

Il ruolo della metabolomica nella diagnosi e nel monitoraggio delle malattie metaboliche ereditarie

Michele Mussap¹, Marco Zaffanello², Vassilios Fanos³

¹Medicina di Laboratorio, Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Università di Cagliari, Cagliari Italia

²Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Odontoiatriche, Ginecologiche e Pediatriche, Università di Verona, Italia

³Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Unità di Terapia Intensiva Neonatale, Istituto di Puericultura, Sezione Neonatale, Università di Cagliari, Italia

Traduzione a cura di Roberta Pintus (Cagliari)

ABSTRACT

Metabolomics: a challenge for detecting and monitoring inborn errors of metabolism. Timely newborn screening and genetic profile are crucial in early recognition and treatment of inborn errors of metabolism (IEMs). A proposed nosology of IEMs has inserted 1015 well-characterized IEMs causing alterations in specific metabolic pathways. With the increasing expansion of metabolomics in the clinical biochemistry and laboratory medicine communities, several research groups have focused their interest the analysis of metabolites and their interconnections in IEMs. Metabolomics has the property to extend metabolic information leading to achieve an accurate diagnosis for an individual patient and to discover novel IEMs. Structural and functional information on 247 metabolites associated with 147 IEMs and 202 metabolic pathways involved in various IEMs have been reported in the human metabolome data base (HMDB). For each metabolic gene, a new computational approach can be developed for predicting a set of metabolites that are expected to change their concentration in urine, blood and other biological fluids after gene knockout. Both the targeted and the untargeted mass spectrometry (MS)-based metabolomic approaches have been used to expand the range of disease-associate metabolites. The quantitative targeted approach, in conjunction with chemometrics, can be considered a basic tool for validating known diagnostic biomarkers in various metabolic disorders. The untargeted approach increases the identification of new biomarkers in known IEMs and allows pathways analysis. Urine is an ideal biological fluid for metabolomics in neonatology; however, the lack of standardization of the preanalytical phase may originate potential interferences in metabolomic studies. Integrating genomic with metabolomic data represents the current challenge for improving diagnosis and prognosis of IEMs. The goals consist of the identification of both metabolically active loci and genes relevant to a disease phenotype, that means deriving disease-specific biological insights.

INTRODUZIONE

Il concetto di malattie metaboliche ereditarie, definite anche errori congeniti del metabolismo (ECM) fu introdotto nel 1908 da Sir Archibald E. Garrod, un medico inglese che descrisse in alcuni pazienti la presenza di quattro malattie trasmesse geneticamente:

alcaptonuria, albinismo, cisteinuria e pentosuria (1). Egli intuì che queste malattie permangono tutta la vita e sono causate da specifici deficit parziali o totali di attività enzimatiche. Ciò comporta il blocco parziale o totale di specifiche vie metaboliche, con varie conseguenze, tra cui: deficit di biosintesi di prodotti terminali, accumulo di precursori o prodotti intermedi delle vie metaboliche e

Questo articolo è la traduzione di Metabolomics: a challenge for detecting and monitoring inborn errors of metabolism. Ann Transl Med 2018;6:338 con il permesso dell'Editore. L'articolo originale è disponibile come materiale supplementare (1S). Annals of Translational Medicine non è responsabile della accuratezza della traduzione. In caso di citazione, riferirsi alla pubblicazione originale.

Corrispondenza a: Michele Mussap, Medicina di Laboratorio, Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Università di Cagliari, Cagliari Italia. E-mail michele.mussap@unica.it

Ricevuto: 03.01.2019

Accettato: 03.01.2019

Pubblicato on-line: 22.01.2019

DOI: 10.19186/BC_2019.002

alterazioni di molecole complesse. Le patologie correlate a questi difetti sono spesso caratterizzate da intossicazioni o da deficit energetici. Garrod introdusse un concetto del tutto innovativo per la sua epoca, quello di "individualità chimica", dimostrando una visione pionieristica della biologia dei sistemi (2). Questa sua peculiare visione fu di enorme importanza nel trasferire il concetto di individualità chimica in una visione dinamica delle malattie ereditarie e dei difetti congeniti del metabolismo, includendo fattori genetici e non. Oggi questa visione si traduce nello studio delle interrelazioni tra genetica, epigenetica, proteomica e metabolomica. Garrod ipotizzò che ogni singolo enzima sia controllato da un solo gene; curiosamente, all'epoca di Garrod non si conosceva la natura proteica degli enzimi. L'importanza delle teorie di Garrod è stata a lungo sottovalutata per vari motivi. Anzitutto all'epoca di Garrod le cure mediche disponibili non traevano alcun beneficio sostanziale dalla scoperta della natura ereditaria di queste malattie. Inoltre, la loro prevalenza apparentemente bassa indusse la medicina dell'epoca a considerarle clinicamente irrilevanti. Oggi, in base alla definizione di malattia rara (3), la prevalenza delle malattie metaboliche ereditarie è individualmente rara; tuttavia, se si considera la prevalenza globale di queste malattie, si raggiunge una stima di circa 1 caso ogni 1000 persone sane (4). Anche i genetisti sottovalutarono le scoperte di Garrod, a causa della loro limitata conoscenza sia dei principi mendeliani che della struttura dei geni. Probabilmente, l'ostacolo più rilevante per la diffusione pervasiva della teoria di Garrod fu l'influenza dominante della scuola dei biometristi che agli inizi del XX secolo si contrapposero per circa 20 lunghi anni alla scuola dei mendeliani, fino alla formulazione della celebre opera integrativa sintesi moderna, che finalmente coniugò la genetica con l'evoluzione (5). Nella seconda edizione del volume "Errori congeniti del metabolismo", pubblicata da Garrod nel 1923, furono descritti due ulteriori malattie metaboliche ereditarie: la porfiria eritropoietica congenita e la steatorrea congenita (6). Da allora, sono state descritte centinaia di malattie metaboliche ereditarie. In base a criteri molto rigorosi, recentemente sono stati definiti 1015 ECM, causa di alterazioni in specifiche vie metaboliche; ulteriori 111 potrebbero essere aggiunti, ma non rispettano ancora tutti i criteri di inclusione in questa classificazione sistematica (7). Le malattie metaboliche ereditarie rappresentano circa l'80% delle cosiddette malattie rare (orfane), nonostante la loro prevalenza sia molto variabile, da 25:100.000 per l'ipotiroidismo congenito a 0,4:100.000 per la malattia delle urine a sciroppo d'acero (chetoaciduria a catena ramificata). Nella maggior parte dei casi, sono presenti difetti negli enzimi e nelle proteine di trasporto, che causano o una produzione inadeguata di intermedi metabolici ad alta energia, ormoni, proteine,

lipidi, metaboliti e altre sostanze fondamentali, o un accumulo di metaboliti tossici. A causa della loro considerevole eterogeneità, le malattie metaboliche ereditarie possono essere classificate con vari criteri; molti di quelli presenti in letteratura sono basati sul tipo di caratteristiche cliniche, sulla fisiopatologia, sul tipo di enzima o di organello cellulare coinvolti e su altri criteri. In definitiva, non esiste un sistema universale di classificazione. La Società per lo Studio degli Errori Congeniti del Metabolismo (SSIEMs) ha raggruppato le malattie metaboliche ereditarie in gruppi omogenei di malattie caratterizzate da alterazioni della stessa via metabolica, individuate con la stessa metodologia diagnostica, e trattate con gli stessi protocolli terapeutici in emergenza e nel monitoraggio a lungo termine (8). Una recente classificazione divide le malattie metaboliche ereditarie in due ampie categorie: (a) quelle che interessano un unico sistema funzionale o un unico organo; (b) quelle caratterizzate da alterazioni biochimiche o di una via metabolica comune a un ampio numero di cellule/organi, o limitate ad un organo specifico, ma causa di disturbi e disfunzioni sistemiche (9). Queste ultime sono state ulteriormente suddivise in tre sottogruppi: disordini del metabolismo intermedio che interessano piccole molecole; disordini che riguardano principalmente il metabolismo energetico; disordini che coinvolgono molecole complesse (Tabella 1).

