



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
Maestría en Ciencias Bioquímicas

## **Diagnóstico molecular de pacientes con desórdenes congénitos de la glicosilación tipo Ix**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:  
**CARLOS ALBERTO GONZÁLEZ DOMÍNGUEZ**

TUTOR PRINCIPAL:  
DR. IVÁN MARTÍNEZ-DUNCKER RAMÍREZ  
CIDC. UAEM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:  
DR. TOMÁS DAVID LÓPEZ DÍAZ  
IBT, UNAM.  
DR. OCTAVIO TONATIUH RAMÍREZ REIVICH  
IBT, UNAM.

CUERNAVACA, MORELOS. DICIEMBRE 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

|  |           |
|--|-----------|
| Figuras _____  | 4         |
| Tablas _____   | 6         |
| Resumen _____  | 7         |
| Abstract _____   | 8         |
| <b>1.0 Introducción _____</b>  | <b>9</b>  |
| <b>2.0 Antecedentes _____</b>  | <b>10</b> |
| <b>2.1 Glicosilación _____</b>   | <b>10</b> |
| 2.1.1 N-glicosilación _____  | 11        |
| 2.1.1.1 Síntesis de GDP-Manosa y Dol-P-Man _____   | 13        |
| 2.1.2 Desórdenes congénitos de la glicosilación (CDG) _____                                      | 14        |
| 2.1.2.1 CDG asociados a la N-Glicosilación _____   | 15        |
| 2.1.2.1.1 CDG de tipo I _____  | 16        |
| 2.1.2.1.2 CDG de tipo II _____   | 16        |
| 2.1.2.1.3 CDG mixtos _____   | 17        |
| 2.2 PMM2-CDG _____   | 17        |
| 2.3 Método de diagnóstico de los CDG asociados a la N-glicosilación _____                        | 19        |
| 2.4 Algoritmo diagnóstico de los CDG _____   | 20        |
| 2.5 Pacientes mexicanos con CDG-Ix _____   | 22        |
| <b>3.0 Hipótesis _____</b>   | <b>25</b> |
| <b>4.0 Objetivos _____</b>   | <b>25</b> |
| 4.1 Objetivo Principal _____   | 25        |
| 4.2 Objetivos Particulares _____   | 25        |
| <b>5.0 Metodología _____</b>   | <b>26</b> |
| <b>5.1 Isoelectroenfoco de transferrina sérica (TIEF) _____</b>                                  | <b>26</b> |
| 5.1.1 Preparación de la muestra _____  | 26        |
| 5.1.2 Preparación de Biofilm _____   | 26        |
| 5.1.3 Preparación del gel _____  | 26        |
| 5.1.4 Polimerización del gel (bajo lámpara de luz blanca) _____                                  | 26        |
| 5.1.5 Electroforésis en gel de agarosa _____   | 26        |
| 5.1.6 Fijación del anticuerpo _____  | 27        |
| 5.1.7 Tinción _____  | 27        |
| 5.2 Consentimiento informado _____   | 27        |
| 5.3 Toma de biopsia _____  | 27        |
| 5.4 Cultivo Celular _____  | 28        |
| 5.4.1 Pase Celular _____   | 28        |
| 5.5 Obtención de RNA _____   | 28        |
| 5.6 Obtención de ADNc _____  | 29        |
| 5.7 Extracción de ADN genómico a partir de sangre _____  | 29        |
| 5.8 Diseño de oligonucleótidos para amplificar el gen PMM2 a partir de ADN complementario. _____ | 30        |

|   |           |
|---|-----------|
| 5.9 Amplificación por PCR.  | 30        |
| 5.10 Secuenciación de Sanger, a partir de producto de PCR                             | 31        |
| 5.11 Clonación en la cepa match one de <i>E. coli</i>                                 | 31        |
| 5.11.1 Ligación   | 31        |
| 5.11.2 Transformación   | 32        |
| 5.11.3 Purificación de plásmido y selección de isoformas                              | 32        |
| <b>6.0 Resultados y discusión</b>   | <b>33</b> |
| 6.1 Cultivo celular   | 33        |
| 6.2 Amplificación de <i>PMM2</i>  | 33        |
| 6.3 Diagnóstico genético  | 37        |
| 6.3.1 Diagnóstico genético del paciente 1   | 37        |
| 6.3.1.1 Variante patogénica c.422G>A (p.R141H)  | 38        |
| 6.3.1.2 Variante patogénica c.395T>C (p.I132T)  | 38        |
| 6.3.1.3 Herencia  | 39        |
| 6.4.2 Diagnóstico genético del paciente 2   | 41        |
| 6.4.3 Diagnóstico genético del paciente 3   | 42        |
| 6.4.3.1 Variante c.208+25G>T  | 43        |
| 6.4.3.2 Variante patogénica c.1312 C>T (p.R438W)                                      | 44        |
| 6.4.3.3 Identificación de splicing alternativo causado por la variante c.298+25G>T    | 44        |
| 6.4.3.4 Alelo complejo c.[208+16_208+19dup; 1312C>T]                                  | 48        |
| 6.4.3.5 Alelo complejo c.[208+16_208+19dup; 208+25G>T]                                | 48        |
| 6.4.3.6 Herencia  | 49        |
| 6.4.3.7 Marcador tetrasacárido para el diagnóstico de ALG1-CDG                        | 52        |
| 6.4.4 Paciente 4  | 54        |
| 6.4.4.1 Variante c.178 G>T  | 54        |
| 6.4.4.2 Caracterización del mecanismo patogénico de la variante c.178 G>T y herencia  | 55        |
| <b>7.0 Conclusiones</b>   | <b>62</b> |
| <b>8.0 Perspectivas</b>   | <b>64</b> |
| <b>9.0 Bibliografía</b>   | <b>65</b> |
| <b>10.0 Anexos</b>  | <b>73</b> |
| 10.1 Información sobre CDG asociados a la <i>N</i> -glicosilación                     | 73        |
| 10.2 Información sobre CDG mixtos   | 75        |
| 10.3 Variantes reportadas en <i>PMM2</i> y su significancia clínica                   | 78        |
| 10.4 Pacientes reportados con <i>PMM2</i> -CDG, variantes y estrategia de diagnóstico | 79        |
| 10.5 Cromatogramas de la secuenciación de Sanger del paciente 2                       | 81        |
| 10.6 Cromatogramas de la secuenciación de Sanger del paciente 3 de <i>PMM2</i>        | 83        |
| <b>11.0 Publicaciones durante la estancia de maestría</b>                             | <b>86</b> |
| Publicaciones relacionadas al trabajo de la maestría                                  | 86        |
| Otras publicaciones   | 86        |

## Figuras

- Figura 1** Tipos de glicoconjugados.
- Figura 2** Vía de la *N*-glicosilación.
- Figura 3** Síntesis de GDP-Man, Dol-P-Man y su destino en las vías de glicosilación.
- Figura 4** Visión general de los diferentes compartimentos celulares implicados en la *N*-glicosilación.
- Figura 5** Perfil de sialilación de la transferrina por isoelectroenfoque
- Figura 6** Algoritmo de diagnóstico para los desordenes congénitos de la glicosilación.
- Figura 7** Perfil de sialilación de la tranferrina por isoelectroenfoque de los pacientes.
- Figura 8** Cultivo celular de fibroblastos de los pacientes
- Figura 9** Visualización de las amplificaciones con oligonucleótidos del gen constitutivo b-actina a partir del cDNA de los pacientes estudiados.
- Figura 10** Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de la secuencia codificante de *PMM2* a partir de ADNc
- Figura 11** Condiciones de termociclaje ocupadas para la amplificación de todo el gen *PMM2* en ADNc utilizando el oligonucleótido *PMM2*s y el oligonucleótido *PMM2*as.
- Figura 12** Visualización de la amplificación por PCR en gel de agarosa de todo el gen *PMM2*.
- Figura 13** Cromatogramas resultados de la secuenciación de Sanger en *PMM2* del paciente 1
- Figura 14** Resultados de la secuenciación exómica del paciente 1.
- Figura 15** Diseño de oligonucleótidos para la secuenciación de Sanger del exón 5 de *PMM2*.
- Figura 16** Visualización de la amplificación por PCR en gel de agarosa del exón 5 del gen *PMM2*.

- Figura 17** Resultados de la secuenciación exómica del paciente 3
- Figura 18** Rol de *ALG1* en la *N*-glicosilación.
- Figura 19** Mutación c.208+25G>T y su posible consecuencia molecular en el splicing del exón 1.
- Figura 20** Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de *ALG1* y la secuenciación de Sanger
- Figura 21** Visualización de la amplificación por PCR en gel de agarosa del gen *ALG1*
- Figura 22** Isoformas encontradas después de la subclonación por PCR del amplicón *ALG1* del tercer paciente.
- Figura 23** Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de *ALG1* en ADNg para la variante c.208+25G>T.
- Figura 24** Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de *ALG1* en ADNg para la variante c.1312C>T.
- Figura 25** Visualización de la amplificación por PCR en gel de agarosa del gen *ALG1* en ADNg.
- Figura 26** Cromatogramas de la secuenciación de ADNg de un control sano, madre, padre y paciente que muestran la herencia de las variantes de *ALG1* c.208+16\_208+19dup, c.208+25G>T y c.1312C>T.
- Figura 27** Cromatogramas totales de iones del *N*-tetrasacárido
- Figura 28** Resultados de la secuenciación exómica del paciente 4 que indican la presencia de las mutaciones puntuales c.422 G>A (p.R141H) y c.178 G>T en el gen *PMM2*.
- Figura 29** Visualización de la amplificación por PCR en gel de agarosa de la secuencia codificante de *PMM2* en el paciente 4
- Figura 30** Resultados de la secuenciación de Sanger del paciente 4 y sus progenitores en todas las isoformas encontradas.
- Figura 31** Empalme alternativo y sus consecuencias en el gen *PMM2* del paciente 4.
- Figura 32** Estrategia de PCR alelo específico para la detección de la variante c.178G>T.
- Figura 33** Visualización de la amplificación de la PCR alelo específico en gel de agarosa.

## Tablas

|                 |   |
|-----------------|---|
| <b>Tabla 1</b>  | Cuadro clínico con las características representativas presentes en los cuatro pacientes separadas por sistema neurológico, muscular, físico y digestivo. |
| <b>Tabla 2</b>  | Reactivos utilizados en la estandarización de las condiciones óptimas de PCR.   |
| <b>Tabla 3</b>  | Oligonucleótidos diseñados para la amplificación completa del gen PMM2 en ADNc.   |
| <b>Tabla 4</b>  | Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del exón 5 del gen PMM2.   |
| <b>Tabla 5</b>  | Características de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen ALG1.   |
| <b>Tabla 6</b>  | Condiciones de termociclaje ocupadas para la amplificación de todo el gen ALG1 en ADNc utilizando los oligonucleótidos ALG1s/ALG1-R2.                     |
| <b>Tabla 7</b>  | Características de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen ALG1 en ADNg.   |
| <b>Tabla 8</b>  | Condiciones de termociclado ocupadas para la amplificación del gen ALG1 en ADNg.  |
| <b>Tabla 9</b>  | Características de los oligonucleótidos diseñados para la PCR alelo específico del gen PMM2.  |
| <b>Tabla 10</b> | Condiciones de termociclado ocupadas para la PCR alelo específico del gen PMM2.   |

## Resumen

La glicosilación es una modificación que consiste en la unión covalente de un carbohidrato (glicano) a otros glicanos, lípidos, proteínas o ácido ribonucleico (ARN), resultando en glicoconjugados conocidos como glicolípidos, glicoproteínas o glicoARN respectivamente. Para que esta modificación se lleve a cabo correctamente es necesaria la eficiente actividad enzimática de las proteínas involucradas en la adición y remoción de glicanos (glicosiltransferasas y glicosidasas), disponibilidad de glicanos, disponibilidad de donadores de glicanos así como de la homeostasis celular, por ello, mutaciones en los genes que codifican para proteínas implicadas, directa o indirectamente, en la glicosilación, son generalmente graves, causando enfermedades metabólicas hereditarias conocidas como desórdenes congénitos de la glicosilación (CDG). Estas enfermedades se caracterizan por ser multisistémicas y clínicamente heterogéneas, actualmente se han reportado más de 150 tipos de CDG asociados a diferentes vías de la glicosilación, aunque la mayoría se relacionan a la vía de la *N*-glicosilación. Lamentablemente, estas enfermedades son subdiagnosticadas por falta de sospecha clínica y ausencia de plataformas de diagnóstico especializadas. Esta situación es particularmente grave en América Latina donde, en comparación con otros países desarrollados, se han reportados un número limitado de casos.

Consideramos que incrementar el diagnóstico no sólo es importante para la salud de las familias que hoy sufren de CDG sino también por el potencial de identificar nuevas variantes y mecanismos patogénicos en la población latinoamericana que contribuyan a la mayor comprensión de estas enfermedades. En este trabajo se abordó el diagnóstico molecular de 4 pacientes con sospecha bioquímica de CDG afectando la vía de la *N*-glicosilación, concluyendo el diagnóstico genético de tres de ellos, confirmando PMM2-CDG en dos casos y ALG1-CDG en otro; los primeros casos de estos tipos de CDG reportados en México. Adicionalmente, reportamos la identificación en estos pacientes de variantes patogénicas no descritas previamente, caracterizando su efecto molecular deletéreo sobre el proceso de empalme de los genes afectados.

## **Abstract**

Glycosylation is a modification that consists of the covalent binding of a carbohydrate (glycan) to other glycans, lipids, proteins or ribonucleic acid (RNA), resulting in glycoconjugates known as glycolipids, glycoproteins or glycoRNA respectively. For this modification to be carried out correctly, the efficient enzymatic activity of the proteins involved in the addition and removal of glycans (glycosyltransferases and glycosidases), availability of glycans, availability of glycan donors, as well as cellular homeostasis, is necessary. Mutations in genes that code for proteins involved, directly or indirectly, in glycosylation, are generally serious, causing inherited metabolic diseases known as congenital disorders of glycosylation (CDG). These diseases are characterized by being multisystemic and clinically heterogeneous, currently more than 150 types of CDG associated with different glycosylation pathways have been reported, although most are related to the N-glycosylation pathway. Unfortunately, these diseases are underdiagnosed due to lack of clinical suspicion and the absence of specialized diagnostic platforms. This situation is particularly serious in Latin America where, compared to other developed countries, a limited number of cases have been reported.

We consider that increasing the diagnosis is not only important for the health of families that today suffer from CDG but also because of the potential to identify new variants and pathogenic mechanisms in the Latin American population that contribute to a better understanding of these diseases. In this work, the molecular diagnosis of 4 patients with biochemical suspicion of CDG affecting the N-glycosylation pathway was addressed, concluding the genetic diagnosis of three of them, confirming PMM2-CDG in two cases and ALG1-CDG in another; the first cases of these types of CDG reported in Mexico. Additionally, we report the identification in these patients of pathogenic variants not previously described, characterizing their deleterious molecular effect on the splicing process of the affected genes.

## 1.0 Introducción

Según datos de la Organización Mundial de la Salud, existen cerca de 7.000 enfermedades denominadas “poco frecuentes” (EPOF) que afectan al 7% de la población mundial [1, 2, 3, 4, 5]. Las EPOF constituyen un grupo extenso y complejo de entidades clínicas. Se estima que hay cerca de 42 millones de individuos afectados en Latinoamérica [1, 2]. Como parte del conjunto de patologías agrupadas como EPOF, se encuentra el grupo de trastornos hereditarios llamados desórdenes congénitos de la glicosilación o CDG (del inglés Congenital Disorders of Glycosylation) [1, 2,3].

Los CDG son enfermedades hereditarias metabólicas, bioquímica y clínicamente heterogéneas, generalmente multiorgánicas y que frecuentemente presentan afectación del sistema nervioso central (SNC). Este tipo de enfermedades se enfrentan a un importante subdiagnóstico, debido a la falta de plataformas de diagnóstico genético y a la falta de sospecha clínica por el desconocimiento de sus identificación y abordaje [6, 7, 8].

El primer tipo de CDG fue descrito en 1980 a la fecha se han caracterizado más de 140 tipos distintos, siendo uno de los grupos de enfermedades metabólicas hereditarias en expansión más destacables en las últimas décadas [5]. En contraste con los avances a nivel global, fue hasta el 2014 que se realizó el primer diagnóstico de CDG en México, en el Laboratorio de Glicobiología Humana y Diagnóstico Molecular [9]. Se reportaron dos pacientes con síndrome de cutis laxa, causado por mutaciones en una subunidad de la bomba de protones ATP6V0A2, que participa en el mantenimiento de la homeostasis del Golgi [9].

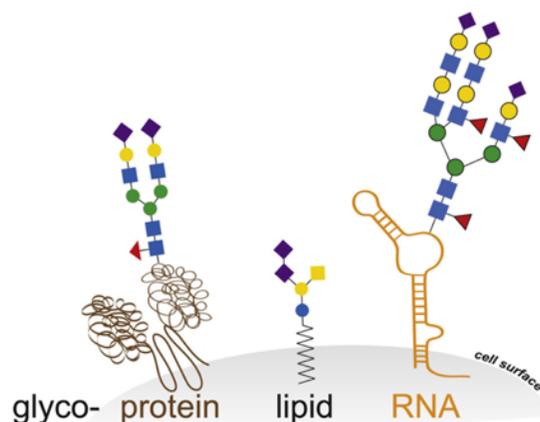
Solo en pocos casos con cuadro clínico característicos se puede establecer una sospecha firme de CDG, por ello, es importante que en los pacientes que presentan cuadros clínicos particularmente caracterizados por afectación multisistémica se realice una prueba de isoelectroenfoque (IEF) de transferrina sérica (N-glicoproteína). Esta prueba permite identificar si la transferrina (marcador biológico) está hipoglicosilada y de ser así establecer una sospecha bioquímica de CDG, sin embargo, posteriormente es necesario determinar la causa de la hipoglicosilación, es decir, el gen causal y las variantes patogénicas responsables [5].

Es importante considerar que no todos los CDG son causados por defectos en la vía de la N-glicosilación, por lo que la prueba de IEF de transferrina es normal para los CDGs causados por defectos de otras vías de la glicosilación e incluso en algunos casos excepcionales de genes involucrados en la N-glicosilación. Por ello, es necesario establecer distintas estrategias que permitan lograr un diagnóstico genético que impacte favorablemente en la salud del paciente y de su familia.

## 2.0 Antecedentes

### 2.1 Glicosilación

La glicosilación es un proceso enzimático mediante el cual se establece un enlace covalente entre un glicano y un lípido, proteína o ácido ribonucleico (ARN), dando lugar a los glicoconjugados que pueden ser glicolípidos, glicoproteínas o glicoARN, respectivamente (figura 1) [21, 47].



**Figura 1.** Tipos de glicoconjugados. Imagen tomada de: Flynn RA, Pedram K, Malaker SA, et al. Small RNAs are modified with N-glycans and displayed on the surface of living cells. Cell. 2021;S0092-8674(21)00503-1. doi:10.1016/j.cell.2021.04.023

Las reacciones de glicosilación son llevadas a cabo por distintas familias de glicosiltransferasas, que utilizan dos formas de sustratos donadores activados, ya sea glicosil-nucleótidos o monosacáridos unidos a dolicol-fosfato (Dol-P). El componente glicano de los glicoconjugados es de suma importancia debido a que puede definir su síntesis y función, ya que su estructura (composición de monosacáridos y enlaces entre ellos) codifica información biológica relevante tanto para definir la interacción del glicoconjugado con sus ligandos como para el control de calidad de su síntesis en el caso de los *N*-glicanos [12, 21]. Se ha reportado que más del 50% de proteínas humanas están glicosiladas y esto les permite llevar a cabo funciones específicas de reconocimiento, comunicación y regulación celular, entre otras [13, 21].

La biosíntesis de los glicoconjugados se lleva a cabo en distintos compartimentos celulares, incluyendo el retículo endoplásmico (RE), el citosol y el aparato de Golgi. Esta biosíntesis es dependiente de la correcta y eficiente actividad enzimática de las glicosiltransferasas (enzimas encargadas de la adición de glicanos), así como de glicosidasas (enzimas encargadas de la remoción de glicanos) que participan en

el remodelamiento de los glicanos, no obstante, se requiere adicionalmente de las actividades de otras proteínas necesarias para sustentar las reacciones de glicosilación, como lo son los transportadores de glicosilnucleótidos, así como proteínas involucradas en el tráfico celular y la homeostasis del Golgi, por mencionar algunas [12,13].

Existen diferentes tipos de glicosilación con rutas de biosíntesis específicas. Los tipos de glicosilación presentes en el ser humano son; la *N*-glicosilación, la *O*-glicosilación, las anclas de Glicosil-fosftaidil-inositol (GPI) y la formación de glicoesfingolípidos, [21,47].

Este proyecto se enmarca en el estudio en la vía de la *N*-glicosilación.

### **2.1.1 N-glicosilación**

La *N*-glicosilación es una modificación co- y post-traducciona, que consiste en la formación de un enlace covalente entre un glicano y el aminoácido asparagina (Asn), ubicado en la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr de una proteína, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina (debido al impedimento estérico que ocasiona) [12, 22].

