,56%, rango dentro de lo permitido según estándares para estudios metabolómicos (datos ausentes menores al 20% de cada metabolito) (Bijlsma & cols., 2006).

Inmediatamente luego de la eliminación de valores atípicos para cada grupo, se procedió a realizar la imputación de datos ausentes mediante el uso del algoritmo XGBoost. Al comparar los valores de la media aritmética, la desviación estándar y la mediana de cada metabolito, entre los datos imputados y no imputados no se observaron diferencias en los valores mayores al 1% para cada uno de ellos. Además, se comparó mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon el conjunto

de datos imputados con los datos no imputados, donde no se observaron diferencias significativas entre los conjuntos para los diversos metabolitos.

El número de individuos respecto a sus sexos biológicos informados y la diferencia de días promedio entre el nacimiento y el diagnóstico para cada grupo se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1. Entradas admitidas luego del preprocesamiento de datos. En las columnas se categorizó a las entradas según el grupo de estudio y su sexo biológico informado, y en la fila inferior se presenta la diferencia promedio en días entre la fecha del informe generado y la fecha de nacimiento de cada individuo.

Total (n = 9.697)	Individuos sanos (Phe < 120 µM; n = 9594)		Individuos con fenilalanina elevada (Phe ≥ 120 µM; n = 103)	
Sexo informado	Femenino (n = 4683)	Masculino (n = 4911)	Femenino (n = 48)	Masculino (n = 55)
Diferencia promedio entre fecha de informe y de nacimiento (días) ± SD	8,0 ± 5,6	8,2 ± 5,8	16,7 ± 7,5	18,2 ± 6,6

Se realizó una prueba de Chi-cuadrado con las proporciones de sexo informado entre las dos categorías de grupos de estudio observadas en la Tabla 1, donde no se observó una asociación significativa entre sexo y fenilalanina elevada según los registros obtenidos (valor p = 0,65). Por otro lado, utilizando los grupos completos de individuos sanos (n = 9.594) contra los individuos con fenilalanina elevada (n = 103), se evaluó si se presentó una desigualdad significativa en la diferencia de días entre la fecha de informe y la fecha de nacimiento, observándose una diferencia en días mayor en individuos con fenilalanina elevada (valor p < 0,05), aspecto a considerar para la interpretación de resultados.

4.2 Reducción de dimensionalidad sugiere diferencias metabólicas dependiente de fenilalanina.

La primera aproximación a los datos metabólicos recopilados se realizó con un enfoque exploratorio mediante análisis no supervisados de reducciones de dimensionalidad, con la finalidad de observar la distinción entre los grupos de individuos a partir de su perfil metabólico completo. Para ello, se propuso utilizar dos acercamientos: el análisis de componentes principales (PCA) y el uso del algoritmo de incrustación de vecinos estocásticos (t-SNE). Estos análisis permiten proyectar las 45 mediciones de abundancia de metabolitos en un espacio bidimensional (para los resultados mostrados en este estudio), siendo el PCA un análisis de naturaleza lineal basada en la búsqueda de vectores propios que maximicen la varianza de los datos; mientras que el algoritmo t-SNE busca mantener la topología local de los datos, posicionando datos vecinos cercanos entre sí para generar la visualización. El objetivo de utilizar ambos análisis fue realizar una exploración inicial de la semejanza entre individuos correspondientes a los distintos grupos sin perfilar la naturaleza de las relaciones entre los metabolitos de manera anticipada. El resultado de estos análisis se muestra en la Figura 1:

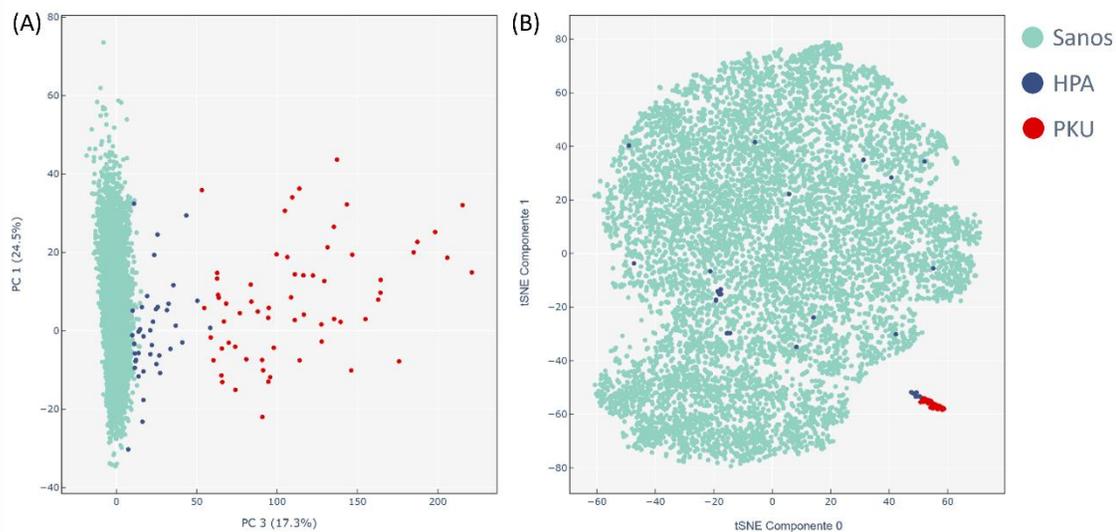


Figura 1. Análisis de reducción de dimensionalidad mediante aproximaciones lineales y no lineales. (A) Análisis de Componentes Principales (PCA) realizado con la concentración de los 45 metabolitos sanguíneos registrados. Se muestra el gráfico de puntuación del componente principales uno (PC1, eje “y”) y el componente principal tres (PC3, eje “x”), junto su porcentaje de explicación de la varianza. (B) Análisis utilizando el algoritmo de incrustación de vecinos estocásticos (t-SNE). Se muestran los dos componentes resultantes de la aplicación del algoritmo. En ambas figuras, los pacientes sanos ($\text{Phe} < 120 \mu\text{M}$; $n = 9594$) se muestran en verde claro, mientras que los individuos hiperfenilalaninemicos ($120 \mu\text{M} \leq \text{Phe} < 600 \mu\text{M}$; $n = 40$) y los fenilcetonúricos ($600 \mu\text{M} \leq \text{Phe}$, $n = 63$) se muestran en azul y rojo, respectivamente.

Como se muestra en la Figura 1; tanto del análisis PCA como del t-SNE (Figura 1, A-B) se evidenció una separación espacial entre los individuos sanos (verdes) y cada grupo de enfermedad. En el gráfico generado por el análisis PCA (Figura 1A), se observó que los componentes principales uno (PC1, 24,5%) y tres (PC3, 17,3%) permitieron explicar en su conjunto un 41,8% de la variabilidad completa de los datos, siendo el componente principal tres el que mayormente aportó a la separación de los pacientes HPA y PKU; mientras que el componente principal 2 (PC2, no

mostrado en la figura) aportó una explicación del 20,1% de la varianza. La proximidad de los individuos HPA a los pacientes sanos fue mayor que la de pacientes PKU, sugiriendo una transición entre las tres condiciones.

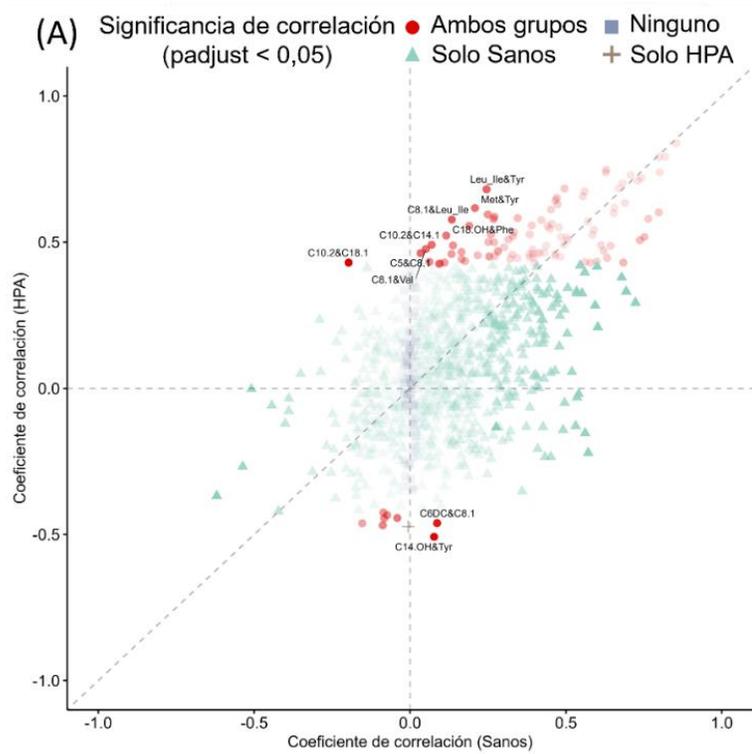
Análogamente, con el algoritmo t-SNE (Figura 1B) se observó una separación definida entre la nube de datos de individuos sanos (en verde) y pacientes PKU (en rojo), mostrando una diferencia de los perfiles metabólicos entre ambos grupos mediante otra aproximación de naturaleza no lineal. Sin embargo, utilizando dicha aproximación se encontró una superposición de ciertos individuos HPA (en azul) con los sanos, lo cual no fue observado para el análisis PCA, denotando que las abundancias sanguíneas de metabolitos en ciertos individuos HPA comparten valores similares a individuos sanos que conforman patrones no detectados al analizar las variables con un enfoque lineal.

Adicionalmente, para ambos análisis, se presentó una disposición espacial diferente para los pacientes HPA y PKU, reforzando la “transición” observada entre las tres condiciones de estudio. En su conjunto, estos datos advierten de características metabólicas subyacentes a las clases HPA y PKU que difieren de los pacientes sanos en periodos neonatales.