IL LABORATORIO NELLO SCREENING DELLE MALATTIE METABOLICHE EREDITARIE

Lo screening neonatale tempestivo e il profilo genetico sono due strumenti strategici per il riconoscimento precoce e il trattamento immediato degli ECM. Nella maggior parte dei Paesi sviluppati, e in vari Paesi in via di sviluppo, ogni neonato è sottoposto a screening attraverso un test su goccia di sangue essiccato su cartoncino ("Dry Blood Spot" - DBS). Un ritardo diagnostico può avere conseguenze molto gravi e comportare scompensi metabolici acuti, danni neurologici progressivi, o addirittura morte del neonato. L'approccio laboratoristico per gli screening neonatali può essere riassunto schematicamente in 4 fasi: (a) un test di screening metabolico generale; (b) determinazioni di specifici metaboliti; (c) studi sugli enzimi coinvolti; (d) test genetici di analisi del DNA. Dal momento della loro introduzione nei piani nazionali di prevenzione, i programmi di screening neonatali si sono allargati a molte malattie fino ad includerne più di 50, comprese le aminoacidopatie, le acidemie organiche, i disordini dell'ossidazione degli acidi grassi, e le malattie da accumulo lisosomiale. La diagnosi definitiva è basata su esami più specialistici, come ad esempio il profilo di aminoacidi, acilcarnitina, acidi grassi liberi, piruvato,

¹In Italia la Legge n.167 del 19.08.2016 ha reso obbligatorio lo screening neonatale metabolico allargato, che deve essere effettuato su tutti i nuovi nati, indipendentemente dalla nazionalità e dal centro di nascita pubblico, privato o a domicilio (NDT).

Tabella 1

Classificazione degli errori congeniti del metabolismo (ECM) ristretti ad un organo ma con coinvolgimento sistemico [modificata da Saudbray JM, et al. (9)]

Errori congeniti del metabolismo, categoria 2:

A. Disordini del metabolismo intermedio che coinvolgono piccole molecole

Catabolismo degli aminoacidi

La maggior parte delle acidurie organiche

Difetti del ciclo dell'urea

Difetti del galattosio e del fruttosio

Porfirie

Disordini dei metalli

Sintesi dei neurotrasmettitori

Sintesi degli aminoacidi del cervello

B. Disordini che coinvolgono elettivamente il metabolismo energetico

Deficit del trasportatore cerebrale del glucosio

Deficit del trasportatore epato-intestinale del glucosio

Difetti mitocondriali

Difetti del metabolismo energetico citoplasmatico

C. Disordini che coinvolgono molecole complesse

Malattie da accumulo lisosomiale

Disordini perossisomiali

Sindrome da glicoproteina con deficit di contenuto in carboidrati

Purine e pirimidine

Sintesi del colesterolo e degli acidi biliari

Trigliceridi intracellulari, fosfolipidi, sintesi e rimodellamento dei glicosfingolipidi

acetoacetato, 3-idrossibutirrato, mucopolisaccaridi e oligosaccaridi, nonché determinazioni di attività enzimatiche, funzionali, e analisi mutazionali¹. Nel 1980, la spettrometria di massa tandem (MS/MS) è stata introdotta come metodo di riferimento per lo screening neonatale, grazie alla sua capacità di individuare un ampio spettro di ECM che in precedenza non erano riconosciuti con il test su goccia di sangue essiccato. Attualmente, la MS/MS è usata in routine per lo screening neonatale degli ECM; si tratta di un metodo rapido, altamente sensibile e specifico, che richiede volumi di campione molto bassi, e che possiede un'elevata efficienza. Nel 2004 fu lanciato un progetto collaborativo, chiamato "Region 4 Stork" (R4S), considerato un obiettivo prioritario di un progetto più vasto ("Regional Genetics Collaborative Project") finanziato dall'agenzia federale americana "U.S. Health Resource and Service Administration" (HRSA). Gli scopi principali furono di facilitare l'introduzione universale dello screening neonatale con la MS/MS e di eseguire gli esami di conferma, allo scopo di migliorare la qualità analitica dello screening neonatale esteso (10). Il progetto conteneva altri tre obiettivi: (a) uniformare i

pannelli di test eseguiti in MS/MS, allargando al massimo il riconoscimento di neonati con malattia metabolica ereditaria; (b) migliorare le prestazioni analitiche; (c) raggiungere e mantenere le quote più basse possibili di risultati falsi negativi e falsi positivi (11). Il vero catalizzatore di questo progetto è un software che consente l'analisi multivariata per il riconoscimento e la classificazione di profili metabolici complessi ("Collaborative Laboratory Integrated Reports" - CLIR) e che quindi migliora significativamente le interpretazioni post-analitiche (12). Grazie a questo supporto sono stati identificati 114 biomarcatori da introdurre nello screening neonatale (13). Nel 2012, il database R4S è diventato parte del "Newborn Screening Transnational Research Network", un'iniziativa finanziata dal "National Institute of Child Health and Human Development" (NICHD).

METABOLOMICA, METABOLITI E METABOLOMA

Metabolomica e metabolismo hanno una radice comune "μεταβολή" (metàbole), che in greco significa cambiamento. Il termine metabolomica, che definisce