Esta vía se clasifica en dos etapas; la primera etapa, conocida como la biosíntesis y transferencia del glicano precursor y la segunda, conocida como la maduración del *N*-glicano. [10]

La primera fase inicia con la activación del lípido conocido como dolicol mediante la adición de dos grupos fosfato, proceso que ocurre en el lado citosólico del RE. El Dol-P sirve como base para el ensamblaje del glicano también referido como oligosacárido unido a lípido (lipid-linked oligosaccharide, LLO). Este proceso inicia al añadirse una molécula de *N*-acetil-glucosamina (GlcNAc) y continúa en el lado citosólico del RE hasta completar la síntesis de la estructura Dol-P-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>5</sub>, en este punto una proteína flipasa se encarga de internar este LLO al lumen del RE. Ya internalizado, se le adicionan las 4 manosas (Man) y 3 glucosas (Glc) restantes dando lugar al glicano precursor Dol-P-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>Glc<sub>3</sub>. Una vez sintetizado el glicano precursor, el complejo enzimático oligosacariltransferasa (OST) transfiere el glicano precursor a la Asn de la proteína. [11, 12, 21].

Posteriormente, la glicoproteína entra a un sistema de control de calidad, mediado por las chaperonas calnexina y calreticulina, durante el cual se eliminan los dos residuos de glucosa más externos del glicano precursor. Si la glicoproteína no se encuentra plegada correctamente, se le adiciona una glucosa terminal para promover la reasociación a la calnexina, prolongando así su retención en el sistema de plegamiento del RE. Este ciclo de adición / remoción de Glc puede prolongarse hasta que la glicoproteína liberada de la calnexina se encuentre plegada

correctamente, sin embargo, cuando la glicoproteína sigue estando permanentemente mal plegada, son transportadas al citoplasma, donde son ubiquitinadas y degradadas por proteosomas. [21, 22]

Por otro lado, si la glicoproteína está plegada correctamente, la eliminación del tercer residuo de Glc promueve la disociación de la calnexina. Una vez liberada la glicoproteína es transportada al Golgi y comienza la etapa de maduración del *N*-glicano [21, 22].

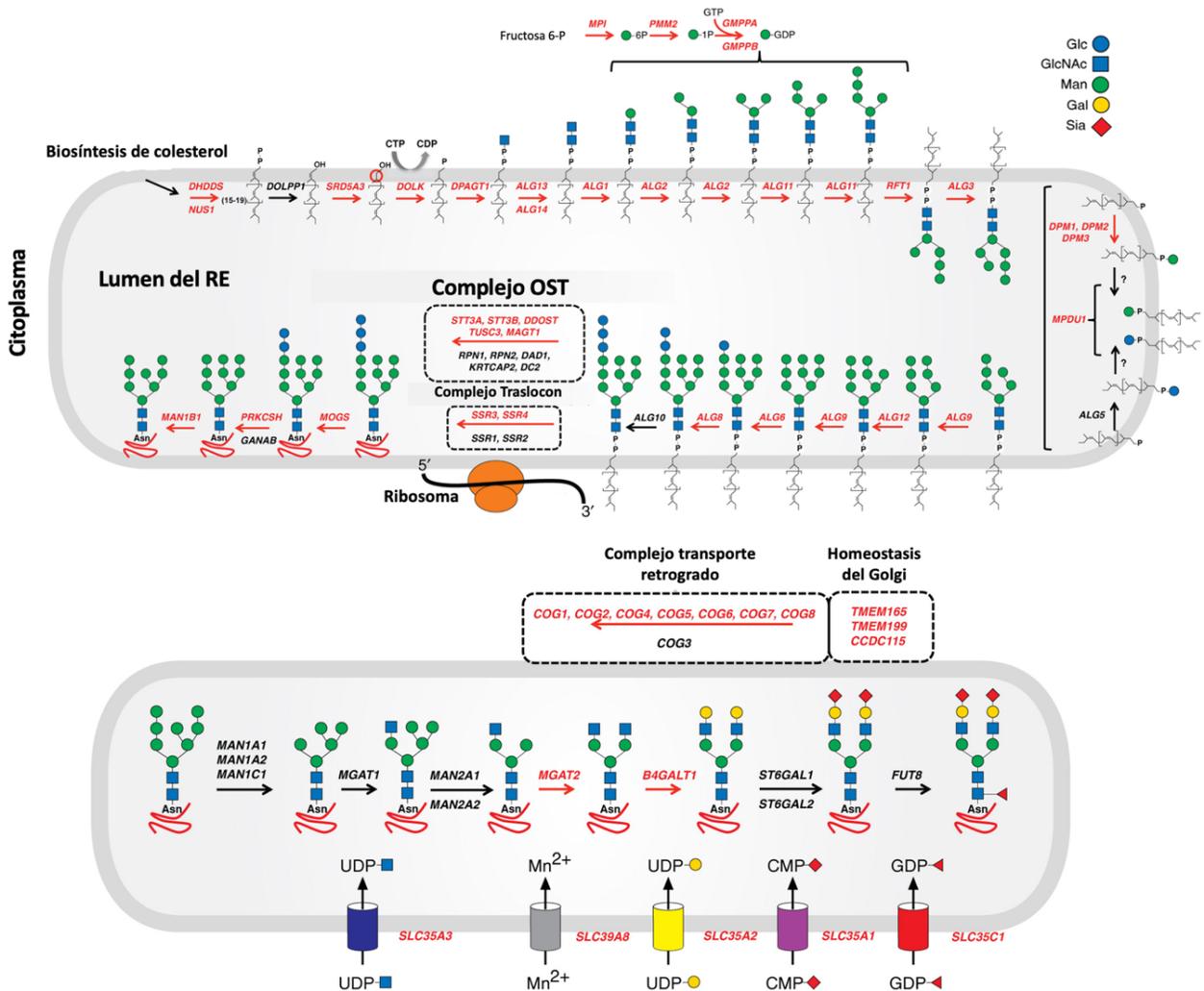
Dentro del aparato de Golgi, la maduración del *N*-glicano inicia con la remoción de manosas mediado por manosidasas (glicosidasas), dando lugar al glicoconjugado con estructura:  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ . Posteriormente, se adicionan dos moléculas de GlcNAc, una vez en el compartimento medio del Golgi, se agrega otro residuo de GlcNAc dando lugar a  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ .

La glicoproteína continúa su maduración en la cisterna trans del Golgi donde se le adicionan 2 moléculas de galactosa (Gal) dando lugar a  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Gal}_2$  para finalmente ser sialilada, lo cual consiste en la adición de ácido siálico (Sia), lo cual determina el punto final de la maduración del glicano resultando en la estructura  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Gal}_2\text{Sia}_2$  [21,22]. Una vez adicionado el Sia, la glicoproteína es exportada por transporte vesicular a su destino final.

Cabe mencionar que el control de calidad en glicoproteínas también se encuentra dentro del Golgi, ya que algunas de las glicoproteínas pueden ser exportadas del RE sin estar correctamente plegadas o incluso algunas que al salir del RE abandonan ese correcto plegamiento. En el Golgi, estas glicoproteínas mal plegadas son fosforiladas en el carbono 6 de residuos de manosas para su reconocimiento en la cisterna trans-Golgi donde son transportadas a la vía de degradación de los lisosomas [10, 11, 12, 21, 22].

Las glicosiltransferasas y glicosidasas son responsables de la biosíntesis de *N*-glicoproteínas, sin embargo, para que dicha biosíntesis se lleve a cabo correctamente hay otros factores que deben participar; las glicosiltransferasas requieren de la disponibilidad de sustratos activados como glicosil-nucleótidos (GDP-Man, UDP-Glc, UDP-Gal, UDP-GlcNAc y CMP-Sia) o unidos a Dol-P, así como la participación de otro tipo de proteínas como los transportadores de glicosilnucleótidos, flipasas, bombas transportadoras de protones, entre otros. [10, 21, 22].

El conjunto de modificaciones y reacciones que comprenden el proceso de formación de *N*-glicoproteínas se ilustra en figura 2 [21,22].



**Figura 2.** Vía de *N*-glicosilación. Imagen tomada y modificada de: Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Stanley, P., Hart, G. W., Aebi, M., ... Seeberger, P. H. (2017). *Essentials of glycobiology*.

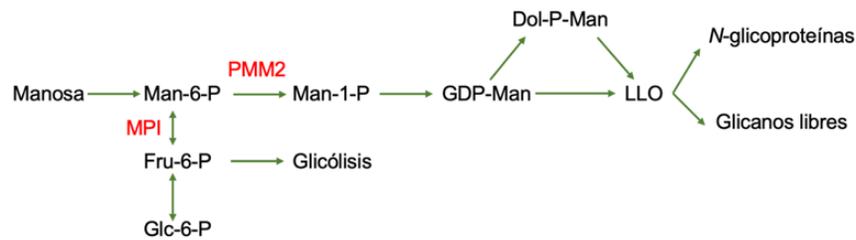
**2.1.1.1 Síntesis de GDP-Manosa y Dol-P-Man**

La Man es un monosacárido esencial de un *N*-glicano. Las manosiltransferasas responsables de su adición en la cara citosólica del RE utilizan GDP-Man como sustrato donador, posteriormente, las manosiltransferasas que actúan en la cara luminal del RE utilizan Dol-P-Man como sustrato donador. La síntesis de GDP-Man requiere de la síntesis previa de manosa-6-P (Man-6-P) y su conversión a manosa-1-P (Man-1-P) (figura 3). Existen dos formas de producir Man-6-P; mediante fosforilación directa, a través de una hexoquinasa o por la conversión de fructosa-6-P (Fru-6-P) a Man-6-P mediante la acción de la fosfomanosa isomerasa (MPI). La MPI tiene una función preponderante para sintetizar Man-6-P ya que la manosa exógena libre no es común en la dieta, por lo que la principal fuente para sintetizar

Man-6-P es a partir de la Fru-6-P, derivada del metabolismo de glucosa [15, 16].

Posteriormente, la Man-6-P es convertida en Man-1-P en una reacción catalizada por la enzima fosfomanomutasa II (*PMM2*) [15, 16, 17].

Como se ha mencionado anteriormente, la *N*-glicosilación comprende un conjunto de modificaciones que dependen de una actividad enzimática eficiente de las proteínas participantes, así como del mantenimiento de las condiciones óptimas en los organelos que participan en ella, la disponibilidad de sustratos y del transporte de estos sustratos. Debido a que la Man-6-P y la Man-1-P son precursores obligatorios de GDP-Man, el no producir cantidades suficientes reduce la formación de GDP-Man, generando problemas de disponibilidad de sustrato donador para las reacciones de manosilación y causando hipoglicosilación de *N*-glicoproteínas [17, 18].



**Figura 3.** Síntesis de GDP-Man, Dol-P-Man y su destino en las vías de glicosilación.

La presencia de variantes patogénicas de genes que participan en el proceso de glicosilación, incluyendo aquellos que participan en la síntesis de los sustratos donadores de las glicosiltransferasas, son causantes de CDG [6, 7, 8].

El CDG más frecuente es causado por mutaciones en *PMM2* (Figura 3), lo cual reduce la síntesis de GDP-Man y por lo tanto afecta la *N*-glicosilación. En la siguiente sección haremos una breve descripción de los CDG [6, 7].

### 2.1.2 Desórdenes congénitos de la glicosilación (CDG)

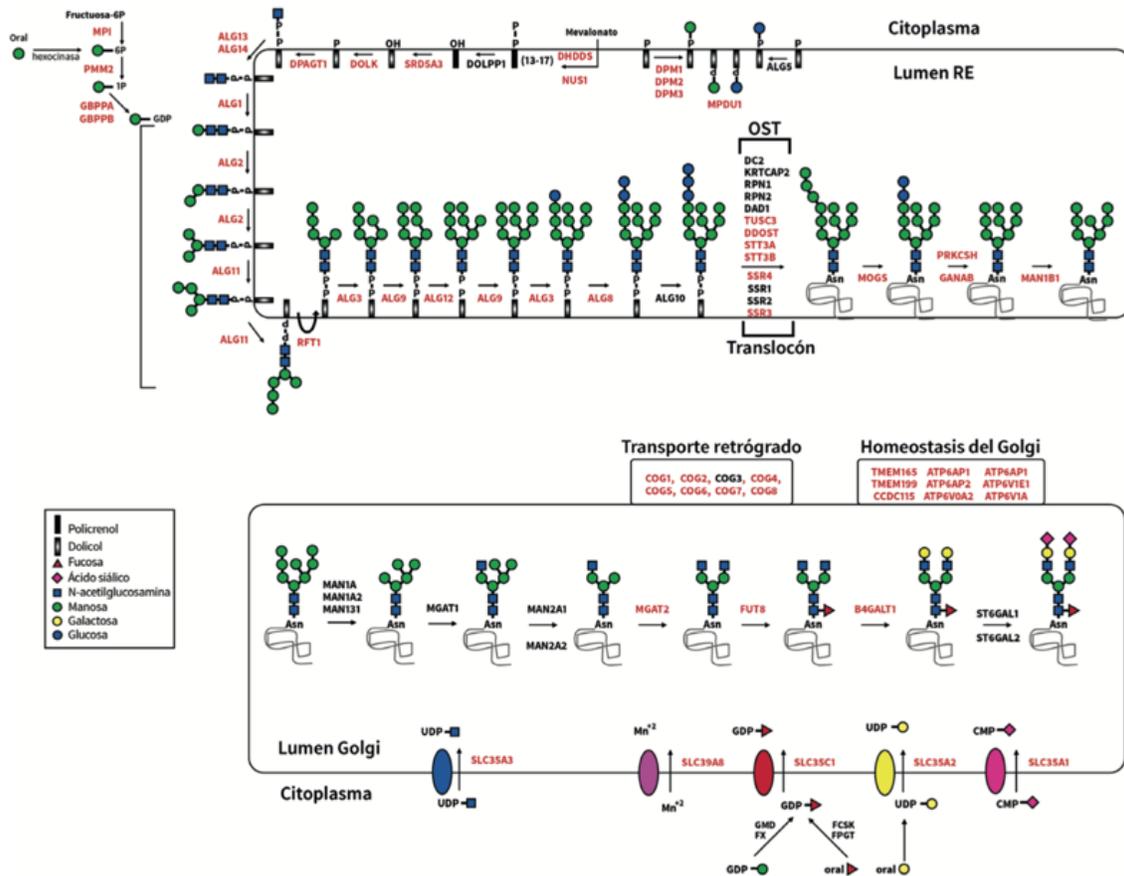
Los CDG son enfermedades multisistémicas causadas por defectos en el proceso de glicosilación [23] que frecuentemente se ven caracterizada por la presencia de: convulsiones, retraso mental, retraso psicomotor, hipoglicemia, anomalías en la digestión y coagulación, entre otras alteraciones [1, 8, 9, 24].

Los defectos ocurren en la activación, presentación y/o transporte de precursores de azúcar; glicosidasas, glicosiltransferasas y proteínas que participan en el tráfico celular y mantenimiento de la homeostasis del Golgi [6, 7, 22, 23].

Hasta la fecha, han sido descritos más de 150 tipos de CDG asociados a diferentes vías de glicosilación. La mayoría de los CDG afectan a la vía de la *N*-glicosilación, sin embargo, existen CDG que afectan simultáneamente la *N*-glicosilación y/o vías de glicosilación adicionales, los cuales son tratados en la sección 2.1.2.1.3.

### 2.1.2.1 CDG asociados a la *N*-Glicosilación

Los CDG asociados a defectos en la biosíntesis de *N*-glicanos bioquímicamente se clasifican en 2 tipos, los CDG de tipo I (CDG-I) son aquellos que resultan de variantes patogénicas en los genes codificantes para las proteínas que participan en la biosíntesis y transferencia del glicano precursor (GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>Glc<sub>3</sub>), causando una síntesis incompleta del glicano (figura 4). Los CDG de tipo II (CDG-II) resultan de variantes patogénicas de genes involucrados en el proceso de maduración de este glicano, causando que, los glicanos están truncados y no logran su maduración completa (CDG-II) (figura 4) [23,24].



**Figura 4.** Visión general de los diferentes compartimentos celulares implicados en la *N*-glicosilación. Se señalan los genes participantes en la síntesis de *N*-glicanos y los que se han reportado afectados (rojo) en casos de CDG. RE: retículo endoplásmico. Figura tomada

y modificada de Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al. 2017. "Essentials of Glycobiology. 3rd Edition." Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor.

#### **2.1.2.1.1 CDG de tipo I**

Se ha reportado que la ausencia total de *N*-glicanos es mortal, por lo tanto, las variantes patogénicas que se presentan en un paciente (homocigotas o heterocigotas compuestas) permiten siempre una actividad residual, ya sea porque ambas mutaciones o al menos una de ellas, codifican una proteína con actividad residual [22,23].

El CDG más común es causado por mutaciones en *PMM2* conocido como *PMM2*-CDG con más de 900 casos identificados en todo el mundo y con una prevalencia de hasta 1 de cada 20,000 personas. Los pacientes con *PMM2*-CDG presentan un cuadro clínico caracterizado por: retraso psicomotor y del desarrollo con afectaciones que tienden a ser de moderadas a graves, hipotonía, dismorfias en extremidades o faciales, retraso del crecimiento, disfunción hepática, coagulopatía y funciones endocrinas anormales [22, 23, 24].

El segundo CDG más común es el *MPI*-CDG (también referido en algunos casos como *PM1*-CDG, causado por mutaciones en *MPI*) (*CDG-Ib*) con menos de 100 caso reportados en todo el mundo. Los pacientes con *MPI*-CDG presentan generalmente retraso en el crecimiento, hipoglucemia, coagulopatía, vómitos y diarrea intensos, enteropatía y fibrosis hepática, sin mostrar afectaciones en el sistema nervioso central [22, 23, 24, 25].

Además del *PMM2*-CDG y *MPI*-CDG, existen otros CDG de tipo I, los cuales están asociados a casi todos los pasos restantes de la biosíntesis y transferencia del glicano precursor, sin embargo, la cantidad de pacientes reportados es mucho menor a los reportados con *PMM2*-CDG o *MPI*-CDG [22, 23, 40]. Son 44 genes los que se han reportado con variantes patogénicas causantes de CDG y que participan en la *N*-glicosilación [11, 22]. Ello indica la complejidad de determinar el gen causal frente a una prueba anormal de IEF de transferrina.

#### **2.1.2.1.2 CDG de tipo II**

En los CDG de tipo II (*CDG-II*), el defecto se encuentra en la maduración del *N*-glicano, que puede ser causado por defectos en las glicosiltransferasas, transportadores de glicosil-nucleótidos, reguladores de pH vacuolar, así como defectos en las proteínas citoplasmáticas, proteínas participantes en las vías de glicosilación dentro de la célula y aquellas que se dedican a mantener la homeostasis del aparato de Golgi [19, 20].

Los subtipos de CDG que afectan estrictamente la *N*-glicosilación, sus hallazgos

clínicos, y demás información detallada se muestran en el anexo 10.1 [19, 20].

### **2.1.2.1.3 CDG mixtos**

Existen CDG causados por defectos en más de una vía de glicosilación. Esto ocurre por variantes patogénicas en genes que codifican para proteínas que participan en diferentes vías de glicosilación (transportadores, enzimas y cinasas) o que están involucradas en mantener la homeostasis de organelos donde ocurre la glicosilación. Se pueden distinguir mutaciones que afectan, la vía de síntesis del dolicol y Dol-P-Man, así como la sialilación y la homeostasis del aparato de Golgi [20]. Los CDG mixtos que afectan la *N*-glicosilación y otras vías, así como información sobre ellos más detallada se muestran en el anexo 10.2

## **2.2 PMM2-CDG**

El PMM2-CDG es el tipo de CDG más común y es causado por mutaciones en *PMM2* que codifica para la fosfomanomutasa II, una proteína homodimérica que se encuentra presente en el citosol y que cataliza la isomerización de la Man-6-P en Man-1-P para su conversión en el glicosilnucléotido GDP-Man, mediante la acción de *GBPPA* y *GBPPB*. El *PMM2* se encuentra en el cromosoma 16p13. El transcrito de *PMM2* consta de ocho exones, con una secuencia codificante de 738 pares de bases, que codifican una proteína de 246 aminoácidos [33, 34, 35, 36, 37].

El análisis genético de pacientes con PMM2-CDG ha llevado a la identificación de una gran cantidad de variantes patogénicas que generalmente son del tipo sin sentido o con cambio de sentido. Las primeras variantes patogénicas fueron reportadas en 1997 por Matthijs y colaboradores quienes, utilizando la técnica de secuenciación de Sanger, a partir de la amplificación por partes de *PMM2* con iniciadores que se alineaban a las uniones exón-intrón del gen, descubrieron mutaciones sin sentido en pacientes provenientes de diferentes regiones de Europa [34]. Todas las variantes patogénicas reportadas hasta la fecha en *PMM2* se muestran en el anexo 10.3

Actualmente, se conocen más de 90 variantes patogénicas en *PMM2*, las cuales disminuyen la actividad catalítica y / o la estabilidad de la enzima, lo que disminuye el nivel de Man-1P disponible para su posterior activación y conversión en GDP-Man [36,37]. A pesar de la alta cantidad de variantes patogénicas encontradas en *PMM2* y que es el CDG más común, previo a este trabajo, no se ha reportado ningún paciente con PMM2-CDG en México.

La variante patogénica c.422G>A (p.R141H) es la más frecuente y ha sido identificada en todos los grupos étnicos de acuerdo con la base de datos de exomas de gnomAD (del inglés Genome Aggregation Database). Los ensayos de actividad enzimática de *PMM2* en las células de los pacientes con PMM2-CDG han

demostrado una actividad enzimática prácticamente nula, esto sugiere que la mutación R141H es una mutación severa y la homocigocidad no es compatible con la vida. Los portadores heterocigóticos de esta mutación no presentan manifestaciones clínicas, a pesar de que la actividad enzimática en ellos se ve reducida incluso en un 60% de la normal.