4.3 Cambios en las asociaciones metabolito-metabolito en HPA/PKU

Con los resultados obtenidos con aproximaciones de reducción de dimensionalidad, se propuso evaluar un potencial “ajuste metabólico” de los pacientes HPA/PKU en comparación a los controles, mediante las asociaciones de abundancia que se observan entre metabolitos. La finalidad de este análisis consistió en contrastar la “co-respuesta” diferencial de metabolitos de vías metabólicas diferentes independiente de su cercanía, en contextos de fenilalanina elevada en periodos neonatales. Para ello, se estudiaron las asociaciones entre los 45 metabolitos mediante la prueba de la suma de rangos de Spearman para los tres grupos de estudio de manera independiente

y se obtuvieron los coeficientes de correlación entre cada par de metabolitos. Se contrapusieron los coeficientes de los individuos con alta fenilalanina sanguínea contra los coeficientes obtenidos en pacientes sanos, lo que se observa en la Figura 2:



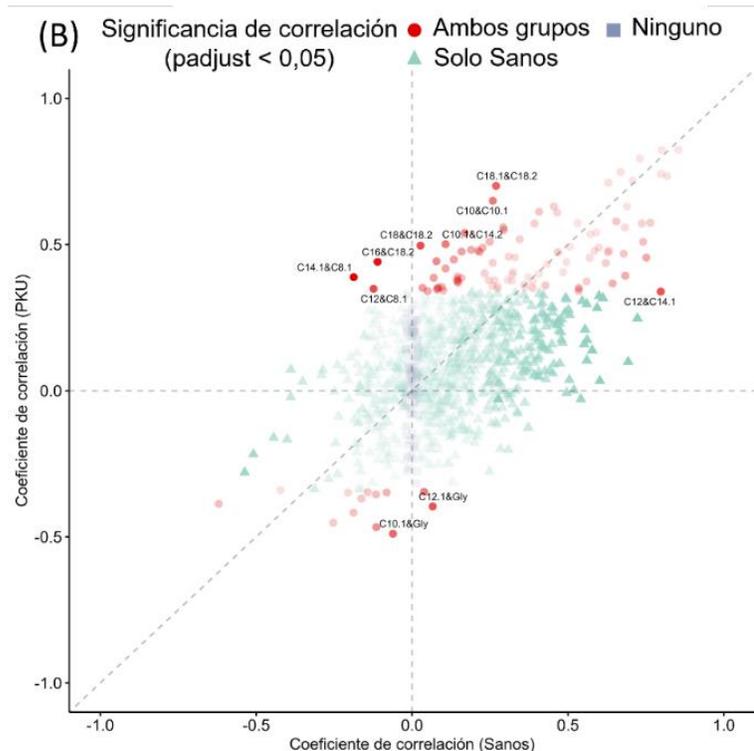


Figura 2. Correlaciones entre parejas de metabolitos mediante análisis de correlación de Spearman. El eje Y corresponde al coeficiente de correlación de rango de Spearman para un par de metabolitos utilizando los datos de individuos HPA (arriba; $n = 40$) o PKU (abajo; $n = 63$). El eje X muestra los valores del coeficiente de correlación para el grupo sano ($n = 9594$). Cada punto de datos corresponde a un par de metabolitos y sus coordenadas representan los valores de correlación según el grupo (eje). Las líneas horizontales y verticales discontinuas indican valores de coeficiente iguales a 0. La línea diagonal indica valores $x = y$, en los que no hay diferencias entre grupos. La forma y el color de los puntos indican si se alcanza significancia estadística ($p_{\text{adjust}} < 0,05$) para ambos grupos contrastados (círculos rojos), sólo para el grupo sano (triángulos verdes), sólo para el grupo HPA (cruces marrones) o para ninguno de los grupos analizados (cuadrados azules). Se muestran las etiquetas de los 10 pares (significativos para ambos grupos) con la mayor distancia euclidiana entre coeficientes. Los valores p brutos se ajustaron mediante el ajuste Benjamini-Hochberg (FDR).

Al observar la Figura 2 en el eje horizontal, para perfiles sanos se encontraron correlaciones fuertes como C16&C18 ($r = 0,85$; $p_{\text{adjust}} < 0,001$); C16&C16:1 ($r = 0,82$; $p_{\text{adjust}} < 0,001$) o C10:1&C12:1 ($r = 0,8$; $p_{\text{adjust}} < 0,001$), y un total de 116 correlaciones moderadas ($|r| \geq 0,4$; $p_{\text{adjust}} < 0,001$). En el grupo de pacientes HPA, 107 correlaciones fueron estadísticamente significativas ($p_{\text{adjust}} < 0,05$), de las cuales sólo 24 presentaban una relación moderada con coeficientes que oscilaron entre 0,59 y 0,84, siendo las parejas más relacionadas entre sí C16&C18 ($r = 0,84$; $p_{\text{adjust}} < 0,001$); C16&C16:1 ($r = 0,79$; $p_{\text{adjust}} < 0,001$) y C14&C16 ($r = 0,79$; $p_{\text{adjust}} < 0,001$). El grupo PKU mostró 112 correlaciones estadísticamente significativas ($p_{\text{adjust}} < 0,05$) y 35 de ellas presentaban una relación moderada, siendo las parejas para denotar C16&C18 ($r = 0,82$; $p_{\text{adjust}} < 0,001$); C10:1&C12:1 ($r = 0,82$; $p_{\text{adjust}} < 0,001$), C18&C18:1 ($r = 0,79$; $p_{\text{adjust}} < 0,001$) y Leucina e Isoleucina&Valina ($r = 0,74$; $p_{\text{adjust}} < 0,001$).

Observando el conjunto de correlaciones (puntos) significativos para al menos uno de los dos grupos (puntos verdes y rojos principalmente) en la Figura 2, se exhibe una mayor densidad de puntos en el cuadrante superior derecho del gráfico. Por lo tanto, la mayoría de las correlaciones encontradas entre los metabolitos independiente del grupo de estudio, corresponden a asociaciones positivas entre metabolitos.

Las matrices de correlación generadas se compararon entre cada grupo de fenilalanina elevada (HPA o PKU) frente a los individuos sanos, calculando una distancia euclidiana de cada coeficiente asociado. Esta corresponde a la diferencia entre los valores de correlación, donde un mayor valor indica una diferencia mayor para una asociación de dos metabolitos entre los grupos contrastados.

En la Figura 2, se indican con texto (etiquetas) las 10 correlaciones significativas con una mayor diferencia en HPA/PKU frente a los perfiles sanos. Para los recién nacidos HPA, las parejas C10:2&C18:1, C14-OH&Tyr y C6DC&C8:1 presentaron mayores diferencias en correlaciones al

compararlas con los pacientes sanos, mientras que para los individuos PKU fueron las asociaciones entre C14:1&C8:1, C16&C18:2 y C12&C8:1. Estas asociaciones en particular no solo mostraron las mayores diferencias en individuos HPA y PKU respecto a los valores en individuos sanos, sino que también el sentido de la asociación entre dichos metabolitos cambió, presentándose en cuadrantes de sentidos contrarios para los valores según los grupos de estudio. El resto de las asociaciones que presentaban una mayor diferencia entre los grupos de fenilalanina elevada y la contraparte de sujetos sanos, se posicionaron en cuadrantes donde la dirección de asociación entre las variables era la misma para los grupos, pero la fuerza de la correlación era mayor, generalmente para los individuos HPA/PKU.

Al observar los metabolitos partícipes en estas correlaciones diferenciales, se observó que las asociaciones de abundancias entre especies de acilcarnitinas fueron las que presentaron los cambios más grandes en contraste al grupo de individuos sanos, no así las correlaciones entre aminoácidos, insinuando que la mayor diferencia en abundancias podría estar dada en las acilcarnitinas (metabolismo de ácidos grasos) más que en el metabolismo directamente relacionado a aminoácidos. Sin embargo, aminoácidos que sí presentaron cambios en su manera de asociarse fueron tirosina y fenilalanina para el caso de los individuos HPA, encontrándose en cuatro de las diez parejas con correlaciones más diferentes contra los pacientes sanos, donde se asociaron dichos aminoácidos junto con alguna especie de acilcarnitinas. De manera contrastante, para el grupo de individuos PKU estos aminoácidos no participaron dentro de las correlaciones con mayores diferencias.

En términos generales, los cambios en la manera de asociarse metabolito a metabolito en presencia de una sobre abundancia de fenilalanina sugieren que existe un ajuste metabólico en la “co-respuesta” a este fenómeno, donde las acilcarnitinas como grupo de metabolitos podrían estar viéndose perturbadas.

4.4 Agrupación de individuos HPA/PKU a partir de sus características metabólicas

Al observarse diferencias entre los grupos con análisis de reducción de dimensionalidad, y un ajuste metabólico en las asociaciones entre metabolitos en individuos afectados con HPA o PKU, se abordó el efecto de concentraciones incrementales y las diferencias que pudieran establecer en la abundancia de los metabolitos cuantificados. Considerando aquello, se subcategorizaron los recién nacidos con un nivel anormal de fenilalanina (sobre 120 μM) en cinco grupos, utilizando límites de concentración con rangos más acotados según lo definido en materiales y métodos, sección 3.5. Luego, con cada subcategoría se examinó la abundancia diferencial para cada metabolito comparando las veces de cambio de la concentración mediana de cada subcategoría frente a los recién nacidos sanos, y evaluando mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon si las distribuciones de la concentración de los metabolitos eran significativamente diferentes. Sobre dichos resultados, se realizó una agrupación jerárquica entre subcategorías y además entre los metabolitos cuantificados. Los resultados de este experimento se reportan en la Figura 3:

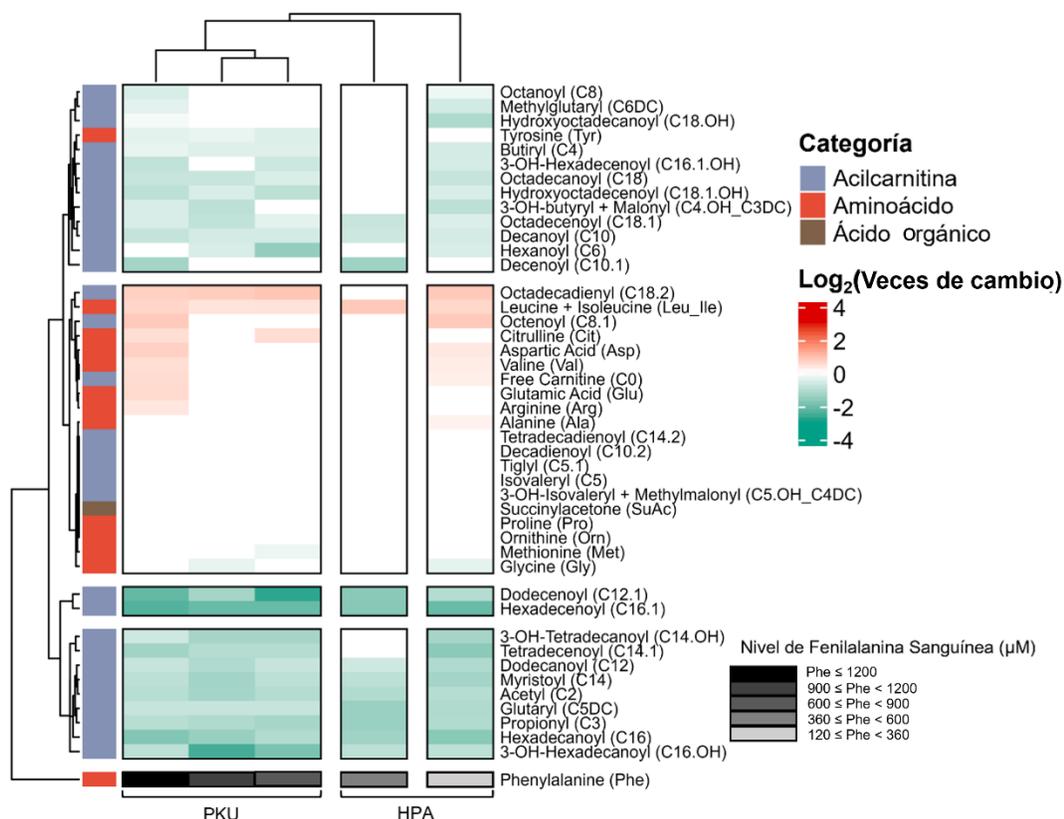


Figura 3. Agrupación jerárquica de grupos de perfiles metabólicos según su nivel de fenilalanina sanguínea en contraste a su contraparte sana. Mapa de calor de la abundancia diferencial de metabolitos comparando cada subcategoría de pacientes según su respectivo nivel de fenilalanina en sangre frente al grupo de individuos sanos. Los cuadrantes corresponden a al logaritmo en base 2 de la razón entre las medianas de cada subcategoría y la del conjunto sano (veces de cambio), donde metabolitos sobre concentrados se muestran en rojo y los infra concentrados en verde. Se realizó una agrupación jerárquica para los subgrupos y los metabolitos, mostrada por su respectivo dendrograma. La barra lateral coloreada a la izquierda del mapa de calor indica la categoría de cada metabolito, ya sea una acilcarnitina, un aminoácido o un ácido orgánico, según la leyenda a la derecha de la figura. La significación estadística se obtuvo aplicando la prueba de suma de rangos de Wilcoxon seguida del ajuste de Benjamini-Hochberg (FDR).