l'analisi globale delle piccole molecole coinvolte nelle vie metaboliche degli organismi viventi, è stato coniato da Oliver Fiehn nel 2002 (14). Attraverso l'uso di tecnologie ad elevata efficienza, la metabolomica permette di identificare e quantificare i metaboliti presenti in un campione biologico. In precedenza era stato introdotto il termine metabonomica, che a sua volta definisce l'analisi della risposta dinamica metabolica alle variazioni biochimico-fisiche che si susseguono nel tempo nei sistemi viventi attraverso l'uso di appropriate tecniche analitiche e specifici approcci statistici (15). Tuttavia, nella maggior parte dei lavori scientifici della letteratura, metabolomica e metabonomica sono usati in modo quasi completamente intercambiabile, sia perché le loro definizioni sono in gran parte sovrapponibili, sia perché i metodi analitici e i modelli statistici sono gli stessi (16). Con il termine metabolita si identificano tutte le molecole con peso molecolare inferiore a circa 1800 Dalton. I metaboliti sono substrati o prodotti che fanno parte delle vie metaboliche (17). Metaboliti endogeni come lipidi, glucidi e aminoacidi derivano dal metabolismo cellulare ed entrano nei processi di trasferimento energetico o in quelli di comunicazione intercellulare. In un sistema biologico, i metaboliti sono soggetti a cambiamenti repentini della loro concentrazione e della loro combinazione all'interno del sistema, in risposta a cambiamenti fisiopatologici e a trattamenti terapeutici. Per questi motivi, i metaboliti sono una preziosa e puntuale fonte di informazione, consentendo di individuare alterazioni nei cicli metabolici alterati da processi patologici o da terapie in atto. In senso lato, la metabolomica si può considerare una delle più antiche scienze mediche e biologiche. Nell'antica Grecia, all'odore e sapore dolciastrici delle urine, era stata associata la presenza di glucosio, un metabolita che nei soggetti diabetici conferisce al liquido biologico questa proprietà organolettica. Nei moderni laboratori clinici, la maggior parte degli esami eseguiti in routine consiste nella misura della concentrazione di metaboliti nel sangue e nell'urina, come ad esempio acido urico, glucosio, creatinina e così via. Questo modello tradizionale, ancorché valido e basato sull'ipotesi diagnostica, è un approccio riduzionistico, perché non permette né la completa caratterizzazione molecolare di un sistema biologico, né un'analisi sistematica delle complesse interrelazioni funzionali tra i vari metaboliti. D'altra parte, la metabolomica offre una visione olistica integrata "top-down" della biochimica negli organismi complessi. Ciò delimita una fondamentale differenza tra l'attuale valutazione dei singoli costituenti biochimici e l'analisi dell'intero insieme di metaboliti rinvenibili in un liquido biologico, in una cellula o in un estratto di tessuto, cioè in altre parole consente la caratterizzazione del profilo metabolico. Quest'ultimo fornisce una visione dettagliata del "network" metabolico e della sua dinamicità, offrendo una mole di dati biochimici che possono essere analizzati e interpretati, e dimostrando che il tutto è più della semplice somma delle parti come sostenne Aristotele più di duemila anni fa (18). Nel 1998, Oliver coniò il termine metaboloma, definendolo la

somma olistica quantitativa dei metaboliti in un determinato campione biologico (19). In seguito, la definizione è stata modificata, e il metaboloma è stato ridefinito come il fenotipo molecolare che deriva dall'interazione tra il genotipo e l'ambiente circostante (20). Il metaboloma rappresenta l'impronta digitale molecolare di un liquido biologico o di un tessuto, ed è dinamico, perché varia nel tempo. Modificazioni nella composizione, nella concentrazione e nelle interazioni tra metaboliti dipendono dallo sviluppo di complesse influenze reciproche tra i vari organi, l'ambiente e il microbioma. Nonostante il termine ambiente comprenda un ampio spettro di definizioni, si può riassumere che per ambiente si intendono tutti i fattori non genetici che influenzano l'omeostasi delle reazioni biochimiche sequenziali nelle vie metaboliche.

METODI ANALITICI IN METABOLOMICA

Il metaboloma umano possiede un alto grado di complessità e pertanto richiede l'uso di piattaforme analitiche, metodi e analisi dei dati specifici molto più sofisticati se confrontati con quelli usati per le altre scienze omiche. Infatti, genomica, trascrittomica e proteomica consistono nello studio di grandi molecole (DNA, RNA, proteine) costituite da unità semplici, rispettivamente nucleotidi e aminoacidi per acidi nucleici e proteine. Ne consegue che ciò che conta per l'identificazione e l'analisi funzionale di DNA, RNA e proteine è la sequenza di nucleotidi e aminoacidi lungo la catena molecolare, strettamente correlata alla corrispondente informazione biologica. Al contrario, per l'analisi del metaboloma non può esistere un approccio sequenziale; i metaboliti devono essere individuati e differenziati singolarmente e selettivamente; inoltre, il riconoscimento e l'analisi quantitativa dei metaboliti è resa complessa dall'ampio ambito di variabilità molecolare qualitativa e quantitativa (21). Non meno rilevante è la diversità tra i vari metaboliti, sia a livello individuale che in gruppo, dovuta alle loro diverse proprietà chimico-fisiche. Questo elevato grado di variabilità costituisce la maggiore criticità analitica e interpretativa della metabolomica. I metodi più usati, in grado di ricavare ampie basi di dati strutturati da una complessa miscela di metaboliti presenti in un liquido o tessuto biologico, sono la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare ("Nuclear Magnetic Resonance" - NMR) e la spettrometria di massa ("Mass Spectrometry" - MS). L'NMR misura una proprietà magnetica intrinseca dei nuclei atomici, cioè lo spin (22). L'approccio NMR più comunemente usato negli studi di metabolomica è la spettroscopia NMR del protone ($^1\text{H-NMR}$). Questo metodo possiede diversi vantaggi (23), tra cui il più importante è l'assenza di pretrattamenti specifici del campione, come la derivatizzazione. In tal modo si evita la manipolazione del campione e la potenziale alterazione, anche parziale, della struttura dei metaboliti; inoltre si riducono eventuali interferenze dovute alla co-migratazione di metaboliti usati nella fase preparativa del campione. Ulteriori vantaggi derivano dai tempi analitici

ridotti, da un ampio potere discriminante delle classi chimiche e da un'elevata riproducibilità dei risultati. La MS è molto diffusa negli studi di metabolomica, perché meno costosa della NMR, più semplice da usare e molto più sensibile, il che permette di riconoscere e misurare quantità molto basse di metaboliti e di caratterizzare fenotipi molecolari complessi. Negli studi di metabolomica basati sulla MS si possono usare due approcci principali: l'iniezione diretta del campione biologico nella sorgente di ionizzazione dello spettrometro di massa (questo metodo è usato raramente); MS associata a tecniche separative ad alta risoluzione come la cromatografia liquida (LC-MS), la gas cromatografia (GC-MS) e l'elettroforesi capillare (CE-MS). Questi metodi di separazione preventivi riducono la complessità degli spettri di massa, fornendo ulteriori informazioni sulle proprietà fisico-chimiche dei metaboliti. Il metodo d'infusione diretta ha il vantaggio di essere molto utile per quantificare i metaboliti nelle miscele complesse. Ciononostante, può indurre una massiva soppressione ionica, impedendo la separazione dei composti isobarici e isomerici (24). Attualmente, la LC-MS è la combinazione più largamente usata per il profilo mirato sia dei composti polari che di quelli non polari; la CE-MS è utile per l'analisi di metaboliti polari, mentre la GC-MS è utile nell'analisi dei metaboliti volatili nativi o di quelli resi volatili dopo derivatizzazione chimica (25). La cromatografia liquida a ultra prestazione ("Ultra Performance Liquid Chromatography" -UPLC) e la cromatografia a fluido supercritico (Supercritical Fluid Chromatography - SFC) accoppiate alla MS hanno migliorato l'efficienza e la sensibilità analitica. In particolare, l'uso di queste tecniche porta ad una separazione ad alta risoluzione dei lipidi, che costituiscono un vasto sottogruppo del metaboloma umano e devono essere accuratamente analizzati in molte malattie metaboliche ereditarie. La notevole variabilità di concentrazione e di strutture chimiche tra i vari metaboliti inducono sempre più i ricercatori ad usare in parallelo almeno due metodi analitici, ad esempio NMR e MS (26). In assoluto, infatti, nessuna tecnologia usata singolarmente è in grado di caratterizzare definitivamente l'intero metaboloma presente in un campione biologico (27).