La mayoría de los pacientes con PMM2-CDG son heterocigotos compuestos, siendo la combinación más común la R141H/F119L, en la que se ha demostrado que se reduce la actividad enzimática a un 10-30% de la actividad normal, lo que resulta en enfermedad [36, 37, 38, 39, 40, 41].

El cuadro clínico de los pacientes con PMM2-CDG es variable, generalmente son atáxicos, con extremidades largas y torsos cortos con otros padecimientos como retraso mental, hipoplasia cerebelosa, hepatomegalia, disfunción hepática y coagulopatía, infecciones graves, derrames pericárdicos, sin mencionar que pueden presentar pezones invertidos o acumulación anormal de grasa en zonas púbicas, estas dos últimas son características exclusivas de este CDG [38, 39]. Los síntomas presentes en estos pacientes se debe a la afectación preferencial de algunos órganos como el hígado, pulmones y SNC, siendo el cerebelo el más afectado por la deficiencia de PMM2 [40,41].

Los pacientes diagnosticados con PMM2-CDG tienen un pronóstico complicado debido a las múltiples afecciones que presentan y a la falta de tratamientos correctivos. Un reciente descubrimiento sugiere que el uso de acetazolamida disminuye los daños en el sistema cognitivo, motor y también mejora algunos parámetros en pacientes con alteraciones en la coagulación. El tratamiento con acetazolamida es el primer caso efectivo de tratamiento y es importante tenerlo en cuenta por el impacto positivo en la calidad de vida de los pacientes diagnosticados con PMM2-CDG [42]. Otro tipo de tratamiento que está encaminado a disminuir las afecciones causadas por las mutaciones (p.V44A, p.D65Y, p.P113L, p.R123Q, p.R141H, p.R162W, p.F207S, p.T237M y p.C241S) que generan un mal plegamiento de la proteína PMM2 es el uso de chaperonas farmacéuticas, sin embargo, para la mutación R141H, el uso de chaperonas no ha permitido generar un aumento en la actividad enzimática [38, 53].

La mayoría de los análisis genéticos de PMM2 se basan en el análisis por partes mediante el diseño oligonucleótidos específicos para la amplificación de cada exón incluyendo las uniones intrón/exón en ADN genómico, no obstante, existe una serie de desventajas al seguir las estrategias reportadas para el diagnóstico e identificación del PMM2-CDG, como los elevados costos que incluiría el hecho de diseñar un par de oligonucleótidos por cada exón (16 oligonucleótidos para los 8 exones de PMM2), la cantidad de reactivos ocupados para el montaje de la PCR para cada par de oligonucleótidos y el costo de la secuenciación de cada producto

de amplificación de los pares diseñados, sin mencionar el tiempo que tomaría el análisis de todos los datos recolectados y el diseño de los experimentos para obtenerlos.

El resumen de las estrategias ocupadas hasta la fecha para el diagnóstico de pacientes con PMM2-CDG, así como las variantes patogénicas identificadas que afectan a *PMM2*, el año en que fueron descritas y los autores se muestra en el anexo 10.4.

### **2.3 Método de diagnóstico de los CDG asociados a la *N*-glicosilación**

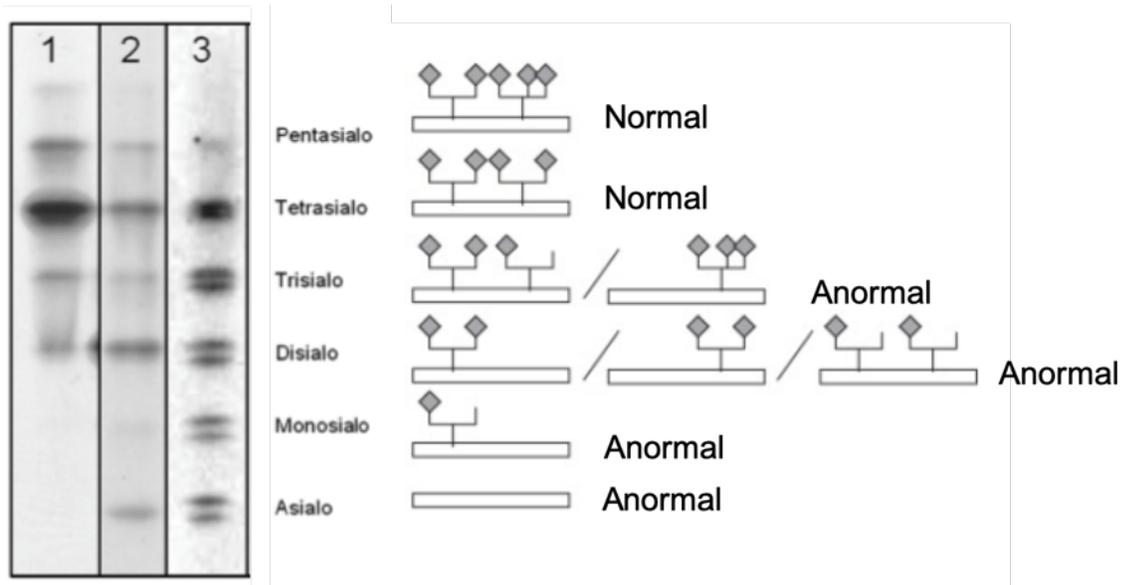
Los defectos de la *N*-glicosilación se pueden sospechar realizando un estudio de las isoformas de la transferrina (*N*-glicoproteína) en suero, (definidas por su punto isoeléctrico) mediante IEF, ya que estos defectos causan una migración anormal de dichas isoformas. Con excepción de ciertos polimorfismos, la migración diferencial de estas isoformas está determinada por la composición de los glicanos asociados a la transferrina, especialmente por su contenido en Sia (monosacárido cargado negativamente), lo que permite determinar la presencia de alteraciones de la *N*-glicosilación [55, 56, 57]. El perfil normal de IEF de la transferrina se caracteriza por la presencia mayoritaria de la isoforma con dos cadenas dobles cada una con Sia en su extremo terminal (transferrina tetrasialilada) (ver figura 5). Cuando existen defectos en la biosíntesis del glicano precursor o defectos en la maduración del *N*-glicano, la ausencia de ácido siálico dará como resultado el incremento en abundancia de las isoformas hipoglicosiladas (isoforma trisialilada, disialilada, monosialilada y asialilada) junto con la disminución evidente de la presencia de la isoforma tetrasialilada, aunque con perfiles diferenciales que permiten distinguir si el defecto ocurre en la etapa de la síntesis del glicano precursor o posterior a su transferencia a la proteína [58, 59, 60].

Aunque el IEF de transferrina sérica sigue siendo el método de elección para diagnosticar enfermedades de *N*-glicosilación, recientemente se han utilizado técnicas como HPLC, electroforesis capilar y espectrometría de masas para discriminar el estado de glicosilación de la transferrina [61].

Se pueden identificar dos patrones característicos en la migración de isoformas de la transferrina sérica en pacientes con CDG por IEF; los pacientes con CDG de tipo Ix (x debido a que en esta etapa del diagnóstico se desconoce el gen afectado) se caracterizan por presentar un aumento de las isoformas di- y asialilada, este patrón de migración es causado por defectos que afectan la biosíntesis o transferencia del *N*-glicano que resulta en una falta de transferencia de cadena completa a glicoproteínas, mientras que los pacientes con CDG de tipo IIx presentan un patrón menos claro ya que todas las isoformas con bajo contenido de ácido siálico son más abundantes (asialilada, monosialilada, disialilada y trisialilada), este patrón de

migración está causado por mutaciones en genes implicados en la maduración de *N*-glicanos, posterior a la transferencia del glicano del RE al Golgi [48, 56, 57].

Los perfiles de sialilación se muestran en la figura 5.



**Figura 5.** Perfil de sialilación de la transferrina por isoelectroenfoque en una persona sana (1), en una persona con un CDG-I (2) y en una persona con un CDG-II (3).

Debido a que los patrones de CDG-Ix se conforman por isoformas de transferrina con cadenas ausentes, su análisis estructural no revela el defecto preciso, sólo indica que está localizado en alguna de las etapas que se llevan a cabo en el RE aunque recientemente se ha reportado que algunos pacientes con PMM2-CDG presentan un patrón normal de IEF.

#### 2.4 Algoritmo diagnóstico de los CDG

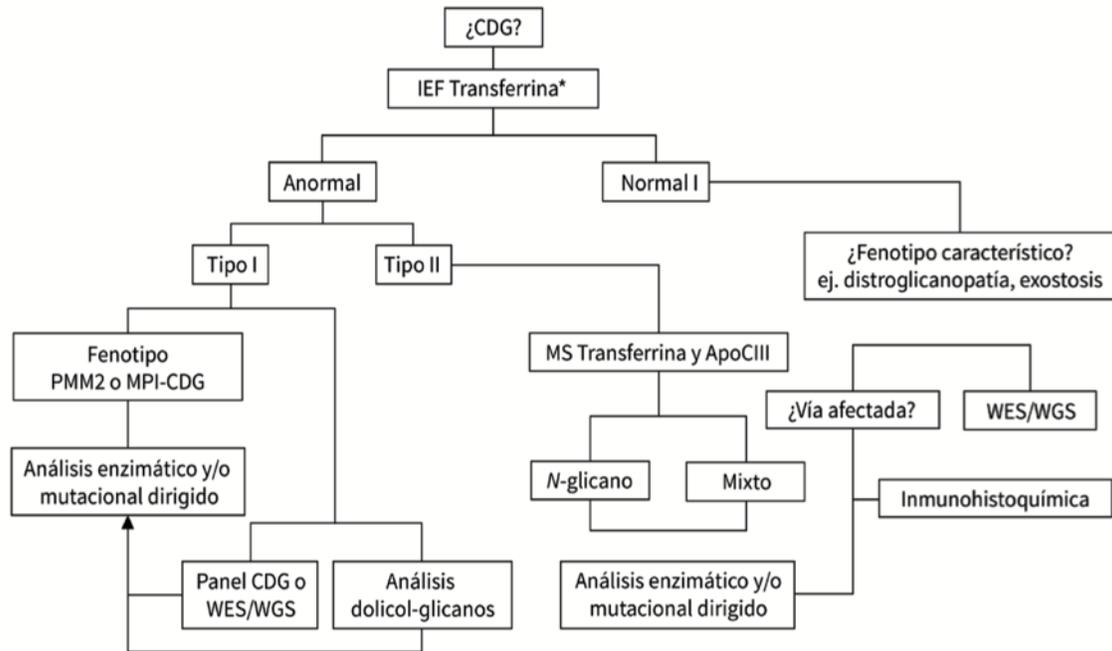
Frente a la sospecha clínica de CDG, se debe realizar un IEF de transferrina para establecer la sospecha bioquímica de un trastorno de la *N*-glicosilación. En caso de que el paciente muestre un perfil de tipo Ix o tipo IIx, anteriormente se recomendaba seguir con una serie de ensayos bioquímicos y moleculares como son; la medición de la actividad enzimática de PMM2 (por ser el tipo de CDG más común), análisis estructural de los intermediarios en la vía de síntesis de los glicanos (LLO), análisis estructural del glicano mediante HPLC acoplado a espectrometría de masas, entre otros, para poder determinar concretamente el paso afectado en la vía. Para complementar la sospecha bioquímica en un perfil de tipo IIx se debe realizar adicionalmente un IEF de ApoCIII (O-glicoproteína de tipo *N*-acetilgalactosamina (GalNAc)) para identificar defectos que afecten a otras vías de glicosilación,

particularmente la O-glicosilación, esto permite dirigir los estudios a ciertos grupos de genes que participan en procesos que afectan a más de una vía de biosíntesis (CDG Mixtos) [31,32].

No obstante lo anterior, recientemente se ha ido transitando a una estrategia más directa para determinar las variantes patogénicas, posterior al establecimiento de la sospecha bioquímica por un IEF de transferrina anormal. Esto se logra mediante la secuenciación exómica, la cual permite la detección de variantes en múltiples genes, lo cual representa una ventaja de suma importancia frente a algoritmos de diagnóstico bioquímico que pueden ser de difícil acceso y que incrementan la odisea diagnóstica de estos pacientes. En caso de encontrarse variantes patogénicas causantes de CDG reportadas previamente no se necesitarían más análisis o ensayos moleculares para determinar la consecuencia sobre la actividad enzimática de la proteína [32, 33]. Lamentablemente, estas enfermedades son subdiagnosticadas por falta de sospecha clínica y ausencia de plataformas de diagnóstico especializadas. Esta situación es particularmente grave en América Latina donde pocos casos han sido reportados comparativamente a otros países desarrollados, lo que conlleva al hallazgo de nuevas variantes patogénicas, donde sí es necesario llevar a cabo otros ensayos moleculares para determinar la consecuencia de estas sobre la actividad enzimática proteica y de esta forma completar el diagnóstico genético [31, 32, 33].

Esto es una realidad ya presente en algunos países, sin embargo, en México el acceso a la secuencia de exoma sigue siendo costosa, por lo que es variable/híbrida la estrategia a seguir.

La estrategia de diagnóstico después de la sospecha bioquímica de un CDG por una prueba de IEF de transferrina anormal se muestra en la figura 6.



**Figura 6.** Algoritmo de diagnóstico para los desordenes congénitos de la glicosilación.

## 2.5 Pacientes mexicanos con CDG-Ix

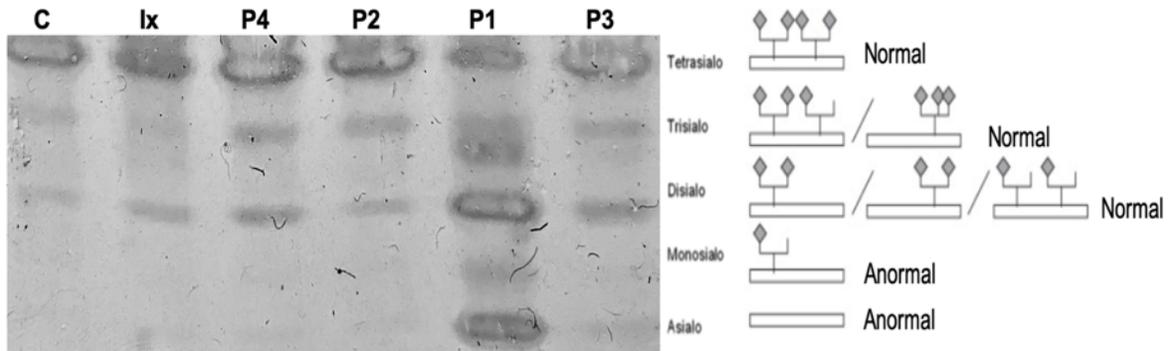
En el laboratorio de glicobiología humana y diagnóstico molecular recibimos muestras de suero provenientes de cuatro pacientes pediátricos con sospecha de CDG debido a manifestaciones multisistémicas con presencia de afectación del SNC. Las características representativas del cuadro clínico se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1.** Cuadro clínico con las características representativas presentes en los cuatro pacientes separadas por sistema neurológico, muscular, físico y digestivo.

| Síntomas                          | Pacientes              |                        |                         |                        |
|-----------------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
|                                   | Paciente 1<br>(5 años) | Paciente 2<br>(2 años) | Paciente 3<br>(12 años) | Paciente 4<br>(3 años) |
| <b>Neurológico</b>                |                        |                        |                         |                        |
| Alteraciones cerebrales           |                        |                        | X                       | X                      |
| Epilepsia                         |                        | X                      | X                       |                        |
| Regresión motriz                  | X                      | X                      | X                       | X                      |
| Discapacidad intelectual          | X                      | X                      | X                       | X                      |
| Auto- y hetero-agresión           |                        |                        | X                       |                        |
| Conductas disruptivas             |                        | X                      |                         |                        |
| <b>Muscular</b>                   |                        |                        |                         |                        |
| Atrofia muscular                  |                        |                        | X                       |                        |
| Falta de sostén cefálico          | X                      | X                      |                         |                        |
| Hipotonía                         |                        |                        |                         | X                      |
| Displasia cortical frontal        | X                      | X                      |                         |                        |
| <b>Físico</b>                     |                        |                        |                         |                        |
| Dismorfias menores                | X                      |                        | X                       | X                      |
| Microcefalia                      |                        |                        | X                       |                        |
| Estrabismo                        | X                      |                        | X                       |                        |
| Nistagmus                         |                        | X                      | X                       |                        |
| Hipoplasia cortical / subcortical |                        |                        | X                       |                        |
| Frente corta                      |                        |                        | X                       |                        |
| Cejas escasas                     |                        |                        | X                       |                        |
| Mejillas prominentes              | X                      | X                      | X                       |                        |
| Pezones invertidos                | X                      |                        |                         |                        |
| <b>Digestivo</b>                  |                        |                        |                         |                        |
| No control de esfínteres          |                        | X                      |                         |                        |

Siguiendo la estrategia recomendada para el diagnóstico de CDG, se decidió realizar un IEF de transferrina sérica para establecer una primera sospecha bioquímica de afectación a la *N*-glicosilación y desarrollar la metodología específica para establecer un diagnóstico genético.

El IEF mostró que los cuatro pacientes presentaban un perfil de hipoglicosilación de tipo Ix, caracterizado por un incremento particularmente de la isoforma disialilada y monosialilada en el caso del paciente 1 (P1, figura 7).



**Figura 7.** Perfil de sialilación de la transferrina por isoelectroenfoque de los pacientes. C, control sano; Ix, CDG-Ix; P4, paciente 4; P2, paciente 2; P1, paciente 1; P3, paciente 3.

Frente a este resultado y el cuadro clínico de los pacientes, se estableció la sospecha bioquímica de CDG de tipo Ix en los 4 pacientes, con la sospecha de la posible presencia de nuevas variantes en los genes causantes del CDG debido a que, como se describe anteriormente, la mayoría de los reportes de caso y estudios sobre pacientes con CDG han sido realizados en Europa o Estados Unidos [7, 8], sin mencionar que algunas de las variantes reportadas están restringidas por grupos étnicos y que en México el abordaje de esta problemática es prácticamente nuevo con solo tipo de CDG reportado [9].

Por esta razón y basados en la prevalencia de PMM2-CDG como el CDG más frecuente, en este trabajo se optó por analizar en estos pacientes el *PMM2* utilizando ADNc como templado para su amplificación, en vez de la estrategia más convencional de hacerlo a partir de ADNg. De esta forma, solamente es necesario diseñar dos oligonucleótidos que amplifiquen toda la región codificante debido a que la secuenciación de la región codificante de un gen permite la identificación de la (s) mutación (es) que causan el CDG. Adicionalmente, este proceso permite la identificación de mutaciones que originen procesos de empalme aberrantes, ya que pueden ser identificadas isoformas por electroforesis en gel de agarosa. Cuando fue posible se realizó secuenciación de exoma, abordando de esta forma una cobertura más completa, considerando la posibilidad de que el *PMM2* pudiera no ser el afectado en alguno de los pacientes abordados en este estudio.

### **3.0 Hipótesis**

La caracterización molecular de pacientes con CDG-Ix permitirá establecer diagnósticos genéticos de CDG en México y el hallazgo de nuevas variantes no reportadas previamente.

### **4.0 Objetivos**

#### **4.1 Objetivo Principal**

Establecer el diagnóstico genético en cuatro pacientes con sospecha de CDG-Ix.

#### **4.2 Objetivos Particulares**

1. Amplificar y secuenciar *PMM2* a partir de ADNc de los pacientes para detectar variantes patogénicas.
2. En aquellos pacientes sin mutaciones en *PMM2*, identificar mediante secuenciación de exoma clínico las variantes patogénicas causales de CDG de tipo I.
3. Identificar el patrón de herencia, así como el mecanismo patogénico en caso de no estar reportado previamente.

## **5.0 Metodología**

### **5.1 Isoelectroenfoque de transferrina sérica (TIEF)**

#### **5.1.1 Preparación de la muestra**

En 100  $\mu$ L de suero depositados en un tubo de 0.6 mL se agregaron; 5  $\mu$ L de 500mM  $\text{NaHCO}_3$  (Cat. S6297-250G sigma), 5  $\mu$ L de 20mM  $\text{FeCl}_3$  (Cat. 157740-100G sigma), posteriormente, se incubó 15 minutos a 4°C para detener la reacción, se hizo la dilución en un tubo de 0.6 mL la muestra de suero 1:10 con agua destilada (10  $\mu$ L de suero + 90  $\mu$ L de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada) y se resguardó a -20°C.

#### **5.1.2 Preparación de Biofilm**

Se colocaron 2 gotas de agua en el vidrio, inmediatamente, el film (Gel Support Film Cat. 1702983 de BioRad) se colocó por la parte hidrofóbica y adhirió al vidrio, después fue colocado en la cámara de polimerización mientras se preparó la mezcla del gel.

#### **5.1.3 Preparación del gel**

En un tubo falcon de 15 mL se adicionaron en orden los siguientes reactivos, 2.75 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, 1 mL de solución de Acrilamida 24.25% (cat. 4081-01 J. T. Baker) / Bis-acrilamida 0.75% (cat.4031-00 J. T. Baker), 1 mL de Glicerol 25% p/v (cat. H5433 Promega) (solución preparada al momento), 250  $\mu$ L de Anfolita pH 5-7 (cat. 163-1153 BioRad), 8  $\mu$ L de persulfato de amonio 10% (cat. V3131 Promega), 25  $\mu$ L FMN 0.1% (Cat. 1610501 BioRad) y 3  $\mu$ L de TEMED (Cat. 161-0801 BioRad). Una vez preparada esta mezcla, fue agregada donde se colocó el film y en la cámara de polimerización, con una pipeta de 1 mL de manera rápida para que no se polimerice antes de vaciarlo.