En los resultados reportados en la Figura 3, se muestran agrupaciones entre las subcategorías de pacientes con sobre abundancia de fenilalanina y agrupaciones de metabolitos, a partir de las veces de cambio para cada metabolito, correspondiente a los cuadrantes de colores del mapa de calor, y que fueron calculadas entre los conjuntos de individuos de cada subcategoría y el conjunto sano.

Al centrarse en la agrupación jerárquica de las subcategorías según la concentración de fenilalanina (dendrograma vertical), los resultados mostraron que, usando el perfil completo de metabolitos, los grupos con mayor abundancia de fenilalanina se agrupan en ramas del dendrograma que se desprenden de nodos cercanos entre sí (subcategorías con $600 \mu\text{M} \leq [\text{Phe}]$). La siguiente rama “cercana” se desprende de un nodo superior, y corresponde a la subcategoría de individuos con fenilalanina entre $600 \mu\text{M}$ y $360 \mu\text{M}$, mientras que la rama más lejana a las demás corresponde al grupo de individuos con niveles del aminoácido bajo $360 \mu\text{M}$, pero sobre el límite superior de normalidad de $120 \mu\text{M}$. Los resultados indicaron que al utilizar las abundancias diferenciales con todos los metabolitos cuantificados se observa una agrupación de conjuntos de individuos acorde a su concentración de fenilalanina, sugiriendo un efecto de “dosis-dependencia” de fenilalanina en el comportamiento del resto de los metabolitos, reforzando el concepto del ajuste metabólico en respuesta a la alta concentración de fenilalanina.

Por otra parte, al realizar una agrupación jerárquica de los compuestos cuantificados (dendrograma horizontal) se observaron cinco agrupaciones diferentes resultantes del análisis. En primer lugar, el aminoácido fenilalanina corresponde a la rama más lejana entre todos los metabolitos, indicando que la vez de cambio entre las subcategorías y el grupo sano fue considerablemente diferente para dicho metabolito en comparación al resto. Una segunda agrupación de metabolitos presentó una serie de metabolitos al alza en grupos de pacientes con fenilalanina elevada (color rojo) o sin cambios significativos (color blanco) con respecto al grupo de individuos sanos, en la cual se concentró la mayoría de los aminoácidos cuantificados. Por último, se presentaron tres

agrupaciones de metabolitos compuestos por distintas especies de acilcarnitinas donde la mayoría presentó una menor abundancia en grupos de individuos con fenilalanina elevada.

A pesar de que la agrupación jerárquica de individuos con fenilalanina elevada agrupó en un nodo más cercano los grupos de individuos asociados con PKU con una subcategoría perteneciente a los rangos de HPA, con estos resultados obtenidos acoplados a la información disponible en la literatura acerca de las diferentes severidades de la enfermedad, se decidió continuar con las categorías de pacientes con fenilalanina elevada previamente definidas, estableciendo el punto de corte de fenilalanina sanguínea a 600 μM para diferenciar individuos HPA de neonatos PKU.

4.5 Abundancia diferencial de metabolitos releva disparidades en HPA y PKU respecto a los sujetos sanos.

Con los grupos HPA y PKU reestablecidos para una observación robusta de los fenómenos implicados en dichas condiciones, el siguiente objetivo fue estudiar y precisar las diferencias en abundancia de los metabolitos cuantificados entre los individuos con fenilalanina elevada e individuos sanos, acercándose al fenotipo molecular comprometido en pacientes con dicha enfermedad. Los análisis de abundancia diferencial nuevamente se calcularon mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon, comparando los valores medianos de concentración de los 45 metabolitos de los individuos con HPA o PKU frente a los sanos. Los resultados de este análisis se presentan en los gráficos de volcán en la Figura 4:

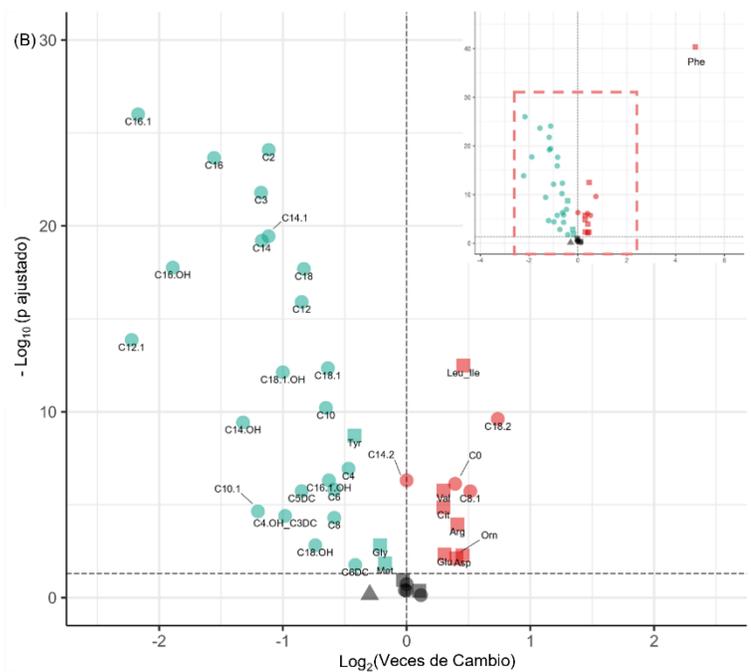
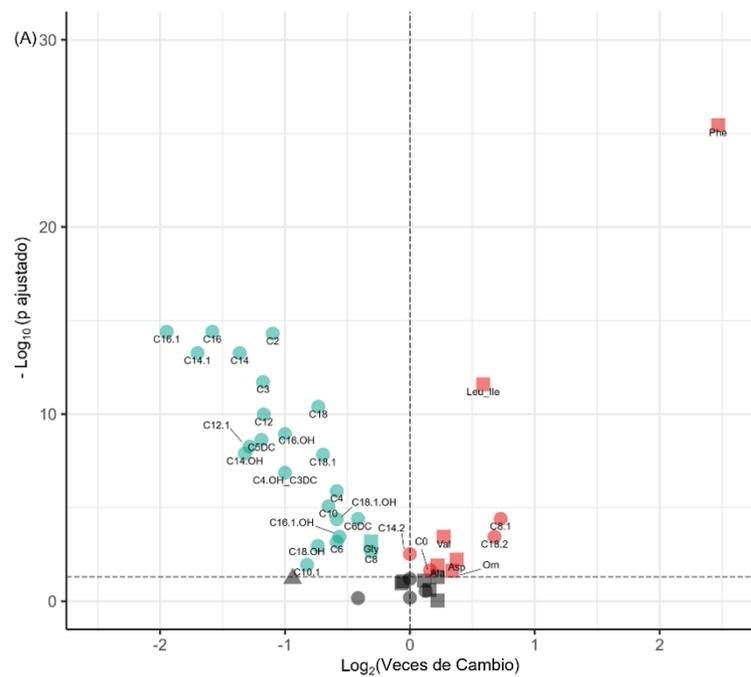


Figura 4. Análisis de abundancia diferencial de metabolitos entre individuos HPA/PKU y sanos. Diagramas de volcán de la significancia estadística (mostrada como el negativo del logaritmo en base 10 del valor p ajustado) frente a las veces de cambio (mostrado como el logaritmo en base 2 de la razón de medianas) entre pacientes HPA (A; n = 40) o PKU (B; n = 63) sobre los

individuos sanos ($n = 9594$); comparando la abundancia de 45 metabolitos sanguíneos. Los metabolitos infra concentrados aparecen en verde y los sobre concentrados en rojo. Las diferencias no significativas se muestran en negro (límite dado por la línea de puntos horizontal, $p_{\text{adjust}} > 0,05$). Los cuadrados corresponden a los aminoácidos, los círculos a las acilcarnitinas y la succinilacetona se muestra como un triángulo. El diagrama de volcán insertado en la esquina superior derecha en (B) corresponde al mismo gráfico ampliado, donde fenilalanina muestra una mayor significancia y veces de cambio en individuos PKU con respecto a sanos. La significación estadística se obtuvo aplicando la prueba de suma de rangos de Wilcoxon seguida del ajuste de Benjamini-Hochberg (FDR).

La Figura 4 muestra que existen cambios significativos en las concentraciones de 34 metabolitos en neonatos HPA y 38 para los neonatos PKU relativo a los individuos sanos. Como se esperaba, fenilalanina presentó la mayor disparidad en ambos grupos en contraste a los pacientes sanos, con veces de cambio con valores de 5,5 y 28,0 respectivamente ($p_{\text{adjust}} < 0,001$). Por el contrario, tirosina mostró niveles significativamente más bajos sólo en los recién nacidos con PKU, con una razón de cambio igual a 0,74 ($p_{\text{adjust}} < 0,001$). La mayoría de los aminoácidos presentaron cambios no significativos o cambios de abundancia al alza en ambas cohortes de fenilalanina elevada, al igual que la carnitina libre (C0).