LA METABOLOMICA NELLA DIAGNOSTICA DEGLI ERRORI CONGENITI DEL METABOLISMO

Con la crescente diffusione degli studi di metabolomica nella comunità scientifica, vari gruppi di ricerca hanno focalizzato il loro interesse sull'applicazione di questa scienza omica nella diagnosi e gestione degli ECM, con lo scopo di approfondire l'analisi dei metaboliti e delle loro interrelazioni. Nonostante il suo indiscutibile valore e il suo ruolo primario nei programmi di salute pubblica, lo screening neonatale possiede alcuni limiti, soprattutto perché offre una visione istantanea su un ridotto gruppo di alterazioni metaboliche (circa 50 su oltre 1015); inoltre, alcuni ECM

non sono identificabili attraverso i programmi routinari di screening neonatale. D'altra parte, il profilo metabolico può fornire un contributo significativo per aumentare le informazioni sulle alterazioni dei processi metabolici, con due scopi principali: raggiungere un'accurata diagnosi ed individuare nuovi ECM (28-30). Tuttavia, genetica e metabolomica non si escludono a vicenda: per ogni alterazione genica correlata a un difetto metabolico può essere sviluppato un nuovo modello computazionale che, dopo il "knockout" genico, è in grado di prevedere variazioni di concentrazione di un insieme di metaboliti nelle urine, nel sangue e in altri liquidi biologici (31). Nella banca dati del metaboloma umano ("Human Metabolome Database" - HMDB) sono archiviate informazioni strutturali e funzionali di 247 metaboliti associati a 147 ECM e 202 cicli metabolici coinvolti in altri ECM. Questa banca dati fu fondata nel 2005 da un progetto multi-istituzionale e multi-nazionale ("Human Metabolome Project") (32), ed è stata ideata per facilitare l'interpretazione delle relazioni tra geni, ECM e metaboliti (33). La banca dati è fondamentale come supporto per chiarire quali vie metaboliche sono compromesse o bloccate in un determinato ECM e inoltre per facilitare la scoperta, l'identificazione e la quantificazione di metaboliti chiave nei pazienti con malattia metabolica ereditaria. Nell'ultima decade, sono stati pubblicati numerosi studi di metabolomica applicata agli ECM, con un particolare interesse per quelle malattie che mostrano una spiccata variabilità fenotipica e genotipica tra i vari pazienti e pertanto difficili da diagnosticare attraverso i programmi di screening neonatale. Un caso esemplificativo è costituito dalla malattia di Fabry, una patologia complessa da accumulo lisosomiale, multisistemica e caratterizzata dalla mutazione del gene *GLA*, situato sul braccio lungo del cromosoma X (Xq21.33-Xq22), che causa il deficit dell'enzima α -galattosidasi A. Ciò provoca l'accumulo di globotriaosilfosfingosina (lyso-Gb3) nei tessuti e nei liquidi biologici e di globotriaosilceramide (Gb3) nei lisosomi. Attraverso l'associazione UPLC-MS ionizzazione per elettrobulizzazione-tempo di volo (UPLC-ESI-TOF-MS), un gruppo di ricerca canadese ha effettuato una serie di ricerche finalizzate alla scoperta di nuovi biomarcatori in grado di svelare la gravità e la progressione della malattia. In una sequenza di studi consecutivi, questi ricercatori hanno trovato fino a 15 isoforme/analoghi della Gb3 (34-37) e 22 isoforme/analoghi della galabiosilceramide (Ga2) nelle urine di pazienti con la malattia di Fabry non trattati (38). La scoperta di queste isoforme ha contribuito a fornire nuove conoscenze sulla fisiopatologia della malattia di Fabry e sui meccanismi responsabili di alterazioni delle vie metaboliche.

Gli studi di metabolomica si basano su due approcci: l'analisi quantitativa di classi di metaboliti a struttura nota, il cosiddetto approccio "targeted"; l'analisi globale di tutti i metaboliti presenti in un campione biologico, il cosiddetto approccio "untargeted". Quest'ultimo non solo permette una visione d'insieme di tutti i metaboliti conosciuti e sconosciuti in un unico esame, ma è molto

usato per determinare le alterazioni delle vie metaboliche (39). In pratica, l'approccio "untargeted" può essere considerato come un'indagine in grado di rilevare qualsiasi metabolita presente in quantità misurabile. Entrambi gli approcci "targeted" e "untargeted" basati sulla MS sono largamente usati per incrementare il numero di metaboliti conosciuti associati a processi patologici (40).

Metabolomica "targeted" negli ECM

Numerosi studi di metabolomica hanno usato l'approccio "targeted" quantitativo, associato alla chemiometria, nella valutazione degli ECM, anche per convalidare tipo e ruolo di biomarcatori noti. In particolare, le aminoacidopatie, le acidurie organiche e i disordini dell'ossidazione degli acidi grassi sono tra gli ECM più studiati usando l'approccio "targeted" (30). Un recente lavoro ha valutato, mediante approccio "targeted" LC-MS/MS, un ampio pannello metabolico che comprendeva 220 metaboliti clinicamente rilevanti in uno spettro di ECM (41). La valutazione è stata fatta: su campioni di tessuto di animali, su 20 volontari adulti sani e su 56 campioni di sangue essiccato su cartoncino da pazienti con 8 diversi ECM. I risultati hanno dimostrato che il pannello è potenzialmente utile come strumento di screening sensibile e robusto per un ampio gruppo di ECM e permette di evitare molte determinazioni lunghe e costose, spesso causa di ritardi diagnostici. L'analisi di 163 metaboliti nel plasma di 50 controlli e 34 pazienti con difetti del metabolismo aminoacidico, acidurie organiche e difetti mitocondriali, ha permesso di individuare tutti i pazienti affetti da ECM, ottenendo una completa discriminazione tra ciascun campione dei pazienti e i controlli (42). Un altro studio di metabolomica "targeted" ha valutato, nella malattia di Niemann-Pick C1 (NPC1), le concentrazioni di specifici sfingolipidi plasmatici, correlandole al tipo di risposta alla terapia (43). Come noto, anomalie nel metabolismo degli sfingolipidi sono tipiche della malattia NPC1. Usando la MS, i ricercatori hanno identificato un pannello di sfingolipidi nel plasma e nel liquor che aumentano nei soggetti affetti da NPC1; ancor più rilevante è stata l'osservazione che le variazioni di questi sfingolipidi erano strettamente correlate all'esito del trattamento terapeutico, sia nei modelli animali che nei pazienti.