#### **5.1.4 Polimerización del gel (bajo lámpara de luz blanca)**

Para la polimerización del gel fue colocado bajo la lámpara de luz blanca durante 1 ½ hora a temperatura ambiente, en seguida, el gel se giró bajo la lámpara de luz blanca durante 15 min a temperatura ambiente, una vez polimerizado, se cargaron 2  $\mu$ L de las muestras diluidas 1:10 previamente, y se dejó absorber por 15 minutos a temperatura ambiente.

#### **5.1.5 Electroforésis en gel de agarosa**

Para la migración de las muestras el gel se dejó correr por 1 ½ horas a temperatura ambiente de la siguiente forma; 100 Volts por 15 minutos, 200 volts por 15 minutos y 450 volts por 60 minutos).

### **5.1.6 Fijación del anticuerpo**

Se adicionaron 100  $\mu$ L del anticuerpo esparciéndolo desde donde se colocaron las muestras hacia abajo, se incubó a 4°C durante 1 hora, se lavó en agitación a 55 rpm con solución fría de NaCl 0.9% (Cloruro de Sodio NaCl cat. 1.06404.5000) 3 veces durante 1 hora. Un segundo lavado fue realizado en agitación a 55 rpm con agua destilada 10 min a temperatura ambiente, la fijación se llevó a cabo con metanol 30%, TCA 12.5 % (trichloroacetic acid 99% cat. T4885-500G sigma) y ácido sulfosalicílico 4% (5-sulfosalicylic hydrate 95% cat. 390275-100G sigma) durante 30 min a temperatura ambiente con agitación a 55 rpm.

### **5.1.7 Tinción**

Para la tinción se siguieron los siguientes pasos; lavado por 2 min a temperatura ambiente con una mezcla (relación 1:1) de solución A ( $\text{CuSO}_4$  0.2% cat. 1843-01 J. T. Baker) y ácido acético 20% (cat. 9508-18 J. T. Baker) + solución B (metanol 60%) en agitación a 55 rpm y a temperatura ambiente.

La tinción se realizó a 65°C por 1 hora, con 50 mL de una solución (previamente preparada) que contiene 0.63g de azul de comassie R-250 (Cat. 20278 Thermo Scientific), 25 mL de ácido acético glacial (cat. 9508-18 J. T. Baker), 250 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada y 225 mL de metanol absoluto.

El proceso de desteñido fue a temperatura ambiente con una mezcla de solución A+B (relación 1:1) por 6 veces con agitación de 55 rpm.

Finalmente, se dejó secar toda la noche a temperatura ambiente y analizó una vez completamente seco.

## **5.2 Consentimiento informado**

Previo a la toma de la biopsia de los pacientes y/o individuos sanos, se les proporcionó a los padres de familia o tutores un formato de consentimiento informado, el cual es un documento informativo en donde se invita a las personas a participar en el proyecto de investigación. El aceptar y firmar los lineamientos que establece el consentimiento informado nos autorizó realizar el presente estudio, así como también permitió que la información recolectada, fuera utilizada para la elaboración de análisis y comunicación de los resultados obtenidos.

## **5.3 Toma de biopsia**

El procedimiento realizado para la toma de biopsias para el cultivo celular fue el siguiente; se desinfectó con alcohol el área, se administró lidocaína tópica, la cual se dejó actuar durante 20 minutos, la lidocaína fue retirada con un algodón con alcohol, la biopsia fue tomada con un bisturí y la muestra se colocó dentro de un tubo eppendorf de 1.5 mL, posteriormente, se lavó 3 veces la muestra con 2 mL de DPBS, se retiró el DPBS y añadieron 500  $\mu$ L de tripsina al 0.625%. El tubo fue colocado en la incubadora (37°C, 5%  $\text{CO}_2$ ) durante 20 minutos, la tripsina se

inactivó con 500  $\mu$ L de medio Gibco® AmnioMAX™ C-100, suplementado al 10% con Gibco® AmnioMAX™ C-100 Supplement y con antibiótico estreptomina y penicilina 1%, una vez inactivado fue centrifugar durante 5 minutos a 1500 rpm. Se desechó el sobrenadante y resuspendió la pastilla celular en 1 mL de medio, finalmente, las células fueron resuspendidas en una caja T25 con un volumen final de 5mL de medio de cultivo y colocadas en la incubadora (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

#### **5.4 Cultivo Celular**

A partir de la biopsia de piel del paciente, se realizó el cultivo primario de fibroblastos en medio D-MEM/F-12 (gibco® by life technologies™) suplementado al 20% de Suero Fetal Bovino (FBS gibco® by life technologies™) y antibiótico estreptavidina/penicilina al 1%, para la obtención de material genético.

##### **5.4.1 Pase Celular**

Los pasos para realizados para el pase celular fueron los siguientes:

Se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con 3 mL de PBS, posteriormente se agregó 1mL de Tripsina (gibco® by life technologies™) y fue incubado por tres minutos a 37°C, después, se inactivó la Tripsina con 4 mL de medio o PBS, se centrifugó a 1500 rpm durante cinco minutos a temperatura ambiente, se quitó el sobrenadante y resuspendió el pellet en medio de cultivo Gibco® AmnioMAX™ C-100, suplementado al 10% con Gibco® AmnioMAX™ C-100 Supplement y con antibiótico estreptomina y penicilina 1%.

#### **5.5 Obtención de RNA**

La obtención de RNA se realizó en tres etapas;

Etapa 1: Preparación de TRIzol

Se eliminó el medio de cultivo y lavaron con 3ml de PBS 2 veces, se adicionó 1mL de TRIzol (TRIzol® Reagent, ambion® by life technologies) y se resuspendieron las células en alícuotas en microtubos estériles de 1.5mL para congelar.

Etapa 2: Obtención del RNA

Se descongeló el TRIzol y se le agregaron 200  $\mu$ L de cloroformo, se agitó por 15 segundos e incubó 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente, fue centrifugado 15 minutos a 13,500 rpm a 4°C y se transfirió la fase acuosa a un tubo estéril de 1.5mL.

Etapa 3: Precipitación de RNA

Se adicionaron 500  $\mu$ L de isopropanol y se mezcló por inversión, posteriormente, se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugaron los tubos por 10 minutos a 13,500 rpm a 4°C, el isopropanol es decantado y se adicionaron 1mL de etanol al 75%, se agitó vigorosamente por 3 minutos y centrifugó 10 minutos a 12,000 rpm a 4°C, finalmente, se resuspendió el RNA en 25  $\mu$ L de agua MiliQ y

cuantificó utilizando el equipo NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific) a longitudes de onda de 260nm y 280nm.

### 5.6 Obtención de ADNc

Se preparó en un microtubo la mezcla de reacción:

|   |          |
|---|----------|
| Oligo(dT) <sub>12-18</sub> Primer (Invitrogen)                      | 1 µL     |
| dNTPs 10mM (Thermo Scientific, 00342481)                            | 1 µL     |
| RNA (previamente aislado)   | 1-1.5 µg |
| H <sub>2</sub> O (DNase and Rnase free Water, Sigma Aldrich, W4502) | 9 µL     |
| Volumen final   | 12 µL    |

El microtubo fue colocado en el termociclador Axygen® MaxyGene Thermal Cycler e inició el programa:

- 65°C por 5 minutos (durante los 5 minutos se preparó el tubo dos)
- Incubación a 4°C.

Un segundo microtubo fue preparado con la siguiente mezcla de reacción:

|   |      |
|---|------|
| Buffer 5X (Thermo Scientific, 003424459)        | 4 µL |
| DTT 0.1M (Thermo Scientific)                    | 2 µl |
| Thermo Scientific™ Inhibidor de ARNasa RiboLock | 1 µl |

Se mezclaron ambos microtubos y colocaron en el termociclador Axygen® MaxyGene Thermal Cycler y continuó con el programa que consiste en: 37°C por dos minutos, posteriormente, se agregó 1 µl de transcriptasa reversa (M – MLV, Invitrogen), se incubó a 37°C por 50 min, y finalmente, la enzima fue inactivada a 70°C por 5 min.

### 5.7 Extracción de ADN genómico a partir de sangre

El ADN genómico se aisló de muestras de sangre periférica humana, la extracción de ADN genómico se realizó utilizando el kit GenElute Blood Genomic DNA (NA2010, Sigma). En un microtubo de 1.5 mL se adicionaron 200 µL de sangre de cada muestra y posteriormente se añadieron 200 µL de solución de lisis (AL) y 13 µL de proteinasa K. La muestra se sometió a agitación de forma intensa durante 20 segundos y se incubó 10 minutos a 56°C. En el mismo tubo se agregaron 200 µL de alcohol grado molecular y se agitó de nueva cuenta. La muestra fue colocada en una microcolumna y se centrifugó a 8000 rpm por 3.5 minutos descartando el

volumen resultante. La microcolumna se colocó en un nuevo microtubo, se añadieron 500 µL de la solución de lavado (AW1) y se centrifugó nuevamente por 2 minutos a 8000 rpm. Sobre la misma microcolumna se adicionaron 500 µL de la segunda solución de lavado (AW2) para posteriormente centrifugar a 13,000 rpm durante 3 minutos. El resultado de la centrifugación fue decantado y se agregaron 200 µL de solución de elución (AE). Una vez añadidos estos 200 µL se dejó reposar por 2 minutos para después realizar una última centrifugación a 13,000 rpm por 2 minutos. Terminado este proceso se desechó la membrana para poder finalmente obtener producto final (ADN genómico).

### **5.8 Diseño de oligonucleótidos para amplificar el gen PMM2 a partir de ADN complementario.**

Para amplificar la región codificante del gen PMM2 a partir de ADN complementario (ADNc), se diseñaron cuatro oligonucleótidos que se probaron utilizando los programas primer-blast (NCBI) y OligoCalc, se determinó que cumplieran las siguientes características:

1. La diferencia de la temperatura de alineamiento ( $T_m$ ) entre ambos oligonucleótidos no debe ser mayor a 3°C
2. La secuencia de los oligonucleótidos debe ser precedida y finalizada por el nucleótido citosina (C) o guanina (G).
3. El porcentaje ideal de CG corresponde a un mínimo de 40 % y máximo de 60 %.

### **5.9 Amplificación por PCR.**

Para la amplificación por PCR del gen de interés se realizó una reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCR), haciendo una mezcla de reacción y utilizando la polimerasa Phusion-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, F-530S) para una mejor eficiencia y calidad de la PCR.

La mezcla de reacción se resume en la tabla 2.

**Tabla 2.** Reactivos utilizados en la estandarización de las condiciones óptimas de PCR.

|  | <b>1 reacción<br/>(<math>\mu\text{L}</math>)</b>  | <b>4.5 reacciones<br/>(<math>\mu\text{L}</math>)</b> |
|--|---|--|
| <b>5X Phusion GC Buffer (Thermo Scientific, F-519)</b>                   | 5   | 22.5   |
| <b>dNTPs (Thermo Scientific, 00342481)</b>                               | 0.5   | 2.25   |
| <b>Oligonucleótido sentido (10<math>\mu\text{M}</math>)</b>              | 0.5   | 2.25   |
| <b>Oligonucleótido anti sentido (10<math>\mu\text{M}</math>)</b>         | 0.5   | 2.25   |
| <b>Taq DNA Polymerase Recombinant (Thermo Scientific, #EP0404)</b>       | 0.25  | 1.125  |
| <b>H<sub>2</sub>O (DNase and RNase free Water, Sigma Aldrich, W4502)</b> | 17.25   | 77.625   |
|  | 24 $\mu\text{L}$ mezcla + 1 $\mu\text{L}$ de ADNc |  |

El programa de termociclado que se utilizó es el siguiente: desnaturalización 98°C, alineamiento T<sub>m</sub> (de cada Oligonucleótido) y elongación 72°C.

Para evaluar la amplificación se preparó un gel de agarosa 1.5% con amortiguador de carga 6X, para obtener una concentración final 1X. Las muestras fueron resueltas en buffer de corrida TAE 1X durante 40 minutos a 75 V a voltaje constante. Posteriormente se adquirieron imágenes del gel expuesto a luz ultravioleta en longitudes de 254 y 302 nm.

### **5.10 Secuenciación de Sanger, a partir de producto de PCR**

Los productos de PCR fueron purificados mediante el kit Gene JET (#K0502), y la muestra se preparó según las indicaciones del proceso de secuenciación (Sanger). El análisis de secuenciación es realizado por Snapgene, ClustalOmega.

### **5.11 Clonación en la cepa match one de *E. coli***

#### **5.11.1 Ligación**

Se preparó la siguiente reacción del inserto (gen de interés) previo a la ligación: 10 $\mu\text{L}$  de buffer de ligación 2X, 1 $\mu\text{L}$  de producto de PCR (del gen de interés), 6 $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas, 1 $\mu\text{L}$  de enzima Blunting para tener un volumen total de 18 $\mu\text{L}$ . Posteriormente, se centrifugó de 3 a 5 segundos, se incubó a 70°C durante 5

minutos, se adicionó 1  $\mu$ L del pJET1.2/blunt Cloning Vector (50 ng/ $\mu$ L) por reacción de clonación y 1  $\mu$ L de T4 ligasa, finalmente, se incubó a 22°C durante 30 minutos.

### **5.11.2 Transformación**

Para la transformación se adicionaron los 3  $\mu$ L de la reacción de ligación a 150  $\mu$ L de bacterias quimicompetentes, se incubó 30 minutos en hielo, el tubo fue incubado a 42° C durante 1 minuto, en seguida fue incubado en hielo durante 30 minutos, se le adicionaron 250  $\mu$ L de medio S.O.C suplementado (1 mL de medio S.O.C suplementado corresponde a 10  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub>, 10  $\mu$ L de MgSO<sub>4</sub>, 40  $\mu$ L de glucosa y 940  $\mu$ L de medio S.O.C), el tubo fue incubado a 37° C durante 1h a 200 r.p.m. Con esta mezcla de transformación, fueron plaqueadas dos cajas petri de medio LB sólido con ampicilina (100  $\mu$ g/mL) e incubadas de 12 a 16h a 37°C.

Una vez crecidas las colonias se tomaron con una punta de micropipeta y se sembraron en tubos de ensayo diferentes, cada uno con medio LB líquido suplementado con ampicilina (100  $\mu$ g/mL) y se incubaron nuevamente de 12 a 16 horas a 200 r.p.m. a una temperatura de 37°C.

### **5.11.3 Purificación de plásmido y selección de isoformas**

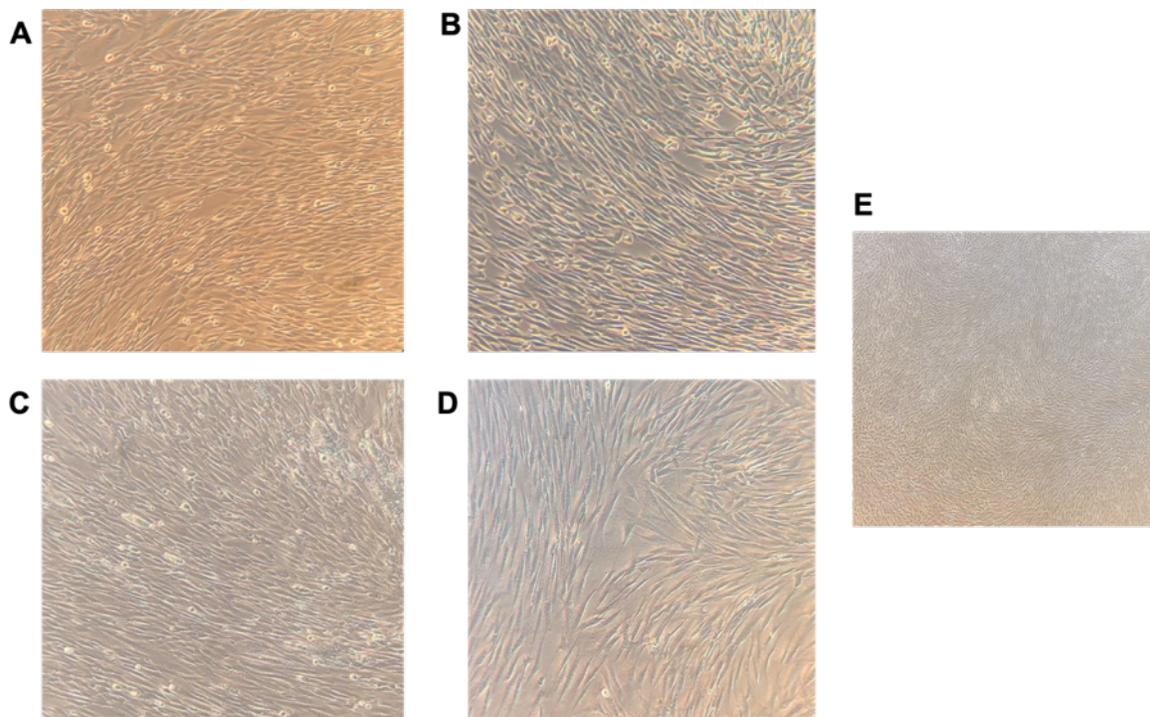
A partir de 3 ml de medio LB con la clona el proceso de purificación del plásmido inició centrifugando los 3 ml para concentrar el pellet de bacterias por 1 minuto a 9000 r.p.m. posteriormente, el sobrenadante fue eliminado totalmente, el pellet de bacterias fue resuspendido en 150  $\mu$ L de solución de lisis I (glucosa 50mM, EDTA 10mM y tris base 25mM) e incubado por 5 min a temperatura ambiente, se adicionaron 150  $\mu$ L de solución de lisis II recién preparada (100  $\mu$ L de NaOH 10N, 500  $\mu$ L de SDS 10% y 4400  $\mu$ L de agua miliQ), se mezcló por inversión e incubó por 5 min a temperatura ambiente, se agregaron 150  $\mu$ L de solución de lisis III (60 ml de CH<sub>3</sub>COOK 5M, 11.5 ml de CH<sub>3</sub>COOH y 28.5 ml de agua miliQ), el tubo fue mezclado por inversión y fue incubado nuevamente por 5 minutos, se volvió a centrifugar a 13,000 r.p.m por 5 minutos y se recuperó el sobrenadante completamente, posteriormente, se adicionó 1 ml de etanol absoluto y se centrifugó por 5 minutos a 13,000 r.p.m. el sobrenadante fue desechado y se lavó el pellet con 1 ml de etanol al 70% por inversión durante 30 segundos, el tubo se centrifugó nuevamente durante 5 minutos a 13,000 r.p.m. y se eliminó todo el etanol, finalmente, el pellet fue resuspendido con 30  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O miliQ que se preparó con 20  $\mu$ g/ $\mu$ L de RNAsa y fue incubado por 1 hora a 37 °C.

La PCR de los plásmidos recién purificados fue realizada con oligonucleótidos que permitieron la amplificación del inserto del gen de interés (la PCR se llevó a cabo como se describió en los apartados anteriores), el resultado fue revelado en gel de agarosa como fue descrito previamente, finalmente las muestras fueron preparadas para la secuenciación de Sanger.

## 6.0 Resultados y discusión

### 6.1 Cultivo celular

En los cuatro pacientes se obtuvo una biopsia de piel que fue cultivada en forma de explante hasta lograr un primer subcultivo de fibroblastos. La Figura 8 muestra el cultivo de la línea de fibroblastos de los 4 pacientes con un porcentaje de confluencia de 90 a 100%. En este punto del cultivo se realizó la obtención de material genético

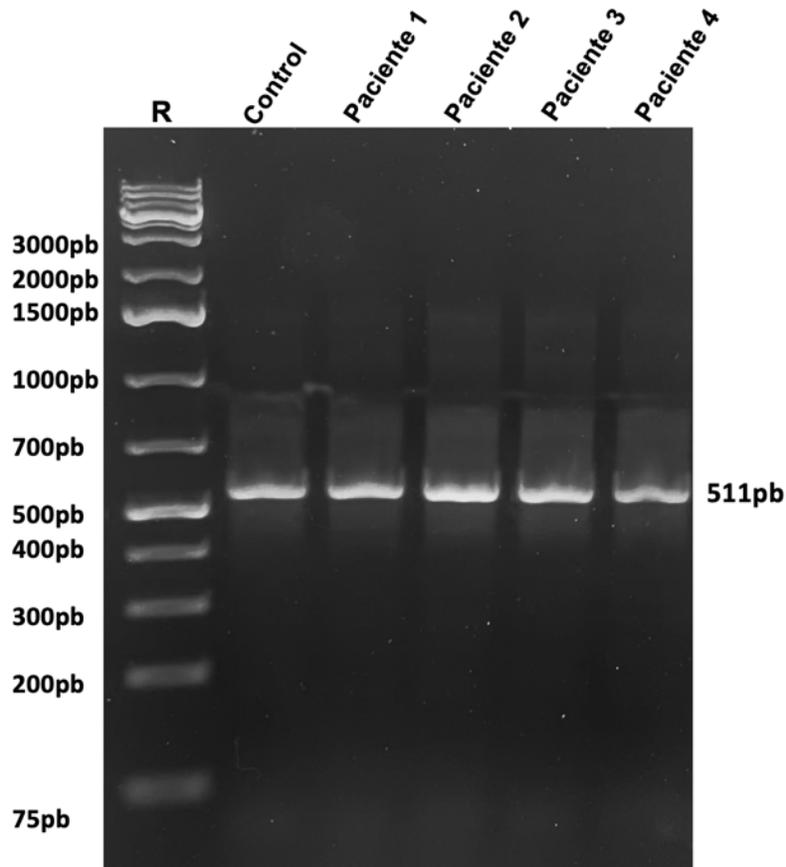


**Figura 8.** Cultivo celular de fibroblastos de los pacientes. A, control sano; B, paciente 1; C, paciente 2; D, paciente 3. E, paciente 4. Las fotografías de los incisos A, B, C y D fueron tomadas a 10X/0.25Ph1 y la fotografía del inciso E fue tomada a 4X/0.1Ph0

### 6.2 Amplificación de *PMM2*

De acuerdo al algoritmo diagnóstico en la Figura 6 se procedió a secuenciar *PMM2* como primer gen candidato en pacientes con CDG-Ix. Para ello se establecieron las condiciones que permiten amplificar este gen a partir de ADNc.