Al contrario de carnitina libre, diversas acilcarnitinas con ácidos grasos de distintos largos de cadenas de carbono mostraron una menor abundancia en los grupos de pacientes con alto contenido en fenilalanina, manifestando un descenso generalizado de acilcarnitinas. Al comparar los valores de la sumatoria total de acilcarnitinas (no mostrada en la Figura 4) entre los grupos HPA/PKU contra el grupo de individuos sanos, se encontró una disminución generalizada de acilcarnitinas en individuos HPA/PKU (mediana HPA: 14,53 μM , mediana PKU: 14,00 μM , mediana sana: 29,425 μM). Algunas particularidades que mostraron un mayor cambio entre los grupos comparados

fueron las acilcarnitinas C16 (mediana HPA: 0,83 μM , mediana PKU: 0,84 μM , mediana saludable: 2,47 μM) y C14 (mediana HPA: 0,07 μM , mediana PKU: 0,08 μM , mediana saludable: 0,18 μM) al igual que sus variantes hidroxiladas o insaturadas, con valores medianos de concentración menores a la mitad de los registrados para individuos sanos. Además, algunas variantes como C12:1 y C16-OH presentaron niveles más bajos en el grupo PKU que en el grupo HPA. Las acilcarnitinas de cadena corta como C2 (mediana HPA: 9,36 μM , mediana PKU: 9,25 μM , mediana sana: 20,03 μM) y C3 (mediana HPA: 0,77 μM , mediana PKU: 0,77 μM , mediana sana: 1,74 μM) también aparecieron disminuidas en ambos grupos. Otras acilcarnitinas como C4, C6, C12 y C18 mostraron diferencias menores entre individuos HPA/PKU sobre los sanos, con razones de cambio menores a dos.

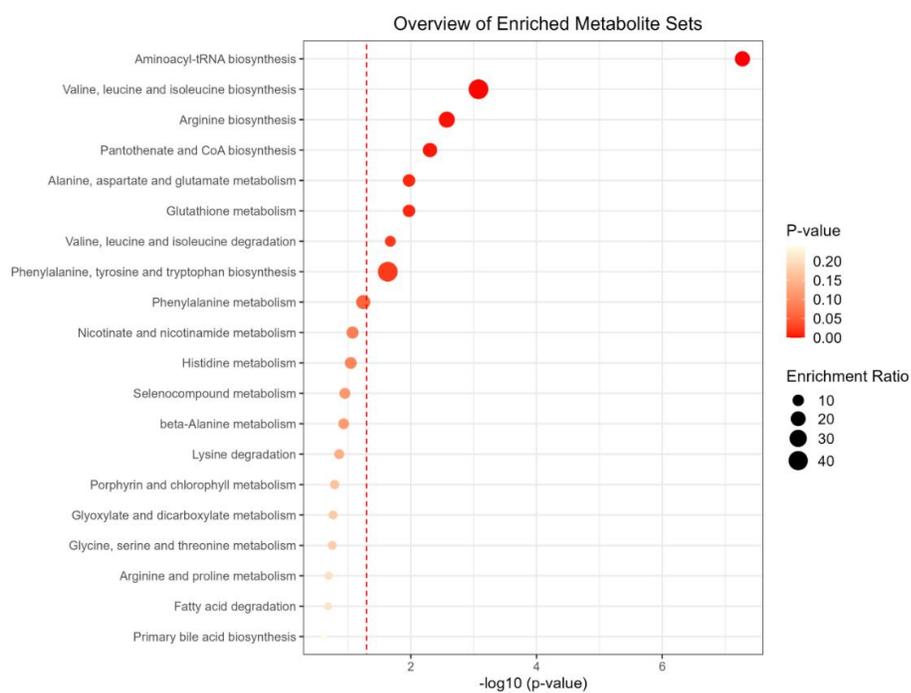
Estos resultados evidencian un ajuste metabólico en individuos con HPA/PKU, encontrándose una caída generalizada en el perfil de acilcarnitinas respecto de lo observado en individuos sanos. Estos resultados enfatizan los efectos de la alta concentración sanguínea de fenilalanina, más allá del metabolismo central de fenilalanina, en un contexto neonatal donde el efecto potencial de la dieta directa del individuo fuera menor en la explicación de este fenómeno.

4.6 Identificación de vías metabólicas moduladas por la concentración de fenilalanina

Finalmente, con el propósito de profundizar en el entendimiento de los procesos biológicos perturbados subyacentes en los ajustes metabólicos que ocurren en los pacientes con HPA y PKU, nos propusimos a determinar las vías metabólicas en las que están implicados los metabolitos diferencialmente abundantes en estos pacientes.

Para evaluar los procesos biológicos, se realizó un Análisis de Enriquecimiento de Conjuntos de Metabolitos (MSEA), utilizando cada lista de metabolitos diferencialmente abundantes presentes

en los grupos HPA o PKU de manera independiente, mediante la plataforma MetaboAnalystR. Los resultados generados utilizando dicha plataforma se muestran en la Figura 5 a continuación:



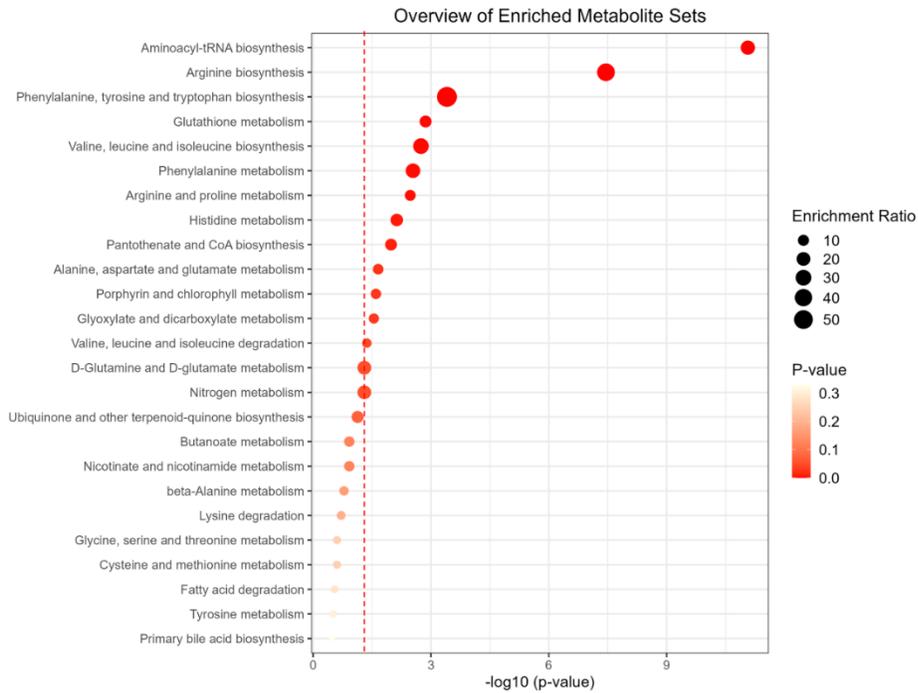


Figura 5. Resultados del análisis de enriquecimiento de conjuntos de metabolitos para pacientes HPA/PKU utilizando la plataforma MetaboAnalystR. Análisis de enriquecimiento de vías metabólicas resultante de la concentración diferencial de metabolitos en individuos HPA (arriba, 34 metabolitos) o PKU (abajo, 38 metabolitos); realizado por la herramienta de enriquecimiento de MetaboAnalystR. El eje X representa la significación estadística del enriquecimiento (dada por el negativo del logaritmo en base 10 del valor p para cada vía). El color de los puntos también representa la significación estadística, pero como valor p bruto. El tamaño de los puntos representa la proporción de enriquecimiento para cada vía metabólica. La línea vertical de puntos indica el límite de significancia estadística (valor $p < 0,05$).

Ambos análisis evidenciados en la Figura 5 mostraron al bioproceso de biosíntesis de aminoacil-ARN de transferencia (t-RNA) como predominante, con la mayor significancia estadística de enriquecimiento, resultado esperado debido al número de aminoácidos presentes en el perfil metabólico usado para los análisis y que HPA/PKU es una hiperaminoacidemia.

Los procesos relacionados a las rutas metabólicas de fenilalanina se consideraron un control positivo relevante tras realizar el análisis de enriquecimiento con los metabolitos diferencialmente abundantes para cada grupo. En el caso de los individuos HPA, un total de ocho procesos resultaron significativamente enriquecidos ($p < 0,05$), incluyendo la biosíntesis de varios aminoácidos, la biosíntesis de coenzima A (CoA) y el metabolismo relacionado con el glutatión. Los perfiles de recién nacidos PKU mostraron los mismos procesos biológicos enriquecidos significativamente mencionados con los individuos HPA, pero además los pacientes PKU presentaron otros conjuntos enriquecidos tales como el metabolismo de histidina, el metabolismo de glioxilato y carboxilato, y procesos asociados al metabolismo del nitrógeno.

Con este análisis se evidenciaron vías y procesos biológicos potencialmente perturbados en pacientes con HPA o PKU, los cuales podrían ser clave en la fisiopatología y el desarrollo a largo plazo de carácter cognitivo de esta enfermedad.

5.1 Estructuración de datos provenientes de la pesquisa neonatal ampliada en Chile

El objetivo principal de esta investigación fue evaluar el impacto metabólico que puede causar una elevación anormal de fenilalanina en la sangre en el contexto de la enfermedad fenilcetonuria, pero abordándolo desde una mirada más amplia que la convencional, explorando metabolitos y rutas metabólicas más allá de los biomarcadores característicos. Además, se propuso evaluar este impacto en un espacio temporal donde el factor de una dieta restrictiva que pacientes generalmente siguen como tratamiento no influyera en las abundancias sanguíneas de metabolitos. Todo lo anterior con la finalidad de revelar factores alterados en el metabolismo en conjunto a la alta concentración de fenilalanina en sangre, los cuales pudieran contribuir al desarrollo a largo plazo de la enfermedad y desencadenar las consecuencias neurológicas características de esta patología

Desde este propósito surge la relevancia de recopilar y utilizar los datos provenientes del programa de pesquisa neonatal ampliada actualmente implementándose en Chile, en el cual se utiliza la espectrometría de masas en tándem para detectar 26 patologías clasificadas como aminoacidopatías, acidurias orgánicas y déficits en la beta-oxidación de ácidos grasos (Cornejo E., 2017). Este programa aún se encuentra en desarrollo con la esperanza que en un futuro será aplicado para todos los recién nacidos a nivel nacional.

Desde los resultados del análisis de MS/MS de pacientes neonatales reportados en informes generados por el LEM entre los años 2010 y 2022, se propuso estructurar y compilar la cuantificación de 45 metabolitos sanguíneos en una base de datos estructurada. Luego de estructurar la información (generación de la base de datos integrada), se aplicó una serie de criterios de selección y un preprocesamiento de datos para alcanzar un total de 9.697 entradas de perfiles metabólicos neonatales para analizar (Tabla 1).

Al analizar la cantidad de individuos sanos y con fenilalanina elevada según su sexo biológico informado, se encontró que no existía una relación entre el sexo y la condición de fenilalanina elevada (prueba de Chi cuadrado, valor $p = 0,65$). Este resultado es acorde a la descripción de la enfermedad asociándose a una mutación autosómica recesiva no relacionada a los cromosomas X o Y de los individuos (Hillert & cols., 2020).

Un aspecto clave de la selección de entradas fue la “fecha” utilizada para abordar el periodo neonatal ya que, siendo un estudio retrospectivo de datos ya registrados, no se dispuso de la fecha exacta de toma de muestra de los individuos. Las fechas disponibles eran la fecha de nacimiento del individuo, y la fecha del informe generado por el LEM luego del ensayo MS/MS y del análisis de los resultados. Para estimar con robustez entradas consideradas neonatales, se utilizó como criterio de selección una diferencia no mayor a 31 días entre la fecha de informe y la fecha de nacimiento, pero dicha estimación no es precisa acerca de la toma de muestra.