Metabolomica "untargeted" negli ECM

L'approccio metabolomico "untargeted" è più descrittivo rispetto al "targeted". In un'unica analisi "untargeted" si ricavano miriadi di informazioni, diversamente ottenibili solo mediante pannelli "targeted" multipli per acidi organici, intermedi della biosintesi della carnitina, acilcarnitine, acidi nucleici, aminoacidi e altri

metaboliti. L'approccio "untargeted" per gli ECM è stato impiegato per caratterizzare l'acidemia metilmalonica e l'acidemia propionica (44). Si è scoperto che il profilo e l'identificazione simultanea di varie centinaia di metaboliti aumenta la probabilità di trovare nuovi composti associati a queste malattie, come ad esempio 5 ulteriori metaboliti dell'acetil-carnitina e la γ -butirro-betaina. Lo studio rappresenta una pietra miliare della metabolomica "untargeted", perché sostiene la tesi che questo approccio consente l'identificazione di nuovi biomarcatori in ECM noti (44). Più recentemente, 120 campioni di plasma prelevati da pazienti con diagnosi definitiva di ECM e 70 campioni prelevati da pazienti sottoposti a test diagnostici per ECM ma risultati negativi, sono stati analizzati usando un approccio "untargeted" replicato in parallelo su tre distinte piattaforme MS (GC-MS, LC-MS in modalità ione positivo e LC-MS in modalità ione negativo) (45). Basandosi sull'analisi dei cicli metabolici ("pathways analysis"), gli autori hanno individuato con successo 20 su 21 ECM; nel contempo, l'omocisteina, l'acido metilmalonico, la tetradecenoilcarnitina (C14:1) e il guanidinoacetato (GAA) non sono stati identificati. Questa limitazione è stata controbilanciata dall'identificazione di anomalie multiple di metaboliti associate a omocisteinuria e acidemia metilmalonica, confermando l'utilità di questo approccio per uno screening degli ECM quando il fenotipo del paziente è indifferenziato. Un approccio "untargeted" che ha combinato la spettroscopia $^1\text{H-NMR}$ con la LC-MS/MS ha permesso di chiarire i difetti metabolici e la patogenesi della sindrome di Barth, una rara malattia causata da mutazioni del gene *TAZ*, localizzato sul braccio lungo del cromosoma X (Xq28), che dà origine al deficit di tafazzina, una proteina coinvolta nel rimodellamento della cardiolipina (46)². Tutti i metaboliti identificati tramite MS hanno mostrato una chiara separazione tra i campioni di pazienti con la sindrome di Barth e i controlli. È interessante notare che, l'analisi di arricchimento ("pathway enrichment analysis") ha dimostrato l'associazione tra scompensi metabolici estesi, precedentemente sconosciuti, e l'eziologia della sindrome di Barth, rivelando nuovi potenziali target terapeutici. La metabolomica "untargeted" è stata applicata per studiare il metaboloma del plasma in 12 pazienti con deficit della catena lunga degli enzimi idrossi-acil-CoA deidrogenasi e palmitoiltransferasi 2 e il metaboloma in 11 controlli (47). In totale sono stati identificati 832 metaboliti. Quando i risultati sono stati analizzati seguendo il profilo metabolico di lipidi complessi (modello 2), l'analisi modellistica classificatoria multivariata supervisionata ("Partial Least Squares-Discriminant Analysis – PLS-DA") ha rivelato 117 variabili non-acetilcarnitina correlate, in grado di

²In assenza di tafazzina, una proteina estesamente studiata presso il Centro per le malattie ereditarie cardiovascolari del Policlinico S. Matteo di Pavia, si verificano anomalie che compromettono la funzione delle catene respiratorie e delle strutture mitocondriali, con un contenuto anomalo di cardiolipina e una riduzione della cardiolipina matura (NDT).

discriminare i controlli dai pazienti con alterazioni dell'ossidazione degli acidi grassi mitocondriali. Questa analisi permette di riconoscere il rischio e la gravità della malattia, nonché l'identificazione di sottotipi dei disturbi dell'ossidazione degli acidi grassi. Infine, la fenotipizzazione metabolica globale "untargeted" è stata testata con successo nel liquor di una coorte di pazienti pediatrici con diversi ECM (48). Oltre il 60% dei metaboliti individuati nel liquor era presente contemporaneamente nel sangue e nelle urine, suggerendo che un singolo campione di liquor analizzato mediante un piano di lavoro integrato di metabolomica può essere usato per identificare un ampio numero di composti biochimici utili per identificare alterazioni di vie metaboliche associate a ECM.

Metabolomica applicata allo screening degli ECM

Il potenziale ruolo della metabolomica nello screening degli ECM è stato verificato per la prima volta in due ECM, la fenilchetonuria e la malattia delle urine a sciroppo d'acero (49). Per quest'ultima, caratterizzata da aumentati livelli di aminoacidi a catena ramificata, non c'era all'epoca nessuno screening disponibile. Campioni di sangue essiccati su cartoncino sono stati analizzati con la spettroscopia ¹H-NMR. I risultati hanno dimostrato che la metabolomica è in grado di discriminare chiaramente non solo il metaboloma dei campioni dei bambini sani da quelli con la malattia delle urine allo sciroppo d'acero, ma è anche in grado di funzionare come test di screening metabolico specifico per questa malattia, discriminando inoltre la fenilchetonuria dalla malattia delle urine allo sciroppo d'acero (49). In uno studio eseguito su sei pazienti con sei distinti ECM (aciduria arginosuccinica, omocistinuria classica, acidemia metilmalonica classica, malattia delle urine allo sciroppo d'acero, fenilchetonuria e tirosinemia di tipo 2) e sei controlli, il metaboloma urinario è stato determinato associando la MS a ionizzazione per desorbimento (DESI-MS) con la spettroscopia ¹H-NMR (50). Questa associazione ha permesso di discriminare il profilo metabolico urinario di ciascun paziente da quello degli altri pazienti e da quello dei controlli, proponendosi come un rapido e accurato screening urinario per una migliore caratterizzazione degli ECM. Con lo scopo di ridurre la quota di falsi positivi dello screening neonatale tradizionale MS/MS, un gruppo di ricercatori ha proposto un nuovo approccio basato sull'iniezione a flusso diretto, usando la sorgente di ionizzazione NanoSpray® in associazione con la MS ad alta risoluzione (51). L'analisi del profilo metabolico ha permesso l'identificazione selettiva di oltre 400 metaboliti, inclusi i lipidi complessi, gli acidi biliari, gli acidi organici, gli acidi grassi, i carboidrati e le acilcarnitine. Questa strategia ha consentito di riconoscere la galattosemia, individuando gli esosi e gli esosi fosfati, così come molte altre malattie che coinvolgono cambiamenti globali nel metaboloma. In un progetto di ricerca condotto nell'Italia meridionale tra il 2007 e il 2014 è stato valutato l'uso della metabolomica

"targeted" LC-MS/MS nello screening neonatale esteso per la diagnosi preclinica degli ECM (52). Lo studio era focalizzato sull'identificazione di neonati a rischio di morte in alcune malattie metaboliche, come i disordini di ossidazione degli acidi grassi, l'acidemia organica, la deficienza di aminoacidi a catena ramificata, l'iperammonemia e i disordini metabolici acquisiti dalla madre. I risultati hanno confermato il valore aggiunto dell'analisi metabolomica nel migliorare la previsione del rischio clinico grazie alla diagnosi pre-sintomatica degli ECM. Recentemente, una piattaforma qualitativa/quantitativa ad hoc MS ad alta risoluzione per le malattie metaboliche è stata sviluppata e convalidata, allo scopo di individuare e quantificare molte classi di metaboliti polari e non polari/idrofobici (53). Questa piattaforma è in grado di riconoscere un ampio numero di vari metaboliti, inclusi quelli misurati usando in parallelo metodi diversi tra loro. Uno studio multicentrico basato sulla spettroscopia ¹H-NMR "targeted e untargeted" ha valutato la variabilità analitica su 20 metaboliti costantemente presenti nell'urina di neonati non affetti da patologie neonatali e su 45 metaboliti normalmente assenti nei neonati sani. Mediante l'approccio "targeted" è stata misurata la loro concentrazione e i risultati sono stati archiviati in un database di NMR (54). Il protocollo ha coinvolto 14 cliniche, con la raccolta di 989 campioni di urine di neonati di età compresa tra le 24 e le 168 ore dalla nascita. Quasi tutti i campioni (89,5%) sono stati misurati in doppio in due diversi laboratori. Gli spettri NMR dei neonati sani sono stati caratterizzati; i valori statisticamente anomali ("outliers") sono stati identificati, e gli spettri delle urine dei neonati malati sono stati acquisiti e conservati.