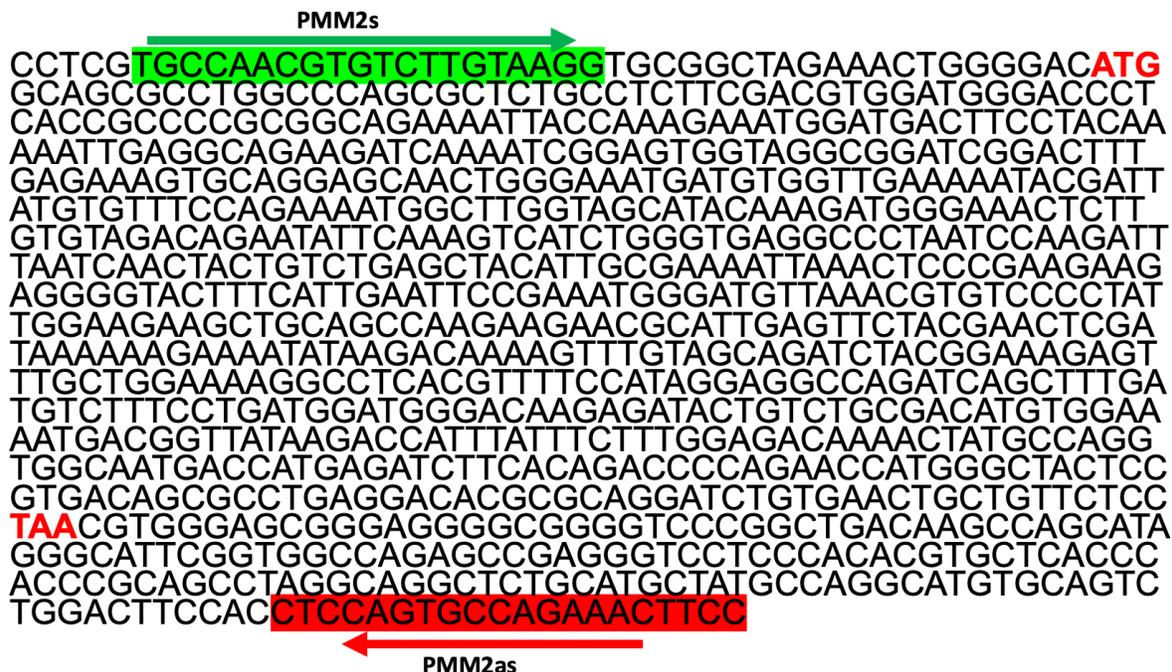
Una vez realizada la obtención de ADNc como se describe en los apartados 5.3 y 5.4. se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar el gen constitutivo de  $\beta$ -actina con la finalidad de comprobar la integridad del ADNc. El resultado de la amplificación con oligonucleótidos para  $\beta$ -actina utilizando ADNc de control sano y de los cuatro pacientes se muestra en la figura 9.



**Figura 9.** Visualización de las amplificaciones con oligonucleótidos del gen constitutivo  $\beta$ -actina a partir del ADNc de los pacientes estudiados. Control sano, carril 1; Paciente 1, carril 2; Paciente 2, carril 3; Paciente 4, carril 5.

Las amplificaciones con oligonucleótidos para el gen constitutivo  $\beta$ -actina reflejan una buena integridad del ADNc obtenido del control sano y de los pacientes. Una vez comprobada la integridad del ADNc, se realizó el diseño de los oligonucleótidos para amplificar la totalidad de la secuencia codificante de *PMM2* tomando en cuenta los puntos establecidos en la sección 5.8.

Los oligonucleótidos diseñados para amplificar *PMM2* a partir de ADNc fue realizado utilizando los programas Primer-Blast (NCBI) y OligoCalc, así como la región a la cual son complementarios se muestra en la figura 10.



**Figura 10.** Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de la secuencia codificante de *PMM2* a partir de ADNc; PMM2s es el oligonucleótido sentido y PMM2as es el oligonucleótido antisentido utilizado para la amplificación. Con letras de color rojo se marcan el codón de inicio (ATG) y codón de paro (TAA).

En la tabla 3 se muestran las propiedades de los oligonucleótidos diseñados y su secuencia.

**Tabla 3.** Oligonucleótidos diseñados para la amplificación completa del gen *PMM2* en ADNc.

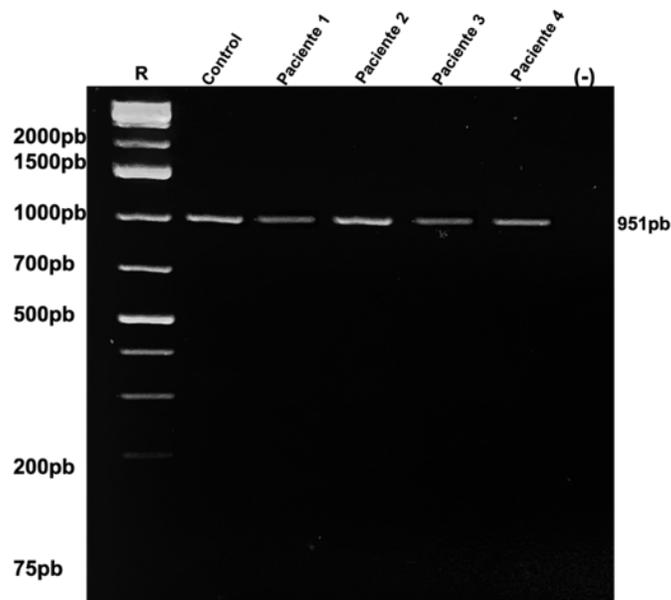
| Nombre        | Secuencia (5' – 3')               | TM (°C)   | GC%       | Longitud  |
|---------------|-----------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| <b>PMM2s</b>  | <b>TGC CAA CGT GTC TTG TAA GG</b> | <b>63</b> | <b>50</b> | <b>20</b> |
| <b>PMM2as</b> | <b>GGA AGT TTC TGG CAC TGG AG</b> | <b>63</b> | <b>55</b> | <b>20</b> |

Se llevó a cabo la amplificación con este par de oligonucleótidos con las condiciones de termociclaje que se muestran en la figura 11.

| 35 CICLOS        |                   |      |              |            |       |    |
|------------------|-------------------|------|--------------|------------|-------|----|
|                  | Desnaturalización |      | Alineamiento | Elongación |       |    |
| Temperatura (°C) | 94                | 94   | 63           | 72         | 72    | 22 |
| Tiempo (min)     | 5:00              | 1:00 | 1:00         | 1:00       | 10:00 | ∞  |

**Figura 11.** Condiciones de termociclaje ocupadas para la amplificación de todo el gen PMM2 en ADNc utilizando el oligonucleótido PMM2s y el oligonucleótido PMM2as.

El resultado de la amplificación como se describe en el punto 5.6 con los oligonucleótidos PMM2s/PMM2as con las condiciones de termociclaje previamente descritas se muestra en la figura 12.



**Figura 12.** Visualización de la amplificación por PCR en gel de agarosa de todo el gen PMM2. Carril 1, control sano; carril 2, paciente 1; Carril 3, paciente 2; carril 4 paciente 3; carril 5, paciente 4; carril 6, control negativo.

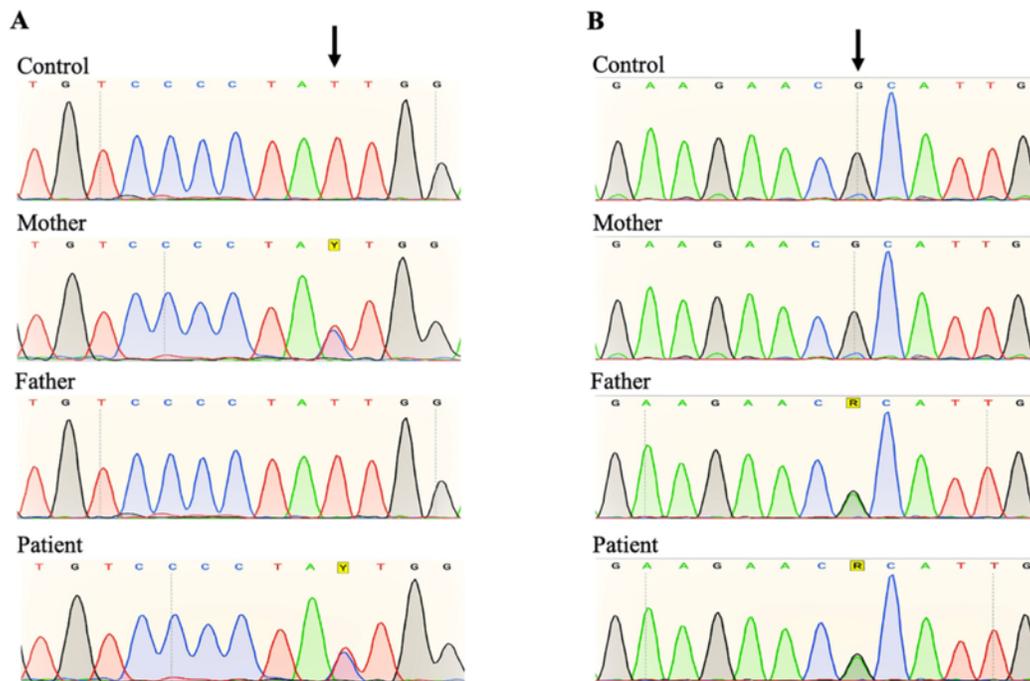
La amplificación mostrada en los 4 pacientes corresponde al peso esperado para la amplificación con los oligonucleótidos PMM2s y PMM2as (951pb). El siguiente paso fue realizar la purificación de banda de cada producto de amplificación para cada paciente y realizar la secuenciación de Sanger utilizando los oligonucleótidos PMM2s y PMM2as.

### 6.3 Diagnóstico genético

#### 6.3.1 Diagnóstico genético del paciente 1

La sintomatología del primer paciente se muestra en la tabla 1.

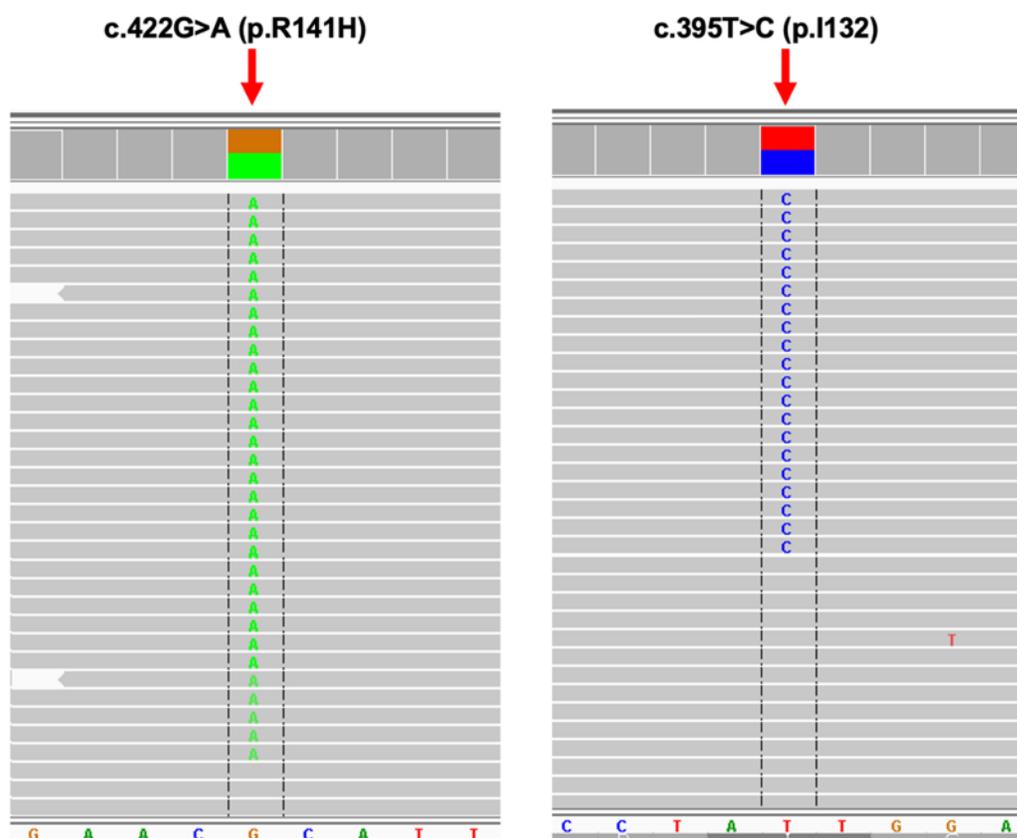
Los resultados de la secuenciación de Sanger en el paciente 1 mostraron la presencia de la mutación puntual c.422G>A (p.R141H) y de una segunda mutación puntual c.395T>C (p.I132T) en PMM2 como se muestra en la figura 13.



**Figura 13.** Cromatogramas resultados de la secuenciación de Sanger realizada en el material genético del paciente y de sus padres. A, alineamiento de cromatogramas que demuestra la herencia materna de la mutación c.395T>C (p.I132T). B, alineamiento de cromatogramas que demuestra la herencia paterna de la mutación c.422G>A (p.R141H). Imagen tomada de: González-Domínguez, C A et al. "Identification through exome sequencing of the first PMM2-CDG individual of Mexican mestizo origin." *Molecular genetics and metabolism reports* vol. 25 100637. 18 Aug. 2020, doi: 10.1016/j.ymgmr.2020.100637

Reportes previos ya han demostrado que la heterocigocidad compuesta p.R141H / p.I132T disminuye la actividad enzimática de la proteína hasta un 20% [51].

Esta información obtenida de la secuenciación de Sanger que confirma la presencia de variantes patogénicas en PMM2, confirma el diagnóstico de PMM2-CDG en el paciente. En paralelo a este diagnóstico se estableció una colaboración para realizar la secuenciación exómica en el Laboratorio de Diagnóstico Genómico del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) que secundaron estos resultados como se observa en la figura 14.



**Figura 14.** Resultados de la secuenciación exómica del paciente 1.

### 6.3.1.1 Variante patogénica c.422G>A (p.R141H)

La variante patogénica c.422G>A (p.R141H) localizada en el exón 5 de *PMM2*, está reportada como la más común en pacientes con *PMM2*-CDG y fue descrita por primera vez por Matthijs et al. (1997) [34]. Todos los reportes existentes de pacientes con *PMM2*-CDG, reportan que la variante R141H se encuentra en forma de heterocigosidad compuesta ya que nunca se ha encontrado en forma homocigota, esto se debe a que cuando se expresa *in vitro*, la actividad enzimática de la proteína *PMM2* con la variante R141H es prácticamente nula y, por lo tanto, concuerda con la inferencia de que la homocigosidad para esta variante es letal. Se ha descrito que la afinidad de la proteína por el sustrato normal se ve disminuida notablemente por el hecho de que el aminoácido 141 forma parte del sitio catalítico enzimático, dando como resultado una proteína significativamente menos estable y con menor vida media en comparación con un control sano [52, 53].

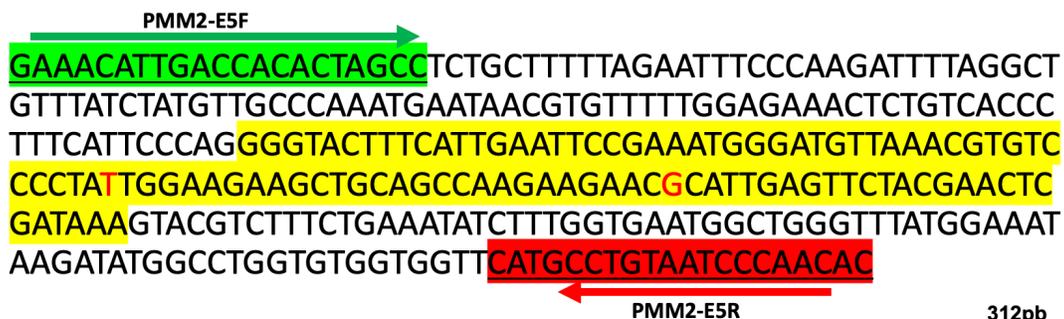
### 6.3.1.2. Variante patogénica c.395T>C (p.I132T)

La variante c.395 T>C (p.I132T) tiene como consecuencia el cambio de la isoleucina por una treonina en el aminoácido 132 de la proteína *PMM2*. El residuo de isoleucina está altamente conservado y existe una diferencia fisicoquímica moderada entre isoleucina y treonina, esta variante siempre ha sido reportada como heterocigota

compuesta en pacientes con PMM2-CDG. En pacientes con las variantes R141H/I132T, ha sido reportado que la actividad enzimática residual baja a un 23-41%. Por estos motivos, esta variante se ha clasificado como patógena [34, 48, 49, 50, 51].

### 6.3.1.3 Herencia

Para determinar la herencia de ambas mutaciones, se realizó un diseño de oligonucleótidos para amplificar la región del exón 5 de *PMM2* a partir de ADNg de ambos padres, el cual fue obtenido a partir de muestras de sangre como se detalla en la sección 5.7. Los oligonucleótidos para amplificar el exón 5 de *PMM2* a partir de ADNg, fueron diseñados utilizando los programas Primer-Blast (NCBI) y OligoCalc. La región a la cual son complementarios se muestra en la figura 15.



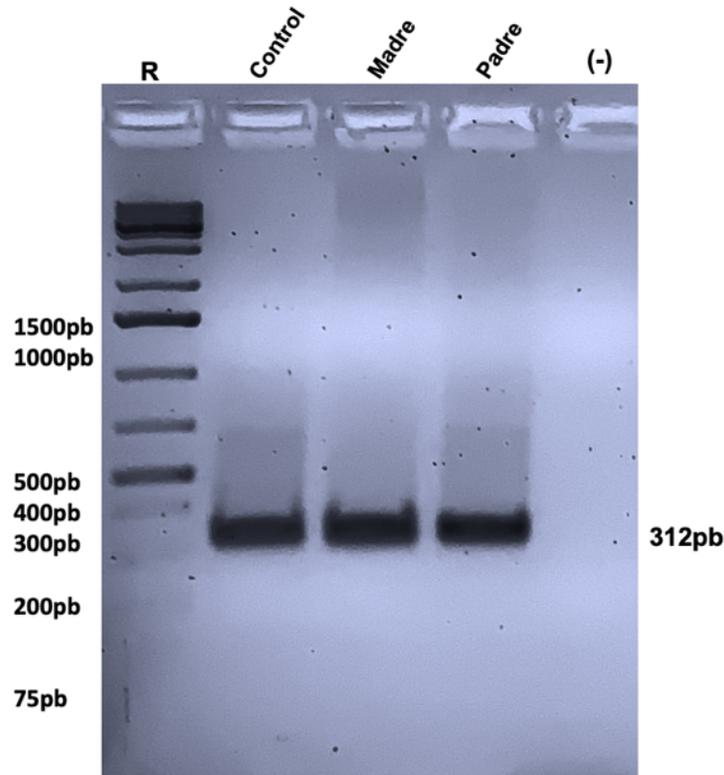
**Figura 15.** Diseño de oligonucleótidos para la secuenciación de Sanger del exón 5 de *PMM2*. PMM2-E5F es complementario para la región en color verde, PMM2-E5R es complementario para región en color rojo, de color amarillo está marcada la secuencia correspondiente al exón 5, la letra T en rojo representa la posición de la mutación c.395T>C (I132T), la letra G en rojo representa la posición de la mutación c.422G>A (R141H). Como resultado de una correcta amplificación se espera una sola banda de 312pb de longitud.

En la tabla 4 se muestran las características de los oligonucleótidos diseñados y su secuencia.

**Tabla 4.** Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del exón 5 del gen *PMM2*.

| Nombre   | Secuencia (5' – 3')         | TM (°C) | GC% | Longitud |
|----------|-----------------------------|---------|-----|----------|
| PMM2-E5F | GAA ACA TTG ACC ACA CTA GCC | 61.5    | 50  | 21       |
| PMM2-E5R | GTG TTG GGA TTA CAG GCA TG  | 63.3    | 50  | 20       |

El resultado de la amplificación con los oligonucleótidos PMM2-E5F/PMM2a-E5R con las condiciones de termociclaje descritas en la figura 11, se muestra en la figura 16.