Los datos mostraron cambios significativos en la diferencia promedio entre fechas, entre individuos sanos e individuos con fenilalanina elevada (Tabla 1, p valor $< 0,05$). Esto se explica por la instrucción, según la normativa establecida (Ministerio de Salud, Republica de Chile, 2007), de reanalizar una muestra que presente niveles de fenilalanina elevada realizándose nuevamente el protocolo de análisis y aplazando la generación del informe pertinente. No obstante, conocer la fecha exacta de toma de muestra cobra relevancia ya que se han reportado diferencias en la abundancia de aminoácidos y acilcarnitinas durante las dos primeras semanas de vida para individuos neonatales según la fecha exacta de toma de muestra (He & cols., 2021). Debido a la falta de precisión en los datos disponibles, es fundamental realizar futuros estudios metabólicos controlados con pacientes neonatales fenilcetonúricos donde se considere la fecha de toma de muestra como variable de importancia de recopilar.

5.2 Exploración metabólica preliminar de pacientes HPA y PKU

El enfoque propuesto para esta investigación buscó identificar y caracterizar posibles cambios en el metabolismo en un contexto de altas concentraciones de fenilalanina en la sangre. Para ello, se propuso realizar análisis de reducción de dimensionalidad tales como PCA y el uso del algoritmo t-SNE partir de los 45 metabolitos (Figura 1), permitiendo visualizar a los grupos de individuos en un plano bidimensional para observar si estos se diferenciaban espacialmente.

En los resultados a partir del PCA se obtuvo los primeros componentes principales que presentaban la mayor explicación de la varianza de los datos siendo estos el PC1 = 24,5% (eje “y” en la Figura 1A) y el PC2 = 20,0% (no presentado en la figura). Sin embargo, estos componentes no permiten observar visualmente la separación de los individuos HPA y PKU en contraste a los sujetos sanos, lo cual es probablemente explicado producto a la gran cantidad de sujetos sanos (entradas), los cuales en conjunto con la cantidad de metabolitos registrados (45) deben presentar la mayor varianza de los datos. Sin embargo, el tercer componente principal PC3, el cual explica un 17,3% de la varianza en los datos, si permite separar visualmente a los individuos con fenilalanina elevada, por lo cual fue utilizado para la primera aproximación en el análisis de los datos.

Si bien, en ambos análisis se logró identificar de manera visual una distribución diferente de los individuos HPA y PKU, el algoritmo t-SNE permitió observar una sobreposición de ciertos individuos HPA dentro de la nube de sujetos sanos. Este algoritmo en su procedimiento intenta “mantener” las estructuras más importantes de los datos mediante la optimización de una función con probabilidades condicionales (Anowar & cols., 2021), lo cual para los datos obtenidos en este estudio permite resaltar el concepto de una “transición” desde los individuos sanos hasta los sujetos fenilcetonúricos, con los HPA presentando características metabólicas intermedias entre ambos grupos.

Con estos resultados, se propuso estudiar las asociaciones entre metabolitos independiente de su cercanía en rutas metabólicas observando las perturbaciones metabólicas con la perspectiva de una red interconectada de metabolitos. Para esto, se evaluaron las posibles correlaciones que se presentaban entre los metabolitos cuantificados y contrastar los valores resultantes entre los grupos de pacientes HPA y PKU contra los individuos sanos (Figura 2).

Se reportaron una variedad de correlaciones moderadas y fuertes entre parejas de metabolitos, presentes en los tres grupos de estudio. Como se esperaba, se encontraron correlaciones fuertes entre algunas especies de acilcarnitinas, ya que forman parte de las mismas rutas metabólicas y procesos biológicos directos como el transporte de ácidos grasos entre el citoplasma y la mitocondria (McCoin & cols., 2015). Por ejemplo, se detectaron correlaciones entre las acilcarnitinas C14, C16, C18 y C2 en los tres grupos con coeficientes de correlación superiores a 0,75 ($p_{\text{adjust}} < 0,05$), lo que representa asociaciones fuertes entre dichos pares de metabolitos. Por otro lado, como un segundo resultado esperado, se observó una asociación positiva significativa entre fenilalanina y tirosina en los perfiles sanos, con un coeficiente de correlación leve. Esto no fue observado en los grupos de enfermedad HPA o PKU, en los cuales no se presentó asociación significativa alguna entre dichos metabolitos. Esta falta de una correlación significativa para dicha pareja podría deberse a la variabilidad de actividad en la enzima PAH entre los distintos pacientes HPA y PKU, impactando en diferente grado a las abundancias de dichos metabolitos en los sujetos y por ende generando una pérdida de su asociación. Este punto de nuestros resultados puede ser relevante a enfatizar en futuras investigaciones, puesto a que clínicamente la razón entre fenilalanina y tirosina se utiliza como un indicador diagnóstico de la fenilcetonuria, lo cual podría estar siendo influenciado principalmente por el valor de la abundancia de fenilalanina sin necesariamente correlacionar con el valor de abundancia de tirosina.

Cuando se analizó la asociación de ciertas especies de acilcarnitinas (como las mencionadas anteriormente C14, C16, C18 y C2) con fenilalanina, el grupo sano mostró correlaciones positivas débiles ($r \approx 0,25$; $p_{\text{adjust}} < 0,05$) en contraste tanto con la cohorte HPA como los individuos PKU, que no evidenciaron asociación significativa alguna ($r < 0,01$ & $q > 0,05$) entre acilcarnitinas y fenilalanina. La pérdida de estas correlaciones positivas débiles en los grupos HPA/PKU podría estar señalando que la elevación supra normal de fenilalanina puede estar relacionada con interacciones no descritas que regularían la abundancia de especies de acilcarnitinas.

5.3 Abundancia de aminoácidos en hiperfenilalaninemia/fenilcetonuria

Al realizar análisis de abundancia diferencial de los diversos metabolitos, ya fuera con el objetivo de agrupación de grupos de individuos (Figura 3) o evidenciar las abundancias específicas para cada metabolito (Figura 4), se observaron diferencias metabólicas a nivel sanguíneo en individuos con HPA o PKU. Estas diferencias se presentaban gradualmente, sugiriendo una transición medida que aumentaban los niveles de fenilalanina en la sangre. En esta línea, se observó un aumento significativo de la abundancia de fenilalanina, tanto en el grupo HPA como PKU, en comparación con el grupo control (Figura 3-Figura 4), lo que corresponde a un resultado esperado en función de las características de la enfermedad y de la cohorte de pacientes estudiada. Además, en el preprocesamiento de los datos y los criterios de inclusión de los perfiles metabólicos clínicamente sanos, se excluyó a cualquier individuo que excediera el límite superior establecido de fenilalanina normal ($120 \mu\text{M}$), por lo que un resultado significativo estadísticamente era esperado, pero no garantizado. Por el contrario, todos los pacientes con HPA o PKU, presentaban una concentración de fenilalanina superior a $120 \mu\text{M}$. Dicho límite se ha utilizado durante más de una década para clasificar concentraciones anormales de fenilalanina, establecido por directrices internacionales y diversos estudios sobre fenilcetonuria (Camp & cols., 2014; van Spronsen & cols., 2021). La distribución de las concentraciones de fenilalanina elevada demostró un amplio rango de

concentraciones en los pacientes con HPA o PKU, exhibiendo valores de fenilalanina sanguíneas neonatal entre 120 y 2412 μM . Este amplio rango podría explicarse por la variedad de mutaciones genéticas presentes en el gen *PAH* en la población chilena, alterando en diferentes grados la actividad residual de la enzima PAH presentes y en consecuencia generando una diversidad de fenotipos resultantes evidenciados en su concentración de fenilalanina sanguínea (Hamilton & cols., 2018; Kayaalp & cols., 1997).

Otro resultado esperado era la disminución de los niveles de tirosina en las muestras de sangre de grupos con fenilalanina acumulada, ya que dicho aminoácido es producto directo derivado desde la fenilalanina por la acción de la enzima PAH. La pérdida de función o el deterioro de esta enzima interfiere en este proceso (Gersting & cols., 2008; Pey & cols., 2007); por lo tanto, se esperaba que tirosina se presentara infra abundante en el contexto de la enfermedad confirmada. Nuestros datos muestran que sólo los pacientes con mayores concentraciones de fenilalanina (Figura 4) mostraron un cambio significativo en sus niveles de tirosina frente a los pacientes sanos. Estos niveles disminuidos no están fuera de los rangos definidos “normales” para este metabolito, lo que se ha descrito previamente para pacientes hiperfenilalaninemicos (Liang & cols., 2020), indicando patrones similares en nuestra cohorte de estudio. El hecho que este cambio solo haya sido observado en pacientes PKU podría ser explicado por la presencia de una actividad residual de la enzima PAH en el grupo HPA que diera a lugar a niveles normales de tirosina, ya que al momento de toma de muestra en los recién nacidos no existía una suplementación alimentaria particular que explicara una ingesta enriquecida de tirosina para nivelar la concentración de este metabolito.

Fuera del metabolismo de fenilalanina y tirosina, otros aminoácidos cuantificados mostraron una abundancia diferente en los individuos sanos. Tanto para recién nacidos HPA como PKU, la ornitina, el aspartato, la valina y la leucina/isoleucina se encontraron ligeramente sobreabundantes (Figura 4), siendo analitos diferenciales en común para ambos grupos. Adicionalmente, en los

individuos HPA se observó alanina ligeramente sobreabundante; mientras que en la cohorte PKU, arginina, citrulina y glutamato también se observaron sobreabundantes. La sobre abundancia significativa de aminoácidos neutros de cadena larga como valina, leucina e isoleucina también ha sido reportada previamente para individuos hiperfenilalaninemicos (Liang & cols., 2020), aunque en dicho estudio no se realizó una distinción entre individuos con niveles de Phe bajo y sobre 600 μM . Estos resultados se alinean con la competencia en el transporte de aminoácidos neutrales mediado por el transportador LAT1, descrita como posible manifestación fisiopatológica de esta enfermedad (de Groot & cols., 2010).

En cuanto a los aminoácidos que estaban disminuidos en los grupos HPA o PKU, sólo la disminución de glicina fue consistente entre ambos grupos, estando metionina sólo disminuida en el grupo PKU. Ambos aminoácidos también se encontraban dentro de los rangos normales, pero significativamente diferentes respecto a los sanos.

5.4 Disminución generalizada de acilcarnitinas

Se observó un fenómeno denominado por nuestro grupo de investigación como un “shot-down” generalizado de las distintas especies de acilcarnitinas tanto en los pacientes HPA como neonatos PKU en comparación con pacientes sanos (Figura 4), compartiendo ambos grupos de fenilalanina elevada la mayoría de las acilcarnitinas diferencialmente abundantes. Esta tendencia se encontró en acilcarnitinas independientemente de su tamaño o de las modificaciones que presenten estas cadenas, aunque las especies que mostraron mayores tasas de cambio fueron las acilcarnitinas de cadena corta (entre 2 a 5 carbonos) y larga (mayores o igual a 14 carbonos).