Profilo metabolico urinario: vantaggi e insidie

L'urina è il liquido biologico ideale per gli studi di metabolomica in neonatologia: è sterile, facile da ottenere in quantità sufficiente e con metodi non invasivi. La caratterizzazione del metaboloma urinario contribuisce significativamente ad identificare l'impronta biochimica del metabolismo cellulare coinvolto in molti ECM (55). L'alta affidabilità dei campioni di urina per la metabolomica applicata alla diagnosi e al monitoraggio degli ECM è stata dimostrata in un recente studio effettuato in un campione di popolazione che racchiudeva 18 diversi ECM; 34 pazienti con diagnosi definitiva di ECM e 66 senza diagnosi definitiva (56). Lo studio ha identificato oltre 1200 metaboliti. Inoltre, sono state identificate inequivocabilmente le caratteristiche biochimiche di 16 ECM, mentre non sono state identificate correttamente due malattie: il deficit del trasportatore della creatina, causato da mutazioni del gene *SLC6A8* situato sul braccio lungo del cromosoma X (Xq28), e il deficit di ornitina transcarbamilasi, uno dei sei errori congeniti del ciclo dell'urea causato da una mutazione del gene *OTC* espresso dagli epatociti e localizzato sul braccio corto del cromosoma X (Xp21.1). Tuttavia, al momento dell'analisi i due pazienti affetti da

questi due ECM non identificati erano in trattamento terapeutico che potrebbe avere mascherato i biomarcatori specifici di malattia. Il profilo metabolico basato sulla GC-MS per lo screening neonatale degli ECM è stato esplorato in uno studio retrospettivo indiano eseguito su 23.140 campioni (57). Gli autori hanno dimostrato come il profilo metabolico urinario in GC-MS abbia migliorato significativamente l'efficacia dei programmi di screening neonatale in India, apparendo più completo per lo screening degli ECM, più facile e non invasivo. Oltre all'acidosi lattica primaria, all'acidemia organica e alle aminoacidopatie, la metabolomica GC-MS ha rivelato altri ECM come l'alcaptonuria, la malattia di Canavan e l'aciduria 4-idrossibutirrica. Sebbene molto vantaggiosa, soprattutto in età neonatale, l'analisi dell'urina può essere falsata dalla mancata o insufficiente standardizzazione della fase preanalitica. In particolare, la raccolta del campione e i protocolli di rimozione dell'urea sono passaggi cruciali per l'analisi GC-MS. Entrambi possono dare origine a potenziali interferenze negli studi metabolomici. La maggior parte dei metodi per la raccolta del campione di urina (mitto intermedio previo lavaggio, sacche di raccolta, cateteri soprapubici) non possono essere applicati in età neonatale; un metodo molto usato per la raccolta delle urine dei neonati sono i pannolini usa e getta. Tuttavia, dopo l'avvio della produzione e vendita di pannolini ultrasorbenti, è diventato pressoché impossibile raccogliere le urine direttamente dal pannolino. Per ovviare a questo problema, una pallina di cotone o un batuffolo di cotone sono stati inseriti nel pannolino usa e getta, e il cosiddetto "pannolino con batuffolo di cotone" è stato introdotto nella routine clinica (58). In tal modo, le urine sono assorbite dal cotone. Sfortunatamente, la tecnica "pannolino con batuffolo di cotone" potrebbe essere una fonte di contaminazione del campione. Uno studio sperimentale ha esaminato otto marche di pannolini, osservando che ognuno ha un profilo o una traccia contaminante univoca, che potrebbe potenzialmente interferire con i risultati ottenuti sia in ^1H NMR che in LC-MS (59). Gli autori hanno concluso raccomandando la tipizzazione metabolica del "pannolino con batuffolo di cotone" prima di iniziare la valutazione del metaboloma urinario. Inoltre, hanno anche fortemente sconsigliato l'uso di varie marche di pannolini nell'ambito dello stesso studio metabolomico. Secondo questa raccomandazione, è possibile valutare se i profili dei contaminanti sono minimi e/o gestibili. Diversi altri fattori devono essere considerati con attenzione prima di analizzare i risultati, tra cui la temperatura, il pH, l'osmolalità, il periodo di contatto urina-pannolino prima della raccolta, la contaminazione batterica e il peso del bambino. Ognuno di questi fattori può influenzare significativamente l'entità della contaminazione del "pannolino con batuffolo di cotone" e le relative interferenze sul profilo metabolico urinario. Un'altra fase poco standardizzata è il pretrattamento dell'urina prima dell'analisi in GC-MS. Il pretrattamento del campione con ureasi ha lo scopo di rimuovere l'urea, presente in abbondanza nell'urina, perché può interferire

con la derivatizzazione chimica, causando una trasformazione chimica incompleta. La standardizzazione di questa fase consiste nel combinare in modo efficace il volume di enzima (ureasi) da aggiungere al campione con il tempo di trattamento del campione con ultrasuoni (sonicazione), evitando la rimozione incompleta dell'urea che, a sua volta, causa sovraccarico della colonna cromatografica, distorsioni nei picchi, rischio di co-eluzione dei metaboliti. Uno studio molto recente ha stabilito un protocollo standardizzato per la rimozione dell'urea, ottenendo la combinazione ottimale tra volume di ureasi e tempo di sonicazione (60).

PROSPETTIVE FUTURE

Nonostante gli ECM siano disordini trasmessi geneticamente, tipicamente in maniera autosomica recessiva o recessiva legata al cromosoma X (per esempio la distrofia muscolare di Duchenne), il modello un gene, un enzima, una malattia non può più essere considerato valido. Infatti, il genoma non sempre può rivelare completamente la complessità degli ECM (61). D'altra parte, i metaboliti derivano da processi biologici intermedi che dipendono dalla genetica, dall'epigenetica, da fattori ambientali e dal fenotipo finale (62). Pertanto, il fenotipo metabolico fornisce informazioni su: nuove conoscenze sulle interazioni e meccanismi genetici, nuovi biomarcatori di diagnosi e prognosi e i meccanismi patogenetici delle malattie. La metabolomica offre l'opportunità di mappare i disordini delle vie metaboliche e il "network" dei metaboliti coinvolti nella patogenesi di una malattia metabolica (63,64). In realtà, il miglior approccio a studi metabolomici di ECM complessi potrebbe essere la combinazione tra un approccio "untargeted", che consente una visione d'insieme sulla vastità del metaboloma e l'analisi dei cicli metabolici, e un approccio "targeted", che permette la misura accurata di specifici metaboliti, determinandone anche e gli intervalli di riferimento. Questa strategia, adottata in vari studi (65-67), facilita l'identificazione di fenotipi e biomarcatori correlati ad una specifica malattia. L'integrazione dei dati di genomica con quelli di metabolomica rappresenta la sfida attuale per migliorare la diagnosi e la prognosi degli ECM. Il fine è identificare sia i loci metabolicamente attivi che i geni coinvolti nel modellare un fenotipo di malattia, migliorando le conoscenze specifiche sulla biologia di una malattia (68). Per esempio, la diagnosi definitiva della malattia delle urine a sciroppo d'acero dovrebbe essere basata almeno su: (a) identificazione o di varianti patogeniche DBT (codificante la subunità E2 della diidrolipoiltransacilasi), BCKDHB (codificante la subunità β decarbossilasi BCKA) o BCKDHA (codificante la subunità α decarbossilasi BCKA); (b) misura di alti livelli di alloisoleucina, isoleucina, leucina, valina; (c) identificazione di 2 ossiacidi a catena ramificata (69). Nel cosiddetto "pathway-based approach", si possono studiare la penetranza delle mutazioni geniche e le anomalie metaboliche che delineano il fenotipo