**Figura 16.** Visualización de la amplificación por PCR en gel de agarosa del exón 5 del gen PMM2. En el carril 1 se observa la amplificación con ADNc de control sano, en el carril 2 la amplificación utilizando el ADNc de la madre, en el carril 3 la amplificación del ADNc del padre y en el carril 4 la amplificación correspondiente a un control negativo.

Los cromatogramas resultados de la secuenciación de Sanger mostrando la herencia de sus padres se muestran también en la figura 13.

Los resultados de la secuenciación de Sanger con los oligonucleótidos diseñados para amplificar el exón 5 de *PMM2* permitieron identificar que la mutación c.395T>C (p.I132T) fue heredada al paciente por su madre, mientras que la mutación c.422G>A (p.R141H) fue heredada al paciente por su padre. El hallazgo de estas mutaciones y su tipo de herencia explican los padecimientos del paciente así como el perfil de hipoglicosilación que este muestra en el IEF de transferrina sérica. Es importante mencionar que, gracias a la metodología establecida y a los descubrimientos basados en ella, fue posible reportar a este paciente como el primer individuo diagnosticado con PMM2-CDG en México [41].

#### **6.4.2 Diagnóstico genético del paciente 2**

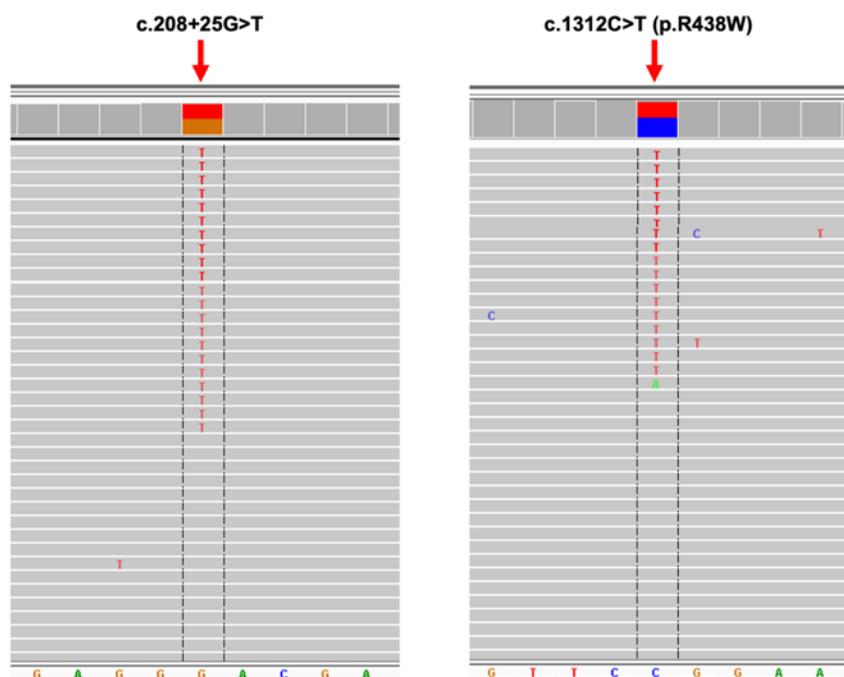
La sintomatología del paciente dos se muestra en la tabla 1.

La secuenciación de Sanger de *PMM2* del paciente 2 no identificó la presencia de ninguna mutación en este gen (véase anexo 10.5), descartando que sea un caso de *PMM2*-CDG. Desafortunadamente, la cantidad de material genético proporcionado de este paciente no fue suficiente para realizar una secuenciación exómica que identifique el gen causal.

### 6.4.3 Diagnóstico genético del paciente 3

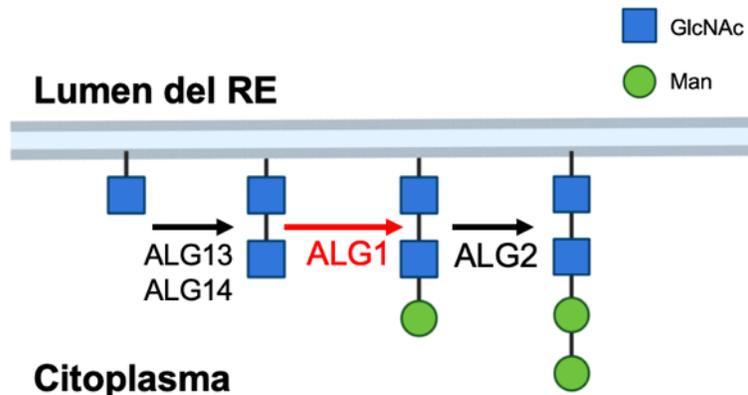
La sintomatología del paciente tres se muestra en la tabla 1.

Los resultados de la secuenciación de Sanger de la secuencia codificante de *PMM2* en el paciente 3 no identificaron mutaciones causales de CDG (véase anexo 10.6). Por esta razón, se procedió a un análisis de secuenciación exómic en el Laboratorio de Diagnóstico Genómico del INMEGEN que permitió identificar las variantes c.208+25G>T y c.1312C>T (p.R438W) en *ALG1* (figura 17). Esto coincide con que cuadro clínico muestra un fenotipo con algunas características similares a un *ALG1*-CDG como retraso psicomotor, retraso del desarrollo, atrofia muscular, ceguera cortical, dismorfias faciales, microcefalia, estrabismo y nistagmus [42, 43].



**Figura 17.** Resultados de la secuenciación exómic del paciente 3.

*ALG1* codifica para una proteína conocida como quitobiosildifosfodolicol manosil transferasa, la cual es encargada de la primera manosilación en el proceso de síntesis del *N*-glicano en el RE, la acción de *ALG1* se muestra en la figura 18. Las variantes patogénicas de *ALG1* causan *ALG1*-CDG

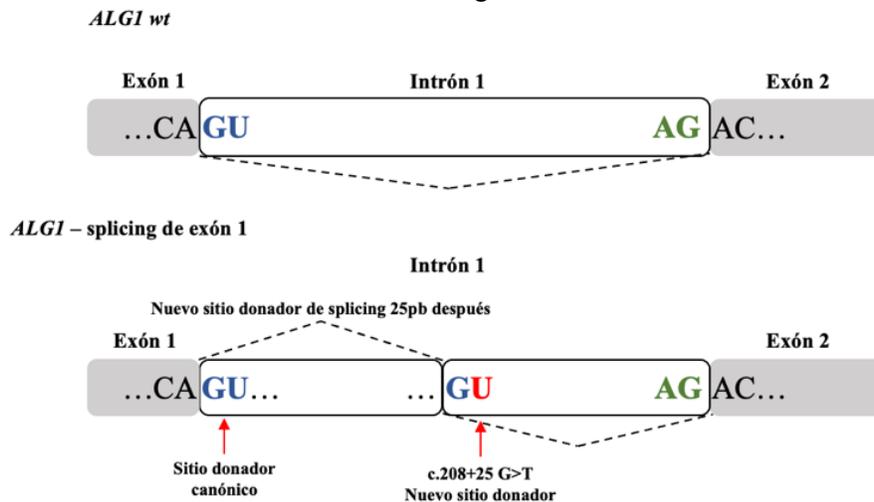


**Figura 18.** Rol de *ALG1* en la N-glicosilación.

#### 6.4.3.1 Variante c.208+25G>T

Los resultados de la secuenciación exómica demostraron la presencia de la variante c.208+25G>T, la cual no había sido reportada previamente y por lo tanto se desconocía su consecuencia molecular sobre la disfunción de la proteína *ALG1*, sin embargo, esta variante se consideró potencialmente patógena porque podría inducir un nuevo sitio de empalme donador (GG a GU) y causar un empalme alternativo no funcional. Utilizando la predicción del buscador de sitios de empalmes en humanos (HSFPro, Genomnis), se encontró que este cambio altera significativamente el empalme con los siguientes valores [WT-Mut% variation] [HSF donator site (matrix GT) 61,35>88,49 (44,24%) y MaxEnt donator site 1.01> -8.65 (756.44%)].

La representación del empalme causado por la variante c.208+25G>T así como su consecuencia molecular se muestra en la figura 19.



**Figura 19.** Mutación c.208+25G>T y su posible consecuencia molecular en el empalme del exón 1.

#### **6.4.3.2 Variante patogénica c.1312 C>T (p.R438W)**

La segunda variante de ALG1 encontrada en la secuenciación exómica c.1312C>T (p.R438W) se ubica en el exón 13. Esta mutación genera un cambio de sentido al reemplazar el aminoácido hidrofílico Arginina por el aminoácido hidrofóbico Triptófano, por lo que este cambio de aminoácido tiene una consecuencia fisicoquímica importante. Los estudios de complementación genética en levadura ya han demostrado previamente la patogenicidad de esta mutación [43]. Esta mutación solamente ha sido reportada de forma heterocigota compuesta en 4 pacientes provenientes de Estados Unidos y Alemania [42, 43].

#### **6.4.3.3 Identificación de splicing alternativo causado por la variante c.298+25G>T**

La presencia de la variante c.208+25 G>T en el gen ALG1 y la formación de un nuevo sitio donador de empalme sugieren que existen efectos deletéreos originados por un empalme alternativo, por ello y como en el caso del paciente 1, el diseño de los oligonucleótidos para amplificar toda la región codificante de *ALG1* en ADNc, es un paso importante para el diagnóstico de ALG1-CDG debido a que todos los pacientes reportados hasta la fecha han sido analizados mediante el diseño de oligonucleótidos para amplificar cada exón en ADNg, sin mencionar que esta estrategia también nos permitirá visualizar el defecto en el proceso de empalme causado por esta variante.

Los oligonucleótidos para amplificar *ALG1* en ADNc fueron diseñados bajo los parámetros descritos en la sección 5.8 y utilizando los programas Primer-Blast (NCBI) y OligoCalc.

Los oligonucleótidos diseñados para *ALG1*, así como la región a la cual son complementarios se muestra en la figura 20.

**ALG1s**

**TGACTGCTGCGGGCCAG** CCAAG**ATG** GCGGCCTCATGCTTGGTCTGCTGGCGCTGTGTCTGCTGCTGCCGC  
 TGCTGCTGCTGGGAGGATGGAAGCGCTGGCGCCGGGGCGGGCGCCCGCATGTAGTAGCGGTGGTGC  
 TGGGCGACGTGGGCCGACCCCCGTATGCAGTACCACGCGCTGTCGTTGGCCATGCACGGCTTCTCGGTG  
 ACCCTCCTGGGGTTCTGCAACTCAAACCCCATGATGAGCTCTTGCAACAACAGAATTCAGATTGTGGGG  
 TTGACAGAACTTCAGAGTCTTGCACTTGGGCCCGAGTTTCCAGTACGGAGTCAAAGTTGACTTCAGGCT  
 ATGTAATTGCTGTGGAAGTTGATGTGGAGGGAGCCAGGTGCCTATATCTTTCTCCAGAACCCCGAGTCTG  
 CCTAGCATTGCTGTCTGCTGGTTCGTGGGCTGCCTTTGTGGAAGCAAGCTCGTCATTGACTGGCACAACTAT  
 GGCTACTCCATCATGGGTCTGGTGCATGGCCCAACCATCCCCTCGTTCTGCTGGCCAAGTGGTACGAGAAG  
 TTCTTTGGGCGCTGTCCCACCTGAACCTGTGTGTTACCAATGCTATGCGAGAAGACCTGGCGGATAACTGG  
 CACATCAGGGCTGTGACCGTCTACGACAAGCCGCATCTTTCTTAAAGAGACACCTCTGGACCTGCAGCAC  
 CGGCTCTTCATGAAGCTGGGCAGCATGCACTCTCCGTTCAAGGGCCCGCTCAGAACCTGAGGACCCAGTCAC  
 GGAGCGGTTCGGCCTTACCGAGCGGGATGCTGGGAGCGGGCTGGTGACGCGTCTCCGTGAGCGGCCAGC  
 CCTGCTGGTCAAGCAGCAGCTGGACAGAGGACGAAGACTTCTCCATCCTGCTGGCAGCTTTAGAAAAGT  
 TTGAACAACCTGACTCTTGATGGACACAACCTTCTTCTCGTCTGTGTGATAACAGGCAAAGGGCCTCTGA  
 GGGAGTATTATAGCCGCCTCATCCACCAGAAGCACTTCCAGCACATCCAGGTCTGCACCCCTGGCTGGAGG  
 CCGAGGACTACCCCTGCTTCTAGGGTTCGGCGGACCTGGGTGCTGTCTGCACACGCTCCTCAGTGGCCTG  
 GACCTGCCCATGAAGGTGGTGGACATGTTCCGGGTGCTGTTTGCCTGTGTGTGCTGTGAACTTCAAGTGTTA  
 CATGAGCTGGTGAACATGAAGAAAATGGCCTGGTCTTTGAGGACTCAGAGGAACTGGCAGCTCAGCTGC  
 AGATGCTTTTCTCAAACCTTCTGATCCTGCGGGCAAGCTAAACAGTTCGGAAGAACCTGCGGGAGTCG  
 CAGCAGCTCCGATGGGATGAGAGCTGGGTGCAGACTGTGCTCCCTTTGGTTATGGACACATA**ACTCCTGGG**  
 CCAGAGGCTAAAACCCAGGACCCCTGCTGTCTTCCCGCAGCTTCTTGGAGTCTCAGGGCAAACCTT  
**TGAGCAGCACCTCCAGTG**      **1517pb**

**ALG1-R2**

**Figura 20.** Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de *ALG1* y la secuenciación de Sanger; ALG1s es complementario para la región en color verde, ALG1-R2 es complementario para la región en color rojo. Las letras de color rojo indican el codón de inicio (ATG) y codón de paro (TAA). Como resultado de una correcta amplificación entre los oligonucleótidos ALG1s y ALG1-R2 se espera una sola banda de 1517pb.

En la tabla 5 se muestran las propiedades de los oligonucleótidos diseñados y su secuencia.

**Tabla 5.** Características de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen ALG1.

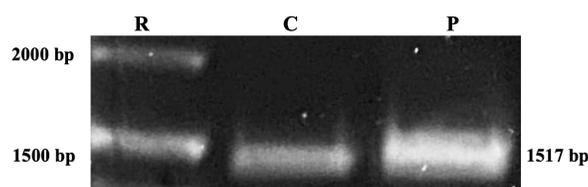
| Nombre         | Secuencia (5' – 3')              | TM (°C)   | GC%       | Longitud  |
|----------------|----------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| <b>ALG1s</b>   | <b>TGA CTG CTG CGG GCC AG</b>    | <b>68</b> | <b>71</b> | <b>17</b> |
| <b>ALG1-R2</b> | <b>CAC TGG GAG GTG CTG CTC G</b> | <b>70</b> | <b>68</b> | <b>19</b> |

En la tabla 6 se muestran las condiciones de termociclaje ocupadas para la amplificación por PCR del gen ALG1 con el segundo diseño de oligonucleótidos

**Tabla 6.** Condiciones de termociclaje ocupadas para la amplificación de todo el gen ALG1 en ADNc utilizando los oligonucleótidos ALG1s/ALG1-R2.

| 35 CICLOS        |                   |       |              |            |       |   |
|------------------|-------------------|-------|--------------|------------|-------|---|
|                  | Desnaturalización |       | Alineamiento | Elongación |       |   |
| Temperatura (°C) | 94                | 94    | 62           | 72         | 72    | 4 |
| Tiempo (min)     | 00:30             | 00:10 | 00:00        | 5:00       | 10:00 | ∞ |

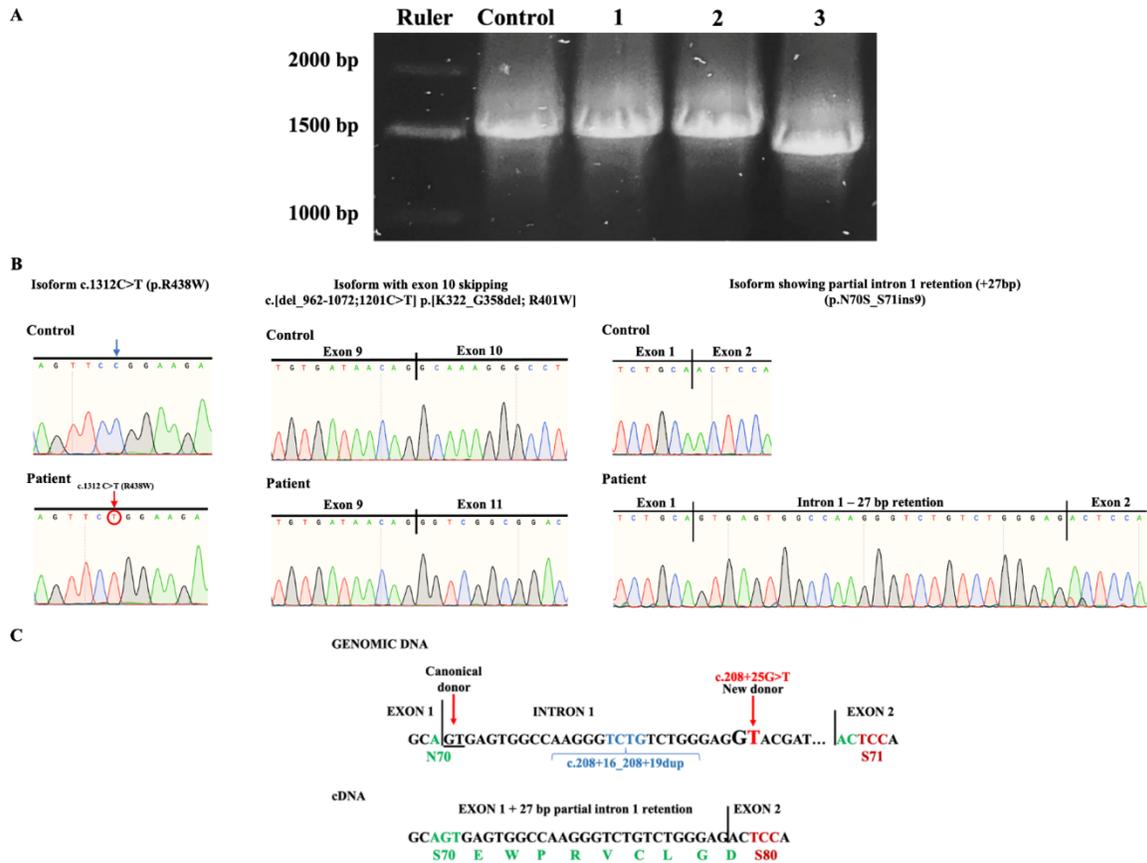
El resultado de la amplificación por PCR del gen ALG1 con las condiciones previamente descritas se muestra en la figura 21.



**Figura 21.** Visualización de la amplificación por PCR en gel de agarosa del gen ALG1. En el carril 1 se observa la amplificación con ADNc de un control sano, en el carril 2 la amplificación utilizando el ADNc del paciente 3.

Una vez que se amplificó todo el gen en ADNc se observó que la banda de amplificación correspondiente al paciente es notablemente más gruesa a la perteneciente al control sano, asumiendo que esto puede indicar la presencia de isoformas con diferente peso a la isoforma control, se realizó la purificación de banda como se indica en el punto 5.10 de la metodología para la identificación de todas las isoformas presentes mediante subclonación como se indica en el punto 5.11 de la metodología. Una vez subclonadas las isoformas se llevó a cabo la PCR de cada una de ellas, purificación de banda y preparación de las muestras para la secuenciación de Sanger como se describe previamente.

Los resultados de este análisis se muestran en la figura 22.



**Figura 22.** A. Isoformas encontradas después de la subclonación por PCR del amplicón ALG1 del paciente. R, ruler; C, control sano; 1, isoforma con que únicamente tiene la variante c.1312C> T (p.R438W); 2, una isoforma con empalme alternativo que involucra la retención parcial del intrón 1 (+27pb); 3, isoforma con empalme alternativo que involucra la delección del exón 10 y la presencia de la variante c.1312C> T c. [del\_962-1072; 1201C>T] p. [K322\_G358del; R401W]. B. Cromatogramas resultantes de la secuenciación de Sanger de las isoformas del paciente que muestran la variante c.1312C> T (p.R438W); delección del exón 10 c.[del\_962-1072; 1201C> T] p.[K322\_G358del; R401W], así como la retención parcial del intrón 1 (+27 pb) (p.N70S\_S71ins9). C. Mecanismo de empalme que induce la retención parcial del intrón 1 de +27 pb causada por el alelo complejo c.[208+16\_208+19dup; 208 + 25G>T]. El nuevo sitio donador (GG a GT, en rojo) provoca una retención parcial del intrón 1 (+27 pb) que, cuando se traduce, da como resultado la sustitución de aminoácidos N70S y la inserción de 9 aminoácidos.

Con estos resultados, se confirmó la presencia de tres variantes de ALG1 en el paciente forma de dos alelos complejos: un alelo complejo formado por una variante benigna NM\_019109.4 (ALG1): c.208+16\_208+19dup en *cis* con la variante patógena conocida NM\_019109.5 (ALG1): c.1312C>T(p.R438W) definida en su conjunto como NM\_019109.5 (ALG1): c. [208+16\_208+19dup; 1312C>T] y un segundo alelo complejo compuesto por la misma variante benigna NM\_019109.4 (ALG1): c.208+16\_208+19dup en *cis* con una variante c.208+25G>T no descrita

anteriormente y que se definió como NM\_019109.5 (ALG1): c.[208+16\_208+19dup; 208+25G>T].