Autores en el año 1993 describieron un ejemplo de disminución de carnitina libre y acilcarnitinas en pacientes con PKU sobre los dos años de edad con una dieta restringida en fenilalanina (M. A. Vilaseca & cols., 1993). Estudios posteriores han descrito resultados similares en cuanto a la

disminución de los niveles de acilcarnitinas niños, adolescentes y jóvenes adultos que padecían la enfermedad y se encontraban en tratamiento, donde se reportó una menor abundancia de octanoil y decanoil carnitinas, independientemente de una suplementación adicional de carnitina libre (Weigel & cols., 2008), nuevamente atribuyendo esta disminución a las dietas restringidas de fenilalanina. Un estudio de carácter metabolómico comparativo entre pacientes fenilcetonúricos pediátricos (bajo los diez años de edad) que siguieron una dieta de tratamiento habitual restringida en proteínas contra sus controles respectivos (Mütze & cols., 2012) también mostró algunas acilcarnitinas con abundancias disminuidas respecto de pacientes sanos, efecto que también se asoció a la dieta de tratamiento.

En contraste con nuestras observaciones, los estudios anteriores mostraron una reducción de carnitina libre (C0) en individuos fenilcetonúricos frente a sus respectivos controles. En nuestro estudio, este metabolito se encontró sobreabundante para ambos grupos de fenilalanina elevada respecto a su grupo control. La falta de una dieta específica para los recién nacidos estudiados en esta investigación puede sugerir que el descenso generalizado de acilcarnitinas sea una característica intrínseca asociada a la presencia de hiperfenilalaninemia, y no una influencia de las dietas restringidas en fenilalanina que se han asociado como causa principal de este déficit. En esta línea, recientemente se reportó una disminución de acilcarnitinas y niveles elevados de carnitina libre en dos hermanos con PKU, independientemente de recibir o no un tratamiento dietético precoz para fenilcetonuria (Baturina & cols, 2019). Sin embargo, de acuerdo a nuestro conocimiento, nuestro estudio es el primero que reporta la caída de las acilcarnitinas sin una caída en carnitina libre, a nivel poblacional.

Algunos trastornos neurológicos han mostrado el mismo comportamiento con respecto a los niveles de abundancia de acilcarnitinas. Se han descrito casos de narcolepsia y fatiga crónica en los que niveles séricos de acilcarnitinas eran más bajos en los pacientes afectados que una cohorte sana

(Honda & cols., 2022; Kuratsune & cols., 1998; Miyagawa & cols., 2011). De igual manera, niveles disminuidos de algunas acilcarnitinas estaban presentes en muestras de pacientes que posteriormente desarrollarían un deterioro cognitivo leve o incluso la enfermedad de Alzheimer (Mapstone & cols., 2014). Al abordar neuropatías como Huntington, Alzheimer y Parkinson, entre otras patologías asociadas al cerebro con enfoques metabolómicos, se describieron que las acilcarnitinas como grupo de compuestos han mostrado diferencias significativas en sangre y/o tejidos cerebrales al comparar individuos con la patología en cuestión contra los individuos no enfermos o con fenotipos relativamente más saludables (Graham & cols., 2018; Huguenard & cols., 2023; Saiki & cols., 2017). Esto es clave puesto a que dichas enfermedades presentan ciertos síntomas similares a los descritos para pacientes con fenilcetonuria no controlada en etapas adultas. Aunque los metabolitos sanguíneos pueden ser el reflejo de múltiples factores que alteran sus niveles de abundancia relativa, la disminución de acilcarnitinas (especialmente las especies de cadena larga) parece ser un fenómeno consistente en varios trastornos neurológicos, desbalance que podría contribuir con el desarrollo de estas enfermedades asociadas al sistema nervioso central. Al encontrar un patrón similar de un “shot-down” generalizado de acilcarnitinas en el plasma sanguíneo de pacientes que posteriormente fueron diagnosticados con fenilcetonuria, podría contribuir a dar explicación al desarrollo de los trastornos neurológicos característicos de la enfermedad.

5.5 Procesos biológicos subyacentes bajo el fenotipo metabólico observado

Los resultados del análisis de abundancia diferencial se utilizaron de entrada para un análisis de enriquecimiento de vías metabólicas de forma independiente para cada grupo de fenilalanina elevada (Figura 5). Diversos procesos asociados con el metabolismo de aminoácidos aparecieron significativamente enriquecidos en nuestro conjunto de datos de metabolitos diferenciales, siendo el más significativo la “biosíntesis de aminoacil-tRNA”. En análisis de abundancia diferencial

realizados posteriormente (datos no mostrados), utilizando cohortes de individuos con otros aminoácidos en sobreabundancia (dentro de los cuantificados pero diferentes a fenilalanina) contra su contraparte particular sana, también apareció enriquecido este proceso en diversas ocasiones y con una de las mayores (si es que no la mayor) significancias estadísticas. Esto podría indicar que la presencia de este proceso en nuestros análisis no es una particularidad de la fenilcetonuria, y la explicación podría darse debido al mecanismo por el cual se calcula el enriquecimiento de una vía metabólica junto con la naturaleza de nuestros datos. Al tratarse este estudio con enfoque metabolómico dirigido, sólo se analizaron 45 metabolitos de los cuales 11 de estos ya corresponden a aminoácidos, por lo que encontrar algunos de estos aminoácidos diferencialmente abundantes puede ser suficiente para encontrar un enriquecimiento del proceso de biosíntesis de aminoacil-tRNA como conjunto general para la base de datos y herramienta utilizada.

Procesos enriquecidos y significativos como la biosíntesis de fenilalanina, tirosina y triptófano se consideraron relevantes como un control positivo de bioprocesos alterados para esta enfermedad, al haber encontrado para el caso de los individuos PKU tanto fenilalanina como tirosina dentro de los metabolitos diferencialmente abundantes. Entre otros procesos enriquecidos se observó una significancia para el metabolismo del glutatión. El glutatión es una molécula, partícipe del sistema antioxidante de una célula, de la cual ha sido revisada extensamente su rol en respuesta ante estrés oxidativo, y en particular se han estudiado sus funciones y su participación en enfermedades asociadas al cerebro (Bjørklund & cols., 2021; Dwivedi & cols., 2020; Iskusnykh & cols., 2022). El estrés oxidativo presente en fenilcetonuria también ha sido revisado en profundidad para la fenilcetonuria (Bortoluzzi & cols., 2021; Rausell & cols., 2019), con dos estudios que utilizaron pacientes neonatales en su aproximación experimental reportando ensayos bioquímicos y marcadores epigenéticos que indicaban un estrés oxidativo presente en dichos neonatos (Item & cols., 2017; Tavana & cols., 2016).

Si bien, los datos obtenidos en este estudio muestran el metabolismo de glutatión enriquecido, esto puede ser resultado de la mera presencia de aminoácidos en los metabolitos diferencialmente abundantes para el análisis de sobre representación realizado, y no una observación directa de respuesta ante estrés oxidativo. No obstante, diferencias en abundancia “río arriba” en los precursores de glutatión (como el caso de glicina y glutamato diferencialmente abundantes para PKU) pueden provocar diferencias en abundancia de intermediarios y productos “río abajo”, por lo que futuros estudios de carácter metabolómico no dirigido (o dirigido a moléculas asociadas a la regulación del estado oxidativo) son necesarios para abordar con mayor precisión el punto sugerido. Sin embargo, al reportarse desde distintos enfoques en la literatura que procesos asociados a la regulación del estrés oxidativo están siendo afectados en presencia de fenilalanina elevada, se sugiere que una alteración ya sea en la regulación o en los pasos relacionados a la respuesta antioxidante podría contribuir al desarrollo de la enfermedad.

5.6 Limitaciones del estudio

En cuanto a las limitaciones de este estudio, la naturaleza retrospectiva de los datos implicó que se dispuso de información demográfica limitada de los individuos pesquisados. Variables como la edad precisa (generalmente en horas o días) al momento de la extracción de la muestra sanguínea, semanas de gestación, índice de masa corporal, peso al nacer, método de parto, entre otras, son comúnmente evaluadas y reportadas en artículos publicados para pacientes neonatales; de las cuales no tenemos información, ya que, por ejemplo, la edad aproximada fue estimada según la fecha del informe generado y la fecha de nacimiento reportada. Estas covariables podrían ser relevantes para interpretaciones más precisas de los resultados dado que algunos de estos indicadores están asociados con metabolitos sanguíneos (Mansell & cols., 2022). No obstante, a pesar del posible ruido estadístico de los datos disponibles, el hecho de que múltiples acilcarnitinas (y no sólo una en particular) respondan en la misma dirección de cambio cuando se comparan

contra individuos sanos, puede indicar la presencia de un fenómeno robusto, pero es necesario realizar otras investigaciones que midan dichas covariables para verificar los resultados observados y evitar la posible particularidad de nuestro conjunto de datos.

Un hecho interesante en relación con los datos utilizados es el origen geográfico de los individuos y, por lo tanto, los rasgos genéticos únicos que también pueden contribuir en los resultados observados. Según Peng & cols. reportan (2022), es posible identificar los grupos étnicos y diferencias en los niveles de acilcarnitinas entre ellos, sólo mediante los datos derivados de la pesquisa neonatal. Por lo tanto, es necesario evaluar los niveles de individuos neonatales fenilcetonúricos con otro panorama genético para evaluar si estos resultados y el fenómeno observado son rasgos particulares de nuestra cohorte sudamericana o una observación generalizada asociada a la enfermedad en cuestión.

Otro aspecto de este estudio corresponde al tejido a partir del cual se recolectaron los datos metabólicos, ya que los datos corresponden a una medición de metabolitos a partir de gotas de sangre seca. Estudios anteriores han mostrado algunas diferencias entre los metabolitos cuantificados desde el plasma sanguíneo en comparación a las gotas de sangre seca (Van Vliet & cols., 2020), por lo que en futuros experimentos sería interesante realizar la comparación entre orígenes de muestra que podrían estar evidenciando otros aspectos no observados en el presente estudio.

Por último, los programas de pesquisa neonatal se centran en la identificación temprana de un conjunto específico de enfermedades y afecciones, de ahí el número limitado de metabolitos analizados dada su importancia como biomarcadores sanguíneos. Estos compuestos representan sólo una pequeña fracción de ciertos procesos que ocurren dentro de la célula, por lo que en este estudio no se observaron diversas funciones y vías metabólicas que pueden representar mejor el

cambio y las diferencias metabólicas producidas por la condición de hiperfenilalaninemia y la enfermedad de fenilcetonuria presentes en los pacientes recién nacidos. Una aproximación metabolómica no dirigida implementada en una etapa neonatal podría dar una perspectiva global de los procesos y alteraciones que ocurren en el contexto de la fenilcetonuria, explorando más allá de los alcances que ya han sido implementado con pacientes adultos.