biochimico dei pazienti (70). In conclusione, la metabolomica fa ormai parte di molti studi pubblicati sugli ECM (71). Nel contempo, molti laboratori clinici hanno introdotto la MS nella loro pratica routinaria negli ultimi 5 anni, rendendo più familiare questo metodo e riducendo di fatto gli ostacoli metodologici che finora hanno impedito di iniziare studi di metabolomica per espandere gli screening neonatali.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Garrod AE. Inborn errors of metabolism. In: June 1908: The Croonian Lectures Delivered Before The Royal College of Physician of London. London (UK): Oxford University Press, 1909.
- Gahl WA. Chemical individuality: Concept and outlook. *J Inher Metab Dis* 2008;31:630-40.
- Richter T, Nestler-Parr S, Babela R, et al. Rare Disease Terminology and Definitions – A Systematic Global Review: Report of the ISPOR Rare Disease Special Interest Group. *Value Health* 2015;18:906-14.
- Stanton BF. New Understanding of Mechanism and New Hope for Treatments. *Pediatr Clin North Am* 2018;65:xvii-xviii.
- Olby R. The Dimension of Scientific Controversy: The Biometric-Mendelian Debat. *Br J Hist Sci* 1989;22:299-320.
- Garrod AE. *Inborn Errors of Metabolism*. 2nd Edition. London (UK): Oxford University Press, 1923.
- Ferreira CR, van Karnebeek CDM, Vockley et al. A proposed nosology of inborn errors of metabolism. *Genet Med* 2018 [Epub ahead of print].
- Zschocke J. SSIEM Classification of Inborn Errors of Metabolism. In Blau N, Duran M, Gibson KM, et al. Editors. *Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-up of Inherited Metabolic Diseases*. Berlin Heidelberg (GE): Springer-Verlag, 2014:817-30.
- Saudbray JM, Garcia-Cazorla A. Inborn Errors of Metabolism Overview: Pathophysiology, Manifestations, Evaluation, and Management, *Pediatr Clin North Am* 2018;65:179-208.
- American College of Medical Genetics Newborn Screening Expert Group. Newborn screening: toward a uniform screening panel and system – executive summary. *Pediatrics* 2006;117:S296-307.
- McHugh D, Cameron CA, Abdenur JE, et al. Clinical validation of cutoff target ranges in newborn screening of metabolic disorders by tandem mass spectrometry: a worldwide collaborative project. *Genet Med* 2011;13:230-54.
- Hall PL, Marquardt G, McHugh DM, et al. Postanalytical tools improve performance of newborn screening by tandem mass spectrometry. *Genet Med* 2014;16:889-95.
- Marquardt G, Currier R, McHugh DM, et al. Enhanced interpretation of newborn screening results without analyte cutoff values. *Genet Med* 2012;14:648-55.
- Fiehn O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plan Mol Biol* 2002;48:155-71.
- Nicholson JK, Holmes E, Kinross JM, et al. Metabolic phenotyping in clinical and surgical environments. *Nature* 2012;491:384-92.
- Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 1999;29:1181-9.
- Lazar MA, Birnbaum MJ. Physiology. De-meaning of metabolism. *Science* 2012;336:1651-2.
- Scriver CR, Water PJ. Monogenic traits are not simple: lessons from phenylketonuria. *Trends Genet* 1999;15:267-72.
- Oliver SG, Winson MK, Kell DB, et al. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol* 1998;16:373-8.
- Kell DB, Oliver SG. The metabolome 18 years on: a concept comes of age. *Metabolomics* 2016;12:148.
- Reymond JL, Ruddigkeit L, Blum I, et al. The enumeration of chemical space. *WIREs Comput Mol Sci* 2012;2:717-33.
- Beckonert O, Keun HC, Ebbels TM, et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc* 2007;2:2692-703.
- Markley JL, Bruschweiler R, Edison TM, et al. The future of NMR-based metabolomics. *Curr Opin Biotechnol* 2017;43:34-40.
- Gonzales-Dominguez R, Sayago A, Fernandez-Recamales A. Direct infusion mass spectrometry for metabolomic phenotyping of diseases. *Bioanalysis* 2017;9:131-48.
- Begou O, Gika HG, Wilson ID, et al. Hyphenated MS-based targeted approaches in metabolomics. *Analyst* 2017;142:3079-100.
- Gonzales-Dominguez A, Duran-Guerrero F, Fernandez-Recamales A, et al. An Overview on the Importance of Combining Complementary Analytical Platforms In metabolomics REsearch. *Curr Top Med Chem* 2017;17:289-95.
- Rieckberg E, Powers R. New frontiers in metabolomics: from measurement to insight. *F1000Res* 2017;6:1148.
- Moolenaar SH, Engelke UF, Wevers RA. Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of body fluids in the field of inborn errors of metabolism. *Ann Clin Biochem* 2003;40:16-24.
- Tebani A, Abily-Donval L, Alfons C, et al. Clinical Metabolomics: The New Metabolic Window for Inborn Errors of Metabolism Investigations in the Post-Genomic Era. *Int J Mol Sci* 2016;17(7).
- Sandlers Y. The future perspective: metabolomics in laboratory medicine for inborn errors of metabolism. *Transl Res* 2017;189:65-75.
- Shlomi T, Cabili MN, Ruppin E. Predicting metabolic biomarkers of human inborn errors of metabolism. *Mol Syst Biol* 2009;5:263.
- Wishtart DS, Tzur D, Knox C, et al. HMDB: The Human Metabolome Database. *Nucl Acids Res* 2007;35:D521-26.
- Mandal R, Chamot D, Wishtart DS. The role of the Human Metabolome Database in inborn errors of metabolism. *J Inher Metab Dis* 2018;41:329-36.
- Auray-Blais C, Boutin M. Novel gb(3) isoforms detected in urine of fabry disease patients: a metabolomic study. *Curr Med Chem* 2012;19:3241-52.
- Auray-Blais C, Boutin M, Gagnon R, et al. Urinary globotriaosylsphingosine-related biomarkers for Fabry disease targeted by metabolomics. *Anal Chem* 2012;84:2745-53.
- Manwaring V, Boutin M, Auray-Blais C. A metabolomic study to identify new globotriaosylceramide-related biomarkers in the plasma of Fabry disease patients. *Anal Chem* 2013;85:9039-48.