#### **6.4.3.4 Alelo complejo c.[208+16\_208+19dup; 1312C>T]**

Las isoformas derivadas del alelo complejo c.[208+16\_208 + 19dup; 1312C>T] fueron identificadas como una con empalme constitutivo (p.R438W) y otra con empalme alternativo inesperado por la pérdida del exón 10, que a nivel de la proteína causa la pérdida de 37 aminoácidos y codifica para una proteína de 427 aminoácidos p.[K322\_G358del; R401W].

Debido a que no se encontraron mutaciones en las uniones intrón/exón del exón 10, se infiere que la mutación c.1312C>T ubicada en el exón 13 podría ser responsable de alterar el proceso de empalme distante, aunque se requieren más análisis para llegar a una conclusión sobre la causa definitiva de la deleción del exón 10. Por otro lado, la mutación c.1312C>T presente en este alelo se ha reportado en seis pacientes como heterocigotos compuestos con las siguientes variantes (c.866A> G, c.450C> A, c.1145T> C, c.1236A> G) y se ha demostrado que tiene una actividad enzimática de ALG1 reducida. [42, 43, 62, 63]. No se observaron efectos deletéreos en los transcritos de este alelo complejo debidos a la variante intrónica benigna.

#### **6.4.3.5 Alelo complejo c.[208+16\_208+19dup; 208+25G>T]**

Por sí sola, la variante c.208+16\_208+19dup se considera una variante benigna, sin embargo, la presencia adicional de la variante c.208+25G>T da como resultado el alelo complejo patogénico c.[208+16\_208+19dup; 208+25G>T]. En este alelo, la mutación c.208+25G>T se encuentra a +29 pb del sitio de empalme del sitio donador canónico en el exón 1 debido a la duplicación de cuatro bases (TCTG) causada por la variante benigna c.208+16\_208+19dup (figura 22C). Esta isoforma causa retención parcial del intrón 1 (+27 pb), sin embargo, la retención parcial del intrón 1 no provoca un cambio del marco de lectura, pero da como resultado la sustitución de aminoácidos (N70S) y la inserción de 9 aminoácidos (EWPRVCLGD) (p.N70S\_S71ins9) (Figura 22C). Es importante tener en cuenta que la duplicación de las bases TCTG que se encuentra en la variante c.208+16\_208+19dup, desplaza la posición c.208+25G>T a +29 pb desde el sitio de empalme del donador canónico en el exón 1 y que determina la longitud de la retención parcial del intrón y la preservación del marco de lectura (figura 22C). No obstante, consideramos que la consecuencia funcional reducida de la variante resultante (p.N70S\_S71ins9) se debe a las propiedades fisicoquímicas diferentes de los aminoácidos en la posición 70 (ácido (N) a hidroxílico (S)), además de la inserción de nueve aminoácidos. Según la base de datos gnomAD, la variante c.208+16\_208+19dup es muy frecuente en todos los grupos étnicos (gnomAD ExomesVersion: 2.1.1 frecuencia global  $f = 0.558$ ), a julio de 2021).

Notablemente, en ausencia de la variante c.208+16\_208+19dup, la mutación c.208+25G>T causaría un cambio al marco de lectura que conduciría a la formación de un codón de paro prematuro en el exón 2 que probablemente sería patógeno y más grave.

#### 6.4.3.6 Herencia

Para determinar la herencia de los alelos complejos y sus variantes, se analizó el ADNg de los padres por PCR mediante el diseño de oligonucleótidos específicos para las regiones correspondientes a cada variante, el diseño de estos oligonucleótidos fue llevado a cabo bajo los lineamientos descritos anteriormente. Para la variante c.208+25G>T se utilizó nuevamente el oligonucleótido ALG1s en conjunto con el oligonucleótido antisentido ALG1gas, la secuencia a la que son complementarios ambos oligonucleótidos se muestra en la figura 23. Para la variante c.1312C>T se utilizó el oligonucleótido sentido ALG1-E13s y el oligonucleótido antisentido ALG1-E13as, la secuencia a la que son complementarios se muestra en la figura 24.



**Figura 23.** Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de *ALG1* en ADNg para la variante c.208+25G>T. ALG1s es complementario para la región en color verde, ALG1gas es complementario para la región en color rojo. El texto subrayado en amarillo corresponde a la secuencia perteneciente al exón 1. La letra G de color rojo representa la posición c.208+25G. Como resultado de una correcta amplificación entre ambos oligonucleótidos se espera una sola banda de 326pb.



**Figura 24.** Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de *ALG1* en ADNg para la variante c.1312C>T. ALG1-E13s es complementario para la región en color verde, ALG1-E13as es complementario para la región en color rojo. El texto subrayado en amarillo corresponde a la secuencia perteneciente al exón 13. La letra C de color rojo representa la posición c.208+25G. Como resultado de una correcta amplificación entre ambos

oligonucleótidos se espera una sola banda de 318pb.

Las características de cada oligonucleótido diseñado se muestran en la tabla 7.

**Tabla 7.** Características de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen ALG1 en ADNg.

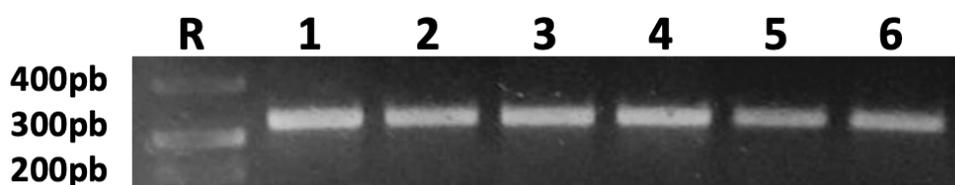
| Nombre            | Secuencia (5' – 3')                   | TM (°C)   | GC%       | Longitud  |
|-------------------|---------------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| <b>ALG1gas</b>    | <b>CTA AAG GAG CAC TTC CGC C</b>      | <b>60</b> | <b>58</b> | <b>19</b> |
| <b>ALG1-E13s</b>  | <b>CAG GCA ATG AGG TAA GCT CTG</b>    | <b>61</b> | <b>52</b> | <b>21</b> |
| <b>ALG1-E13as</b> | <b>CAA TTC TTT TAC CAG GCA GTA CC</b> | <b>61</b> | <b>43</b> | <b>23</b> |

Las condiciones de termociclado ocupadas para la PCR con ambos pares de oligonucleótidos se muestran en la tabla 8.

**Tabla 8.** Condiciones de termociclado ocupadas para la amplificación del gen ALG1 en ADNg.

|                         | <b>25 CICLOS</b>         |       |                     |                   |       |    |
|-------------------------|--------------------------|-------|---------------------|-------------------|-------|----|
|                         | <b>Desnaturalización</b> |       | <b>Alineamiento</b> | <b>Elongación</b> |       |    |
| <b>Temperatura (°C)</b> | 94                       | 94    | 70                  | 72                | 72    | 22 |
| <b>Tiempo (min)</b>     | 00:30                    | 00:10 | 00:30               | 5:00              | 10:00 | ∞  |

La visualización de el resultado de la amplificación de ALG1 en ADNg por PCR con el par de oligonucleótidos ALG1s/ALG1gas y el par ALG1-E13s/ALG1-E13as se muestra en la figura 25.



**Figura 25.** Visualización de la amplificación por PCR en gel de agarosa del gen ALG1 en ADNg. 1, amplificación con ADNg de un control sano con el par ALG1s/ALG1gas. 2, amplificación con ADNg de un control sano con el par ALG1-E13s/ALG1-E13as. 3, amplificación con ADNg de la madre con el par ALG1s/ALG1gas. 4, amplificación con ADNg

de la madre con el par ALG1-E13s/ALG1-E13as. 5, amplificación con ADNg del padre con el par ALG1s/ALG1gas. 6, amplificación con ADNg del padre con el par ALG1-E13s/ALG1-E13as.

Posterior a la amplificación por PCR, se realizó la preparación de las muestras para la secuenciación de Sanger que permitió la identificación de la herencia de cada variante, los resultados de la secuenciación se muestran en la figura 26.



**Figura 26.** Cromatogramas de la secuenciación de ADNg de un control sano, madre, padre y paciente que muestran la herencia de las variantes de ALG1 c.208+16\_208+19dup, c.208+25G>T y c.1312C>T.

La secuenciación del ADNg de los padres demostró que el alelo complejo c.[208+16\_208+19dup; 1312C>T] fue heredado por la madre mientras que el alelo complejo c.[208+16\_208+19dup; 208+25G>T] por el padre.

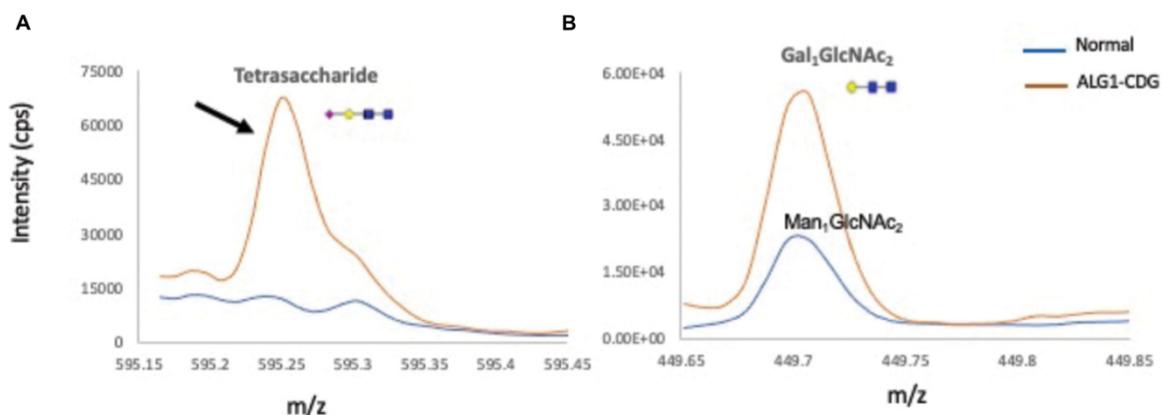
Un hecho interesante es que la secuenciación del ADNg de *ALG1* correspondiente a la madre muestra traslapes que son el resultado de la heterocigosidad para la variante benigna c.208+16\_208+19dup, por el contrario, la secuenciación del ADNg del padre no muestra ningún tipo de traslape, lo que indica que es homocigoto para la variante c.208+16\_208+19dup.

El hallazgo de estas tres variantes en forma de dos alelos complejos (c.[208+16\_208+19dup; 1312C>T] y c.[208+16\_208+19dup; 208+25G>T]) en el paciente, así como la consecuencia molecular de cada una de ellas confirman el diagnóstico de ALG1-CDG del paciente 3.

#### 6.4.3.7 Marcador tetrasacárido para el diagnóstico de ALG1-CDG

Al mismo tiempo que se realizaron estos experimentos y con el objetivo de ratificar el diagnóstico de ALG1-CDG, se estableció una colaboración con el grupo perteneciente a “Palmieri Metabolic Disease Laboratory, Children’s Hospital of Philadelphia, Philadelphia, PA, United States” para realizar un análisis de N-glicanos unidos a proteínas séricas mediante espectrometría de masas de tiempo de vuelo de cuadrupolo-ionización por electropulverización (ESI-QTOF), ya que se ha reportado que en pacientes con ALG1-CDG existe acumulación del *N*-tetrasacárido carente de manosa (Neu5AcGalGlcNAc<sub>2</sub>) [63, 65, 66, 67]. La explicación de la acumulación de este tetrasacárido en pacientes con ALG1-CDG es que las células deficientes en ALG1 producen la estructura GlcNAc<sub>2</sub>-P-Dol, sin que esta pueda ser manosilada como normalmente ocurre por la actividad de ALG1. No obstante, esta estructura llega a ser transferida en una mínima parte de las glicoproteínas y en el Golgi, dichas estructuras son sujetas a la adición de galactosa y Sia que normalmente ocurre en este organelo. Así, se sintetiza un tetrasacárido aberrante que hoy sirve de biomarcador para identificar ALG1-CDG [63, 65].

Los resultados del estudio realizado por el laboratorio de enfermedades metabólicas Palmieri se muestran en la figura 27.



**Figura 27.** Cromatogramas totales de iones del *N*-tetrasacárido (NeuAc1Gal1GlcNAc2) y Gal1 o Man1GlcNAc2 en *N*-glicanos séricos de un control sano y del paciente. A, superposición de cromatogramas del *N*-tetrasacárido carente de manosa, Man1/Gal1GlcNAc2 (B) de plasma de control sano (en azul) y del paciente (en rojo). Gal1GlcNAc2 está ausente en las proteínas plasmáticas totales de los controles normales, que en cambio tienen trazas de Man1GlcNAc2 presentes. Se detectó un aumento notable de tetrasacárido en el paciente como se muestra con una flecha negra

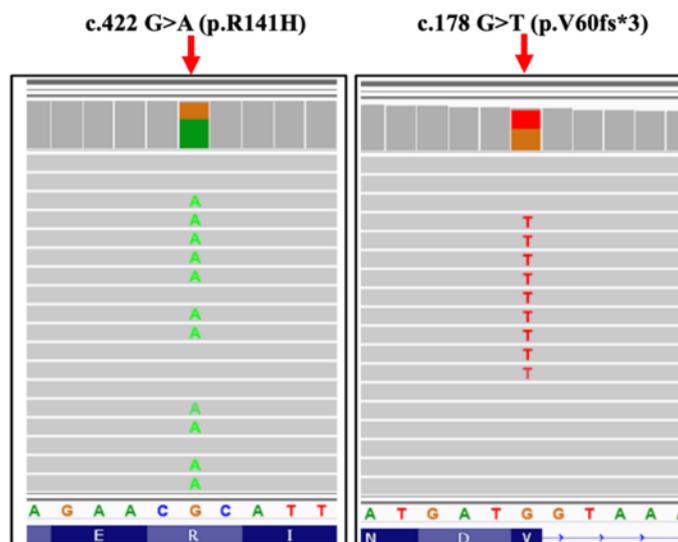
El resultado de este análisis mostró que el tetrasacárido se encontraba elevado al 0,23% de la cantidad de glicanos totales (normal 0 –0,03), mientras que Gal1GlcNAc2 también se encontraba elevado al 0,12% (normal 0) ratificando el diagnóstico de ALG1-CDG en el paciente.

Estos descubrimientos moleculares permitieron la redacción de un artículo que actualmente se encuentra bajo una última revisión para ser publicado y que aborda el caso de este paciente como el primer caso de ALG1-CDG en México.

#### 6.4.4 Paciente 4

La sintomatología del paciente cuatro se muestra en la tabla 1.

Debido a que estaba abierta la posibilidad de hacer secuenciación exómica de este paciente, se envió ADNg para ello al Laboratorio de Diagnóstico Genómico del INMEGEN y se identificó la presencia de la variante patogénica c.422G>A (p.R141H) y de la variante c.178G>T, cuya patogenicidad no estaba reportada, tal y como se observa en la figura 24.



**Figura 28.** Resultados de la secuenciación exómica del paciente 4 que indican la presencia de las mutaciones puntuales c.422 G>A (p.R141H) y c.178 G>T en el gen PMM2.

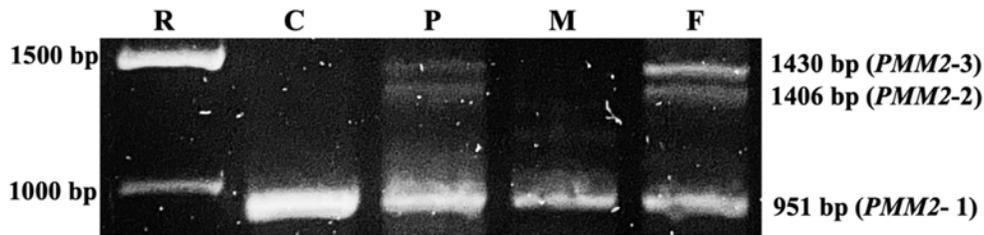
Los efectos de la mutación c.422G>A (p.R141H) ya fueron descritos en la sección 6.4.1.1 dado que el paciente 1 mostró la misma mutación.

##### 6.4.4.1 Variante c.178 G>T

De acuerdo con la base de datos de exomas y genomas de GnomAD, la variante c.178G> T está restringida al origen étnico latino con una frecuencia de 0.000174 o 1 en 5751 (gnomAD Exomes Versión: 2.1.1, a partir de abril de 2021). Esta variante no ha sido funcionalmente caracterizada hasta la fecha; sólo se ha reportado asociada a casos de CDG y se describe como causal de un cambio de Valina por una Leucina en el aminoácido 60 (p.V60L), sin embargo, como se muestra en la figura 27, la mutación se encuentra en el último nucleótido del exón 2, sugiriendo que la patogenicidad de esta mutación pudiera estar relacionada a un proceso alterado de empalme por la disrupción del sitio donador que cambia de UG/GU a UU/GU en la unión exón-2/intrón-2 y que genera isoformas de empalme alternativo que no son visibles en la figura 12.

#### 6.4.4.2 Caracterización del mecanismo patogénico de la variante c.178 G>T y herencia

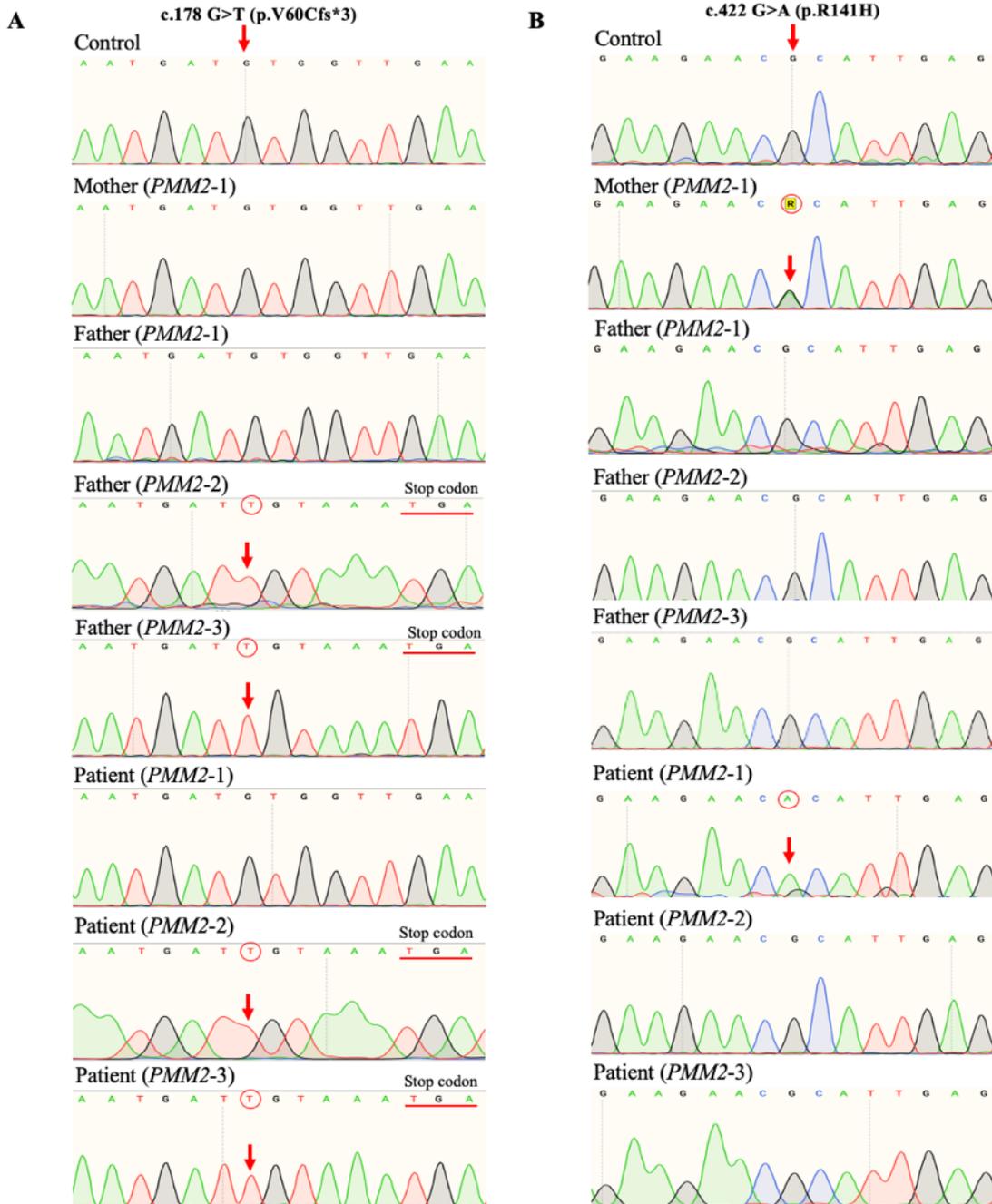
El resultado de la amplificación bajo las condiciones descritas en la sección 5.9 se muestra en la figura 25.



**Figura 29.** Visualización de la amplificación por PCR en gel de agarosa de la secuencia codificante de *PMM2* en el paciente 4. Carril 1, control sano; carril 2, paciente (P); carril 3, madre (M); carril 4, padre (F).