En su conjunto, en este estudio fue posible observar las perturbaciones metabólicas presentes en pacientes HPA y PKU; en una cohorte neonatal de carácter poblacional en Chile en la última década. Se estudiaron 45 metabolitos relacionados al metabolismo central de aminoácidos y al metabolismo de ácidos grasos en procesos celulares relacionados a la mitocondria. Dichos metabolitos presentan diferencias de naturaleza lineal y no lineal relativos a una cohorte masiva de sujetos sanos. Además, se observaron diferencias en la abundancia de metabolitos entre pacientes con altos niveles de fenilalanina e individuos sanos desde una etapa neonatal de la vida donde no existe la influencia de una dieta diferencial. Finalmente, se asociaron una serie de procesos celulares donde participan los metabolitos con abundancia diferencial (respecto a los sanos) en sujetos HPA y PKU, los cuales, en conjunto con otros procesos no observados en este estudio, pudieran ser un factor considerable en el desarrollo de los desenlaces neurológicos característicos de la fenilcetonuria no tratada.

Conclusiones

En conclusión, la presente investigación evaluó las diferencias metabólicas encontradas en las abundancias de aminoácidos y acilcarnitinas en el período neonatal de individuos con hiperfenilalaninemia o con la enfermedad de fenilcetonuria presente. Estas alteraciones conducen a una desregulación en varios procesos asociados con el metabolismo basal de los aminoácidos, alteraciones en las vías del metabolismo energético y alteraciones en las respuestas al estrés oxidativo. Esto se evidencia principalmente por un descenso generalizado de acilcarnitinas, un fenómeno previamente asociado a la dieta restrictiva de los pacientes con PKU, pero que nuestros datos señalarían como una característica intrínseca de la patología. Estudios posteriores centrados en este aspecto en etapas neonatales de la vida podrían contribuir a dilucidar uno los factores que participe en el desarrollo de los defectos neurocognitivos característicos de la enfermedad.

Bibliografia

- Anowar, F., Sadaoui, S., & Selim, B. (2021). Conceptual and empirical comparison of dimensionality reduction algorithms (PCA, KPCA, LDA, MDS, SVD, LLE, ISOMAP, LE, ICA, t-SNE). *Computer Science Review*, *40*, 100378. <https://doi.org/10.1016/j.cosrev.2021.100378>
- Aureli, T., Di Cocco, M. E., Capuani, G., Ricciolini, R., Manetti, C., Miccheli, A., & Conti, F. (2000). Effect of long-term feeding with acetyl-L-carnitine on the age-related changes in rat brain lipid composition: A study by ³¹P NMR spectroscopy. *Neurochemical Research*, *25*(3), 395–399. <https://doi.org/10.1023/A:1007501306623>
- Bakkali, H. (2021). *Metabolomics in Phenylketonuria disease : A systematic review*. Universitat de Barcelona.
- Baturina, O. A., Chernonosov, A. A., Koval, V. V., & Morozov, I. V. (2019). Assessment of the phenylketonuria (PKU)-associated mutation p.R155H biochemical manifestations by mass spectrometry-based blood metabolite profiling. *Acta Naturae*, *11*(2), 42–46. <https://doi.org/10.32607/20758251-2019-11-2-42-46>
- Bijlsma, S., Bobeldijk, I., Verheij, E. R., Ramaker, R., Kochhar, S., Macdonald, I. A., Van Ommen, B., & Smilde, A. K. (2006). Large-scale human metabolomics studies: A strategy for data (pre-) processing and validation. *Analytical Chemistry*, *78*(2), 567–574. <https://doi.org/10.1021/ac051495j>
- Bilder, D. A., Noel, J. K., Baker, E. R., Irish, W., Chen, Y., Merilainen, M. J., Prasad, S., & Winslow, B. J. (2016). Systematic Review and Meta-Analysis of Neuropsychiatric Symptoms and Executive Functioning in Adults With Phenylketonuria. *Developmental Neuropsychology*, *41*(4), 245–260. <https://doi.org/10.1080/87565641.2016.1243109>
- Bjørklund, G., Peana, M., Maes, M., Dadar, M., & Severin, B. (2021). The glutathione system in Parkinson's disease and its progression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *120*(April 2020), 470–478. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.10.004>
- Blau, N., Van Spronsen, F. J., & Levy, H. L. (2010). Phenylketonuria. *The Lancet*, *376*(9750), 1417–1427. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60961-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60961-0)
- Blighe, K., Rana, S., & Lewis, M. (2023). *EnhancedVolcano: Publication-ready volcano plots with enhanced colouring and labeling*. (R package, version 1.18). <https://doi.org/10.18129/B9.bioc.EnhancedVolcano>
- Bortoluzzi, V. T., Dutra Filho, C. S., & Wannmacher, C. M. D. (2021). Oxidative stress in phenylketonuria—evidence from human studies and animal models, and possible implications for redox signaling. *Metabolic Brain Disease*, *36*(4), 523–543. <https://doi.org/10.1007/s11011-021-00676-w>
- Camp, K. M., Parisi, M. A., Acosta, P. B., Berry, G. T., Bilder, D. A., Blau, N., Bodamer, O. A., Brosco, J. P., Brown, C. S., Burlina, A. B., Burton, B. K., Chang, C. S., Coates, P. M., Cunningham, A. C., Dobrowolski, S. F., Ferguson, J. H., Franklin, T. D., Frazier, D. M., Grange, D. K., ... Young, J. M. (2014). Phenylketonuria scientific review conference: State of the science and future research needs. *Molecular Genetics and Metabolism*, *112*(2), 87–122. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2014.02.013>

- Cannet, C., Pilotto, A., Rocha, J. C., Schäfer, H., Spraul, M., Berg, D., Nawroth, P., Kasperk, C., Gramer, G., Haas, D., Piel, D., Kölker, S., Hoffmann, G., Freisinger, P., & Trefz, F. (2020). Lower plasma cholesterol, LDL-cholesterol and LDL-lipoprotein subclasses in adult phenylketonuria (PKU) patients compared to healthy controls: Results of NMR metabolomics investigation. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *15*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13023-020-1329-5>
- Chace, D. H., Kalas, T. A., & Naylor, E. W. (2002). The application of tandem mass spectrometry to neonatal screening for inherited disorders of intermediary metabolism. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *3*, 17–45. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.3.022502.103213>
- Chen, T., & Guestrin, C. (2016). XGBoost: A scalable tree boosting system. *Proceedings of the ACM SIGKDD International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining, 13-17-Aug*, 785–794. <https://doi.org/10.1145/2939672.2939785>
- Cornejo E., V. (2017). Avance en el programa de pesquisa neonatal y prevención de retardo mental chileno: Actualidad y proyecciones. *Revista Chilena de Nutricion*, *44*(4), 1. <https://doi.org/10.4067/s0717-75182017000400306>
- de Groot, M. J., Hoeksma, M., Blau, N., Reijngoud, D. J., & van Spronsen, F. J. (2010). Pathogenesis of cognitive dysfunction in phenylketonuria: Review of hypotheses. *Molecular Genetics and Metabolism*, *99*(SUPPL.), S86–S89. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2009.10.016>
- Deng, Y., & Lumley, T. (2023). Multiple Imputation Through XGBoost. *ArXiv*, 1–25.
- Dobrowolski, S. F., Phua, Y. L., Sudano, C., Spridik, K., Zinn, P. O., Wang, Y., Bharathi, S., Vockley, J., & Goetzman, E. (2022). Comparative metabolomics in the Pahenu2 classical PKU mouse identifies cerebral energy pathway disruption and oxidative stress. *Molecular Genetics and Metabolism*, *136*(1), 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2022.03.004>
- Dwivedi, D., Megha, K., Mishra, R., & Mandal, P. K. (2020). Glutathione in Brain: Overview of Its Conformations, Functions, Biochemical Characteristics, Quantitation and Potential Therapeutic Role in Brain Disorders. *Neurochemical Research*, *45*(7), 1461–1480. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03030-1>
- Ferreira, C. R., & van Karnebeek, C. D. M. (2019). Inborn errors of metabolism. In *Handbook of Clinical Neurology* (1st ed., Vol. 162). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64029-1.00022-9>
- Flydal, M. I., & Martinez, A. (2013). Phenylalanine hydroxylase: Function, structure, and regulation. *IUBMB Life*, *65*(4), 341–349. <https://doi.org/10.1002/iub.1150>
- Gersting, S. W., Kemter, K. F., Staudigl, M., Messing, D. D., Danecka, M. K., Lagler, F. B., Sommerhoff, C. P., Roscher, A. A., & Muntau, A. C. (2008). Loss of Function in Phenylketonuria Is Caused by Impaired Molecular Motions and Conformational Instability. *American Journal of Human Genetics*, *83*(1), 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.05.013>
- Graham, S. F., Pan, X., Yilmaz, A., Macias, S., Robinson, A., Mann, D., & Green, B. D. (2018). Targeted biochemical profiling of brain from Huntington’s disease patients reveals novel metabolic pathways of interest. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*,