37. Dupont FO, Gagnon R, Boutin M, et al. A metabolomic study reveals novel plasma lyso-Gb3 analogs as Fabry disease biomarkers. *Curr Med Chem* 2013;20:280-8.
38. Boutin M, Auray-Blais C. Metabolomic discovery of novel urinary galabiosylceramide analogs as Fabry disease biomarkers. *J Am Soc Mass Spectrom* 2015;26:499-510.
39. Gertsman I, Barshop BA. Promises and pitfalls of untargeted metabolomics. *J Inherit Metab Dis* 2018;41:355-66.
40. Coene KLM, Kluijtmans LAJ, van der Heeft E, et al. Next-generation metabolic screening: targeted and untargeted metabolomics for the diagnosis of inborn errors of metabolism in individual patients. *J Inherit Metab Dis* 2018;41:337-53.
41. Jacob M, Malkawi A, Albart N, et al. A targeted metabolomics approach for clinical diagnosis of inborn errors of metabolism. *Anal Chim Acta* 2018;1025:141-53.
42. Janeckova H, Hron K, Wojtowicz P, et al. Targeted metabolomic analysis of plasma samples for the diagnosis of inherited metabolic disorders. *J Chromatogr A* 2012;1226:11-7.
43. Fan M, Sidhu R, Fujiwara H, et al. Identification of Niemann-Pick C1 disease biomarkers through sphingolipid profiling. *J Lipid Res* 2013;54:2800-14.
44. Wikoff WR, Gangoiti JA, Barshop BA, et al. Metabolomics identifies perturbations in human disorders of propionate metabolism. *Clin Chem* 2007;53:2169-76.
45. Miller MJ, Kennedy AD, Eckhart AD, et al. Untargeted metabolomic analysis for the clinical screening of inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis* 2015;38:1029-39.
46. Sandlers Y, Mercier K, Pathmasiri W, et al. Metabolomics reveals new mechanism for pathogenesis in Barth syndromes and introduces novel roles for cardiolipin in cellular function. *PLoS ONE* 2016;11:e0151802.
47. McCoin CS, Piccolo BD, Knotts TA, et al. Unique plasma metabolomic signatures of individuals with inherited disorders of long-chain fatty acid oxidation. *J Inherit Metab Dis* 2016;39:399-408.
48. Kennedy AD, Pappan KL, Donti TR, et al. Elucidation of the complex metabolic profile of cerebrospinal fluid using an untargeted biochemical profiling assay. *Mol Genet Metab* 2017;121:83-90.
49. Costantinou MA, Papakostantinou E, Benaki D, et al. Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with principal component analysis in detecting inborn errors of metabolism using blood spots: a metabolomic approach. *Anal Chim Acta* 2004;511:303-12.
50. Pan Z, Gu H, Talaty N, et al. Principal component analysis of urine metabolites detected by NMR and DESI-MS in patients with inborn errors of metabolism. *Anal Bioanal Chem* 2007;387:539-49.
51. Dénes J, Szabó E, Robinette SL, et al. Metabolomics of newborn screening dried blood spot samples: a novel approach in the screening and diagnosis of inborn errors of metabolism. *Anal Chem* 2012;84:10113-20.
52. Scolamiero E, Cozzolino C, Albano L, et al. Targeted metabolomics in the expanded newborn screening for inborn errors of metabolism. *Mol Biosyst* 2015;11:525-35.
53. Gertsman I, Gangoiti JA, Barshop BA. Validation of a dual LC-HRMS platform for clinical metabolic diagnosis in serum, bridging quantitative analysis and untargeted metabolomics. *Metabolomics* 2014;10:312-23.
54. Aygen S, Durr U, Hegele P, et al. NMR-Based Screening for Inborn Errors of Metabolism: initial Results from a Study on Turkish Neonates. *JIMD Rep* 2014;16:101-11.
55. Bouatra S, Aziat F, Mandal R, et al. The human urine metabolome. *PLoS ONE* 2013;8(9):e73076.
56. Kennedy AD, Miller MJ, Beebe K, et al. Metabolomic Profiling of Human Urine as a Screen for Multiple Inborn Errors of Metabolism. *Genet Test Mol Biomarkers* 2016;20:485-95.
57. Hampe MH, Panaskar SN, Yadav AA, et al. Gas chromatography/mass spectrometry-based urine metabolome study in children for inborn errors of metabolism: An Indian experience. *Clin Biochem* 2017;50:121-6.
58. Roberts SB, Lucas A. Measurements of urinary constituents and output using disposable napkins. *Arch Dis Child* 1985;60:1021-24.
59. Goodpaster AM, Ramadas EH, Kennedy MA. Potential effect of diaper and cotton ball contamination on NMR and LC/MS based metabolomics studies of urine from newborn babies. *Anal Chem* 2011;83:896-902.
60. Palmas F, Mussap M, Fattuoni C. Urine metabolome analysis by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS): Standardization and optimization of protocols for urea removal and short-term sample storage. *Clin Chim Acta* 2018;485:236-42.
61. Lanpher B, Brunetti-Pierri N, Lee B. Inborn errors of metabolism: the flux from Mendelian to complex diseases. *Nat Rev Genet* 2006;7:449-60.
62. Shin SY, Fauman EB, Petersen AK, et al. An atlas of genetic influences on human blood metabolites. *Nat Genet* 2014;46:543-60.
63. Wangler MF, Hubert L, Donti TR, et al. A metabolomic map of Zellweger spectrum disorders reveals novel disease biomarkers. *Genet Med* 2018. [Epub ahead of print].
64. Tebani A, Afonso C, Marret S, et al. Omics-Based Strategies in Precision Medicine: Toward a Paradigm Shift in Inborn Errors of Metabolism Investigations. *Int J Mol Sci* 2016;17(9).
65. Dercksen M, Koekemoer G, duran M, et al. Organic acid profile of isovaleric acidemia: a comprehensive metabolomics approach. *Metabolomics*. 2013;9:765-77
66. Tebani A, Scmitz-Afonso I, Abily-Donval L, et al. Urinary metabolic phenotyping of mucopolysaccharidosis type I combining untargeted and targeted strategies with data modeling. *Clin Chim Acta* 2017;475:7-14
67. Sahoo S, Franzson L, Jonsson JJ, et al. A compendium of inborn errors of metabolism mapped onto the human metabolic network. *Mol Biosyst* 2012;8:2545-58
68. Graham E, Lee J, Price M, et al. Integration of genomics and metabolomics for prioritization of rare disease variants: a 2018 literature review. *Inherit Metab Dis* 2018 [Epub ahead of print]
69. Strauss KA, Puffenberger EG, Morton DH. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al. editors. *Maple syrup urine disease*. Gene Reviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 2013:93-7
70. Guo L, Milburn MV, Ryals JA, et al. Plasma metabolomic profiles enhance precision medicine for volunteers of normal health. *Proc Natl Acad Sci* 2015;112:E4901-10
71. Piras D, Locci E, Palmas F, et al. Rare disease: a focus on metabolomics. *Exp Opin Orphan Dis* 2016;4:1229-37