1864(7), 2430–2437. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.04.012>

- Guthrie, R., & Susi, A. (1963). A SIMPLE PHENYLALANINE METHOD FOR DETECTING PHENYLKETONURIA IN LARGE POPULATIONS OF NEWBORN INFANTS. *Pediatrics*, 32(3), 338–343. <https://doi.org/10.1542/peds.32.3.338>
- Hamilton, V., Santa María, L., Fuenzalida, K., Morales, P., Desviat, L. R., Ugarte, M., Pérez, B., Cabello, J. F., & Cornejo, V. (2018). Characterization of Phenylalanine Hydroxylase Gene Mutations in Chilean PKU Patients. *JIMD Reports*, 42, 71–77. https://doi.org/10.1007/8904_2017_85
- He, F., Yang, R., Huang, X., Tian, Y., Pei, X., Bohn, M. K., Zou, L., Wang, Y., Li, H., Wang, T., Gu, M., Jiang, T., Chen, X., Zou, H., Wei, H., Tian, W., Tang, T., Adeli, K., & Wang, Z. (2021). Reference Standards for Newborn Screening of Metabolic Disorders by Tandem Mass Spectrometry: A Nationwide Study on Millions of Chinese Neonatal Populations. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8(December), 1–27. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.719866>
- Hillert, A., Anikster, Y., Belanger-Quintana, A., Burlina, A., Burton, B. K., Carducci, C., Chiesa, A. E., Christodoulou, J., Đorđević, M., Desviat, L. R., Elyahu, A., Evers, R. A. F., Fajkusova, L., Feillet, F., Bonfim-Freitas, P. E., Giżewska, M., Gundorova, P., Karall, D., Kneller, K., ... Blau, N. (2020). The Genetic Landscape and Epidemiology of Phenylketonuria. In *American Journal of Human Genetics* (Vol. 107, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2020.06.006>
- Honda, M., Shigematsu, Y., Shimada, M., Honda, Y., Tokunaga, K., & Miyagawa, T. (2022). Low carnitine palmitoyltransferase 1 activity is a risk factor for narcolepsy type 1 and other hypersomnia. *Sleep*, 45(10), 1–10. <https://doi.org/10.1093/sleep/zsac160>
- Huguenard, C. J. C., Cseresznye, A., Evans, J. E., Darcey, T., Nkiliza, A., Keegan, A. P., Luis, C., Bennett, D. A., Arvanitakis, Z., Yassine, H. N., Mullan, M., Crawford, F., & Abdullah, L. (2023). APOE ε4 and Alzheimer’s disease diagnosis associated differences in L-carnitine, GBB, TMAO, and acylcarnitines in blood and brain. *Current Research in Translational Medicine*, 71(1), 103362. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2022.103362>
- Iskusnykh, I. Y., Zakharova, A. A., & Pathak, D. (2022). Glutathione in Brain Disorders and Aging. *Molecules*, 27(1), 1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules27010324>
- Item, C. B., Escueta, S., Schanzer, A., Farhadi, S., Metz, T., Zeyda, M., Möslinger, D., Greber-Platzer, S., & Konstantopoulou, V. (2017). Demethylation of the promoter region of GPX3 in a newborn with classical phenylketonuria. *Clinical Biochemistry*, 50(3), 159–161. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.10.001>
- Kainulainen, H., Hulmi, J. J., & Kujala, U. M. (2013). Potential role of branched-chain amino acid catabolism in regulating fat oxidation. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 41(4), 194–200. <https://doi.org/10.1097/JES.0b013e3182a4e6b6>
- Kanzelmeyer, N., Tsikas, D., Chobanyan-Jürgens, K., Beckmann, B., Vaske, B., Illsinger, S., Das, A. M., & Lücke, T. (2012). Asymmetric dimethylarginine in children with homocystinuria or phenylketonuria. *Amino Acids*, 42(5), 1765–1772. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0892-4>
- Kassambara, A. (2023). *ggpubr: “ggplot2” Based Publication Ready Plots*.
- Kayaalp, E., Treacy, E., Waters, P. J., Byck, S., Nowacki, P., & Scriver, C. R. (1997). Human

- phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: A metanalysis of genotype-phenotype correlations. *American Journal of Human Genetics*, 61(6), 1309–1317. <https://doi.org/10.1086/301638>
- Koch, R., Azen, C., Friedman, E. G., & Williamson, M. L. (1984). Paired comparisons between early treated PKU children and their matched sibling controls on intelligence and school achievement test results at eight years of age. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 7(2), 86–90. <https://doi.org/10.1007/BF01805813>
- Kuratsune, H., Yamaguti, K., Lindh, G., Evengård, B., Takahashi, M., Machii, T., Matsumura, K., Takaishi, J., Kawata, S., Långström, B., Kanakura, Y., Kitani, T., & Watanabe, Y. (1998). Low levels of serum acylcarnitine in chronic fatigue syndrome and chronic hepatitis type C, but not seen in other diseases. *International Journal of Molecular Medicine*, 2(1), 51–56. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2.1.51>
- Liang, L., Ye, J., Han, L., Qiu, W., Zhang, H., Yu, Y., Zhu, T., Xu, F., Zhan, X., Bao, P., Ji, W., & Gu, X. (2020). Examining the blood amino acid status in pretherapeutic patients with hyperphenylalaninemia. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 34(3), 1–10. <https://doi.org/10.1002/jcla.23106>
- Mansell, T., Vlahos, A., Collier, F., Ponsonby, A. L., Vuillermin, P., Ellul, S., Tang, M. L. K., Burgner, D., Saffery, R., Vuillermin, P., Ponsonby, A. L., Carlin, J., Allen, K., Saffery, R., Ranganathan, S., Burgner, D., Dwyer, T., & Sly, P. (2022). The newborn metabolome: associations with gestational diabetes, sex, gestation, birth mode, and birth weight. *Pediatric Research*, 91(7), 1864–1873. <https://doi.org/10.1038/s41390-021-01672-7>
- Mapstone, M., Cheema, A. K., Fiandaca, M. S., Zhong, X., Mhyre, T. R., Macarthur, L. H., Hall, W. J., Fisher, S. G., Peterson, D. R., Haley, J. M., Nazar, M. D., Rich, S. A., Berlau, D. J., Peltz, C. B., Tan, M. T., Kawas, C. H., & Federoff, H. J. (2014). Plasma phospholipids identify antecedent memory impairment in older adults. *Nature Medicine*, 20(4), 415–418. <https://doi.org/10.1038/nm.3466>
- McCoin, C. S., Knotts, T. A., & Adams, S. H. (2015). Acylcarnitines—old actors auditioning for new roles in metabolic physiology. *Nature Reviews Endocrinology*, 11(10), 617–625. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.129>
- Ministerio de Salud Republica de Chile. (2007). Normas para el óptimo desarrollo de programas de búsqueda masiva de Fenilquetonuria [PKU] Hipotiroidismo Congénito [HC]. *Ministerio de Salud Republica de Chile*, 63. https://diprece.minsal.cl/wrdprss_minsal/wp-content/uploads/2015/10/2007_Normas-para-el-Optimo-de-búsqueda-masiva-de-Fenilquetonuria.pdf
- Miyagawa, T., Miyadera, H., Tanaka, S., Kawashima, M., Shimada, M., Honda, Y., Tokunaga, K., & Honda, M. (2011). Abnormally low serum acylcarnitine levels in narcolepsy patients. *Sleep*, 34(3). <https://doi.org/10.1093/sleep/34.3.349>
- Mütze, U., Beblo, S., Kortz, L., Matthies, C., Koletzko, B., Bruegel, M., Rohde, C., Thiery, J., Kiess, W., & Ceglarek, U. (2012). Metabolomics of dietary fatty acid restriction in patients with phenylketonuria. *PLoS ONE*, 7(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043021>
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2021). *Lehninger principles of biochemistry* (Eighth Edi). Macmillan Learning.

- Peng, G., Pakstis, A. J., Gandotra, N., Cowan, T. M., Zhao, H., Kidd, K. K., & Scharfe, C. (2022). Metabolic diversity in human populations and correlation with genetic and ancestral geographic distances. *Molecular Genetics and Metabolism*, *137*(3), 292–300. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2022.10.002>
- Pey, A. L., Stricher, F., Serrano, L., & Martinez, A. (2007). Predicted effects of missense mutations on native-state stability account for phenotypic outcome in phenylketonuria, a paradigm of misfolding diseases. *American Journal of Human Genetics*, *81*(5), 1006–1024. <https://doi.org/10.1086/521879>
- Rasmussen, B. B., Holmbäck, U. C., Volpi, E., Morio-Liondore, B., Paddon-Jones, D., & Wolfe, R. R. (2002). Malonyl coenzyme A and the regulation of functional carnitine palmitoyltransferase-1 activity and fat oxidation in human skeletal muscle. *Journal of Clinical Investigation*, *110*(11), 1687–1693. <https://doi.org/10.1172/JCI0215715>
- Rausell, D., García-Blanco, A., Correcher, P., Vitoria, I., Vento, M., & Cháfer-Pericás, C. (2019). Newly validated biomarkers of brain damage may shed light into the role of oxidative stress in the pathophysiology of neurocognitive impairment in dietary restricted phenylketonuria patients. *Pediatric Research*, *85*(2), 242–250. <https://doi.org/10.1038/s41390-018-0202-x>
- Saiki, S., Hatano, T., Fujimaki, M., Ishikawa, K. I., Mori, A., Oji, Y., Okuzumi, A., Fukuhara, T., Koinuma, T., Imamichi, Y., Nagumo, M., Furuya, N., Nojiri, S., Amo, T., Yamashiro, K., & Hattori, N. (2017). Decreased long-chain acylcarnitines from insufficient β -oxidation as potential early diagnostic markers for Parkinson's disease. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06767-y>
- Schulze, A., Lindner, M., Kohlmu, D., & Olgemo, K. (2003). Expanded Newborn Screening for Inborn Errors of Metabolism by Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry: Results, Outcome, and Implications. *Pediatrics*, *111*(6), 1399–1406.
- Tavana, S., Amini, S., Hakhamaneshi, M. S., Andalibi, P., Hajir, M. S., Ardalan, A., Abdi, M., & Fathollahpour, A. (2016). Prooxidant-antioxidant balance in patients with phenylketonuria and its correlation to biochemical and hematological parameters. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, *29*(6), 675–680. <https://doi.org/10.1515/jpem-2015-0398>
- van Spronsen, F. J., Blau, N., Harding, C., Burlina, A., Longo, N., & Bosch, A. M. (2021). Phenylketonuria. *Nature Reviews Disease Primers*, *7*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00267-0>
- Van Vliet, K., Van Ginkel, W. G., Van Dam, E., De Blaauw, P., Koehorst, M., Kingma, H. A., Van Spronsen, F. J., & Heiner-Fokkema, M. R. (2020). Dried blood spot versus venous blood sampling for phenylalanine and tyrosine. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *15*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13023-020-1343-7>
- Vilaseca, M. A., Briones, P., Ferrer, I., Campistol, J., Riverola, A., Castillo, P., & Ramon, F. (1993). Controlled diet in phenylketonuria may cause serum carnitine deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *16*(1), 101–104. <https://doi.org/10.1007/BF00711322>
- Vilaseca, Maria A., Lambruschini, N., Gómez-López, L., Gutiérrez, A., Moreno, J., Tondo, M., Artuch, R., & Campistol, J. (2010). Long-chain polyunsaturated fatty acid status in phenylketonuric patients treated with tetrahydrobiopterin. *Clinical Biochemistry*, *43*(4–5), 411–415. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2009.11.013>

- Weigel, C., Kiener, C., Meier, N., Schmid, P., Rauh, M., Rascher, W., & Knerr, I. (2008). Carnitine status in early-treated children, adolescents and young adults with phenylketonuria on low phenylalanine diets. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 53(2), 91–95. <https://doi.org/10.1159/000165356>
- White, D. A., Nortz, M. J., Mandernach, T., Huntington, K., & Steiner, R. D. (2002). Age-related working memory impairments in children with prefrontal dysfunction associated with phenylketonuria. *Journal of the International Neuropsychological Society*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1017/S1355617702811018>
- Wickham, H. (2016). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York. In *Media* (Vol. 35, Issue July). <http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-98141-3>
- Yi, S. H. L., Kable, J. A., Evatt, M. L., & Singh, R. H. (2011). A cross-sectional study of docosahexaenoic acid status and cognitive outcomes in females of reproductive age with phenylketonuria. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 34(2), 455–463. <https://doi.org/10.1007/s10545-011-9277-9>
- Zanelli, S. A., Solenski, N. J., Rosenthal, R. E., & Fiskum, G. (2015). Mechanisms of Ischemic Neuroprotection by Acetyl-L-carnitine. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1053, 153–161. <https://doi.org/doi:10.1196/annals.1344.013>