El resultado de la PCR demostró que el control sano y la madre tenían un solo amplicón de *PMM2* con el tamaño de peso esperado de 951pb correspondientes a la amplificación con los oligonucleótidos *PMM2*s y *PMM2*as (isoforma 1, marcada en la figura 25 como *PMM2*-1), sin embargo, como se esperaba, el paciente (P) y el padre (F) presentaron dos amplicones adicionales con un aumento de tamaño respecto al control de aproximadamente 455 y 479pb, denominados isoforma 2 e isoforma 3 (*PMM2*-2 y *PMM2*-3) respectivamente, confirmando la presencia de isoformas de empalme alternativo como se observa en la figura 25.

Ante la evidente presencia de isoformas de empalme alternativo, se realizó la clonación de las isoformas encontradas del paciente como se describió previamente, una vez realizada la clonación se purificaron los plásmidos obtenidos y se prepararon para la secuenciación de Sanger que permitió la identificación completa de la secuencia de las isoformas así como sus consecuencias moleculares, a la par de esto, fueron secuenciadas las isoformas del padre y de la madre para determinar el tipo de herencia de cada mutación, los resultados de la secuenciación de Sanger se muestran en la figura 26.

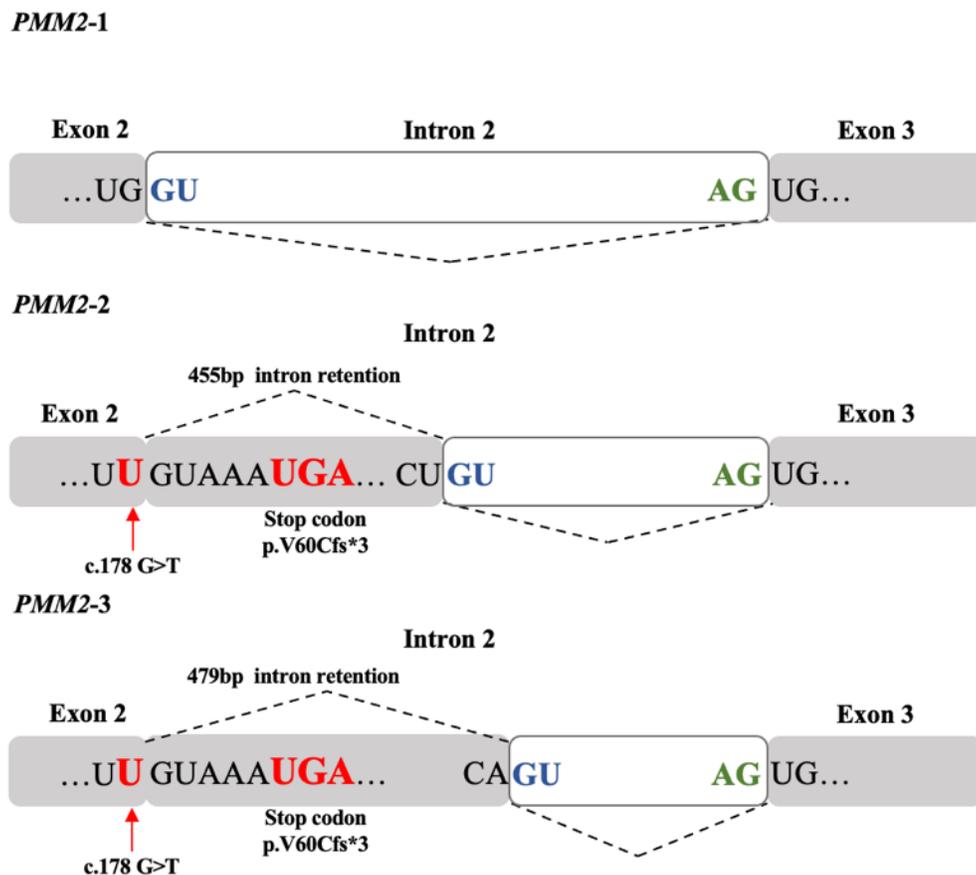


**Figura 30.** Resultados de la secuenciación de Sanger del paciente 4 y sus progenitores en todas las isoformas encontradas. A, los resultados de la secuenciación de Sanger confirman la presencia de la mutación c.178 G>T en las isoformas PMM2-2 y PMM2-3 del padre y del paciente, y la ausencia de esta mutación se observa en el control y en la isoforma PMM2-1 de la madre y el paciente. B, los resultados de la secuenciación de Sanger demuestran la presencia de la mutación c.412 G>A en las isoformas PMM2-1 de la madre y del paciente, y la ausencia de esta mutación se observa en un individuo sano y las isoformas PMM2-2 y PMM2-3 del padre y paciente.

Por otro lado, las isoformas resultantes del empalme alternativo (PMM2-2 y PMM2-3) del paciente y del padre mostraron exclusivamente la mutación c.178G>T, lo que indica la herencia paterna de dicha mutación (figura 26A).

La secuenciación de las isoformas confirmó que la isoforma PMM2-1 del paciente tenía empalme canónico, aunque presentaba exclusivamente la mutación c.422G>A (p.R141H) (figura 26B), indicando la herencia del alelo mutado de la madre.

La secuenciación de Sanger de las isoformas PMM2-2 y PMM2-3 confirmó que la mutación c.178 G>T convierte el sitio donador de empalme en la unión exón-2/intrón-2 de UG/GU a UU/GU, generando así dos sitios potencialmente donadores de empalme que provocan la retención parcial del intrón 2 en la isoforma PMM2-2 la retención parcial es de 455pb del intrón 2, mientras que en la isoforma PMM2-3 existe una retención parcial del intrón 2 de 479 pb. Sin embargo, y a pesar de la diferencia en nucleótidos de la retención entre ambas isoformas, ambos casos desembocan en un cambio de marco de lectura que provoca un codón de paro prematuro 6 pb después de la mutación como se muestra en las secuenciaciones de la figura 26A y en la figura 27.



**Figura 31.** Empalme alternativo y sus consecuencias en el gen PMM2 del paciente 4. El

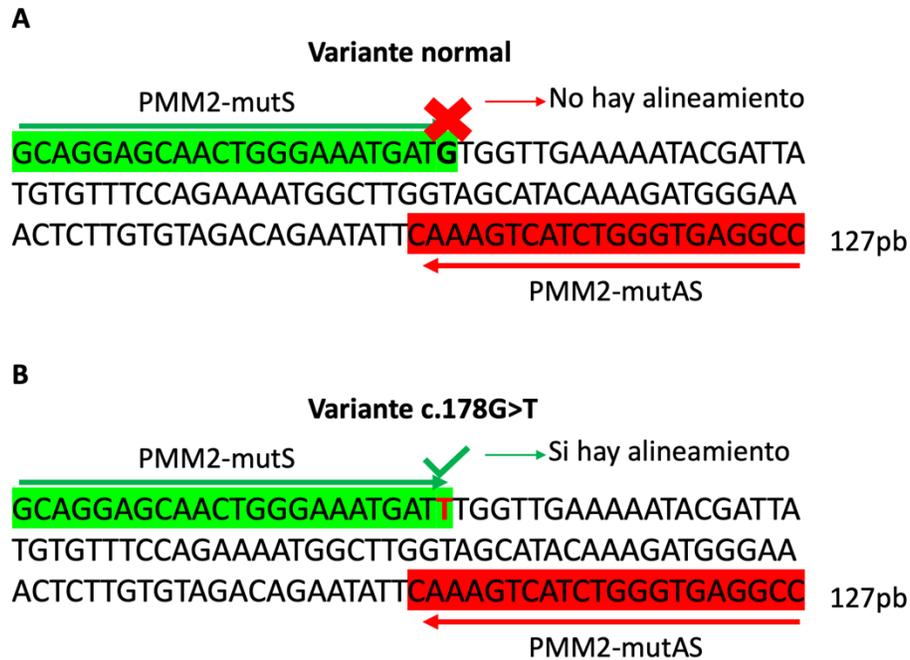
empalme alternativo causado por la mutación c.178 G>T induce la retención parcial del intrón 2 en las isoformas PMM2-2 y PMM2-3 mediante la activación de dos sitios donadores de empalme en la región intrónica, provocando en ambos casos un cambio del marco de lectura y un codón de paro prematuro.

La clonación de las isoformas encontradas así como la secuenciación de Sanger de las mismas permitieron confirmar que la variante c.178G>T genera empalme alternativo no funcional y que la patogenicidad de esta variante se debe a la generación de un codón de paro prematuro p.V60Cfs\*3. Esta variante en conjunto con la conocida variante patogénica c.422G>A (p.R141H) en forma heterocigota compuesta explican el perfil de hipoglicosilación mostrado en el IEF, así como su cuadro clínico del paciente, además de completar el diagnóstico como un PMM2-CDG.

Una incógnita por responder en lo relacionado al paciente 4 es que la mutación R141H heredada por la madre deja a la proteína prácticamente sin actividad enzimática residual, por otro lado, la mutación p.V60Cfs\*3 heredada por el padre deja a la proteína sin aminoácidos que formen parte del sitio catalítico debido a la presencia del codón de paro prematuro, por lo que se podría asumir que el paciente no tiene actividad enzimática de *PMM2*, no obstante, los reportes indican que esto es letal. Por esta razón, fue necesario realizar un ensayo que demostrara la presencia de algún transcrito con la variante c.178G>T, pero sin afectación en el empalme, es decir, que tuviera el cambio de Valina por Leucina que teóricamente se le había asignado a dicha variante, dando como resultado una proteína que no tiene afectado su sitio catalítico. Si bien el cambio de la Valina por Leucina puede afectar la actividad enzimática de *PMM2* no la desactivaría por completo, esto explica porqué estas mutaciones en conjunto no fueron letales en el paciente.

Para identificar la presencia de dicho transcrito, se diseñó un ensayo de PCR alelo específica mediante el diseño del oligonucleótido PMM2-mutS que tiene un cambio en su última posición que lo vuelve específico para la detección de la variante c.178G>T y un segundo oligonucleótido nombrado como PMM2-mutAS. Es importante mencionar que para este ensayo se ocupó como templado la isoforma *PMM2* wt del control sano y la isoforma PMM2-1 del paciente que se observan en la figura 25.

La región de la secuencia *PMM2* a la cual son complementarios estos oligonucleótidos y una visualización de la estrategia ocupada se muestra en la figura 28.



**Figura 32.** Estrategia de PCR alelo específico para la detección de la variante c.178G>T. El oligonucleótido PMM2-mutS es complementario para la región en color verde y el oligonucleótido PMM2-mutAS es complementario para la región en color rojo. La letra T de color rojo representa la posición de la mutación c.178G>T. A, en caso de tener una variante normal (como en un control sano), el oligonucleótido PMM2-mutS sería incapaz de alinearse a la secuencia y por consiguiente no habría amplificación. B, en caso de tener la variante c.178G>T el oligonucleótido sí es capaz de alinearse a la secuencia y como resultado de una correcta amplificación entre ambos oligonucleótidos se espera una sola banda de 127pb.

Las propiedades de los oligonucleótidos diseñados se muestran en la tabla 9.

**Tabla 9.** Características de los oligonucleótidos diseñados para la PCR alelo específico del gen PMM2.

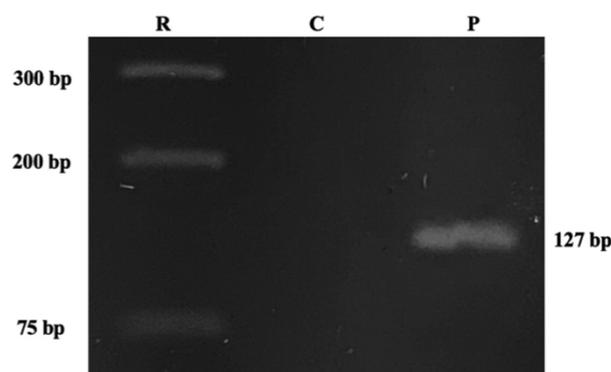
| Nombre            | Secuencia (5' – 3')                   | TM (°C)   | GC%       | Longitud  |
|-------------------|---------------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| <b>PMM2-mutS</b>  | <b>GCA GGA GCA ACT GGG AAA TGA TT</b> | <b>63</b> | <b>48</b> | <b>23</b> |
| <b>PMM2-mutAS</b> | <b>GGC CTC ACC CAG ATG ACT TTG</b>    | <b>63</b> | <b>57</b> | <b>21</b> |

Las condiciones de termociclado a las cuáles se ocuparon estos oligonucleótidos se detallan en la tabla 10.

**Tabla 10.** Condiciones de termociclado ocupadas para la PCR alelo específico del gen PMM2.

| 25 CICLOS        |                   |       |              |            |       |    |
|------------------|-------------------|-------|--------------|------------|-------|----|
|                  | Desnaturalización |       | Alineamiento | Elongación |       |    |
| Temperatura (°C) | 98                | 98    | 70           | 72         | 72    | 22 |
| Tiempo (min)     | 00:30             | 00:10 | 00:30        | 5:00       | 10:00 | ∞  |

La visualización del resultado de este ensayo se muestra en la figura 29.



**Figura 33.** Visualización de la amplificación de la PCR alelo específico en gel de agarosa. R, ruler. C, control sano. P, paciente.

En este ensayo, se visualizó un producto de PCR alelo específico únicamente en el paciente, confirmando la presencia de transcritos de tamaño normal acarreando la mutación c.178G>T solamente en el paciente. Este resultado indica que la mutación c.178G>T es una mutación de causa empalme alternativo pero que no impide totalmente el empalme constitutivo, dando lugar a una cantidad menor de transcritos con la mutación p.V60L de la proteína PMM2. Por lo tanto, proponemos que la isoforma menor de PMM2 p.V60L codificada por la mutación c.178G>T que tiene un empalme constitutivo, es una variante que cuenta con la actividad residual suficiente para que este paciente no presente un cuadro clínico más severo o incluso letal. No obstante, es necesario llevar a cabo más experimentos para caracterizar el impacto de esta mutación sobre la actividad enzimática de PMM2. Dados estos resultados, concluimos que la variante c.178G>T provoca la presencia de 2 transcritos; uno minoritario con el cambio p.V60L que tiene empalme canónico y otro transcrito mayoritario con empalme alternativo no funcional que causa un

codón de paro (p.V60Cfs\*3) y que en conjunto con la variante c.422G>A (p.R141H) confirman genéticamente el diagnóstico de PMM2-CDG en el paciente.

Los hallazgos moleculares en este paciente nos permitieron redactar un segundo artículo que describe a este paciente como el segundo caso de PMM2-CDG en México, además de describir las consecuencias moleculares patogénicas de la variante c.178G>T (p.V60Cfs\*3) [64].

## 7.0 Conclusiones

1. La estrategia implementada en este proyecto permitió establecer el diagnóstico bioquímico y genético en 3 pacientes con sospecha clínica de CDG de tipo I y la identificación de nuevas variantes patogénicas en *PMM2* y *ALG1*, confirmando así la hipótesis de trabajo.
2. Se logró amplificar *PMM2* a partir de ADNc, permitiendo establecer el primer paso en el algoritmo diagnóstico de pacientes con CDG-Ix para quienes no se tenga acceso a secuenciación exómica como primer abordaje molecular
3. Paciente 1:
  - Se identificaron las variantes patogénicas en *PMM2* previamente reportadas en la literatura: c.422G>A (p.R141H) y c.395T>C (p.I132T) y en forma heterocigota compuesta.
  - Es el primer paciente reportado con diagnóstico de *PMM2*-CDG en México.
4. Paciente 2:
  - No se identificaron variantes en *PMM2*, sin embargo, es necesario solicitar material genético adicional que permita establecer su diagnóstico.
5. Paciente 3:
  - No se identificaron variantes patogénicas en *PMM2* por secuenciación de Sanger.
  - La secuenciación exómica identificó dos alelos complejos patogénicos en *ALG1* 208+16\_208+19dup: c.[208+16\_208+19dup; 1312C>T] y c.[208+16\_208+19dup; 208+25G>T].
  - El alelo complejo c.[208+16\_208+19dup; 1312C>T] contiene la variante patogénica c.1312 C>T (p.R438W) que ya ha sido previamente reportada como causante de CDG.
  - El alelo complejo c.[208+16\_208+19dup; 208+25G>T] presenta la variante c.208+25 G>T que no había sido caracterizada en su mecanismo patogénico.
  - Se logró amplificar *ALG1* a partir de ADNc para estudiar los efectos de empalme alternativo generados por el alelo complejo c.[208+16\_208+19dup; 208+25G>T].
  - Se demostró que la variante 208+25G>T es patogénica ya que afecta el empalme canónico del exón 2 de *ALG1* mediante la formación de un nuevo sitio donador (GG a GU) y que es responsable de la formación de un transcrito con la retención parcial de 27pb del intrón 1 y por consiguiente la inserción de 9 aminoácidos (p.N70S\_S71ins9).
  - El tercer paciente es el primer caso diagnosticado de *ALG1*-CDG en México y Latinoamérica.
6. Paciente 4:
  - Se identificó la presencia de dos variantes patogénicas en heterocigosidad compuesta en *PMM2*: la variante patogénica c.422G>A (p.R141H) previamente caracterizada y la variante c.178G>T que no había sido funcionalmente descrita y que está restringida a la población latina.

- Se demostró que la variante c.178G>T en *PMM2* encontrada en el paciente 4, es responsable de causar empalme alternativo no funcional del exón 2 causado por un cambio en el marco de lectura que ocasiona la formación de un codón de paro prematuro (p.V60Cfs\*3).
- El cuadro clínico moderado que presenta el paciente 4 se debe a que la variante c.178G>T también permite la formación de transcritos con empalme canónico (p.V60L) con actividad enzimática residual.
- Es el segundo caso reportado de *PMM2*-CDG en México.

## 8.0 Perspectivas

1. Solicitar material genético del paciente 2 para concluir su diagnóstico e identificar las mutaciones causales del perfil de hipoglicosilación.
2. Mediante ensayos de complementación genética y actividad enzimática comprobar la funcionalidad y actividad residual de PMM2 en presencia de la variante c.178G>T (p.V60L) para demostrar que existe una disminución leve pero permisiva para la actividad de PMM2.
3. Continuar realizando diagnósticos genéticos en otros pacientes mexicanos que actualmente están clasificados como CDG-Ix o CDG-IIx

## 9.0 Bibliografía

1. Carbajal-Rodríguez, L. (2015). *Enfermedades raras* (Vol. 82, Issue 6). [www.medigraphic.org.mx](http://www.medigraphic.org.mx)
2. Orphanet. (n.d.). *Prevalence and incidence of rare diseases: Bibliographic data*. [www.orpha.net](http://www.orpha.net)
3. EURORDIS. (2005). Rare Diseases: Understanding this Public Health Priority. *EURORDIS*, 1–14.
4. The National Organization for Rare Disorders (NORD). 5 de mayo de 2008. Available in: <http://www.reuters.com/article/pressRelease/idUS81376+05-May-2008+BW20080505>
5. Zurriaga-Lloréns O, Martínez-García C, Arizo-Luque V, Sánchez- Pérez MJ, Ramos-Aceitero JM, García-Blasco MJ. Los registros de enfermedades en la investigación epidemiológica de las enfermedades raras en España. *Rev Esp Salud Pública*. 2005; 80: 249-257.
6. Freeze HH, Schachter H, Kinoshita T. Genetic Disorders of Glycosylation. 2017. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology* [Internet]. 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015-2017. Chapter 45. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453041/doi:10.1101/glycobiology.3e.045>
7. Bruneel, A., Cholet, S., Tran, N. T., Mai, T. D., & Fenaille, F. (2020). CDG biochemical screening: Where do we stand?. *Biochimica et biophysica acta. General subjects*, 1864(10), 129652. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129652>
8. Francisco, R., Marques-da-Silva, D., Brasil, S., Pascoal, C., Dos Reis Ferreira, V., Morava, E., & Jaeken, J. (2019). The challenge of CDG diagnosis. *Molecular genetics and metabolism*, 126(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.11.003>
9. Bahena-Bahena, D., López-Valdez, J., Raymond, K., Salinas-Marín, R., Ortega-García, A., Ng, B. G., Freeze, H. H., Ruíz-García, M., & Martínez-Duncker, I. (2014). ATP6V0A2 mutations present in two Mexican Mestizo children with an autosomal recessive cutis laxa syndrome type IIA. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, 1(1), 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2014.04.003>
10. Maverakis, E., Kim, K., Shimoda, M., Gershwin, M. E., Patel, F., Wilken, R., Raychaudhuri, S., Ruhaak, L. R., & Lebrilla, C. B. (2015). Glycans in the immune system and The Altered Glycan Theory of Autoimmunity: A critical review. In *Journal of Autoimmunity* (Vol. 57, pp. 1–13). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2014.12.002>

11. Imperiali, B., & E O'Connor, S. (n.d.). *Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure.*
12. Mellquist, J. L., Kasturi, L., Spitalnik, S. L., Shakin-Eshleman, S. H., & Ave, R. (n.d.). *The Amino Acid Following an Asn-X-Ser/Thr Sequon Is an Important Determinant of N-Linked Core Glycosylation Efficiency.*
13. Dell, A., Galadari, A., Sastre, F., & Hitchen, P. (2010). Similarities and differences in the glycosylation mechanisms in prokaryotes and eukaryotes. In *International Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1155/2010/148178>
14. Patterson, M. C. (2005). Metabolic mimics: The disorders of N-linked glycosylation. In *Seminars in Pediatric Neurology* (Vol. 12, Issue 3, pp. 144–151). <https://doi.org/10.1016/j.spen.2005.10.002>
15. Stanley P, Taniguchi N, Aebi M. N-Glycans. 2017. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology* [Internet]. 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015-2017. Chapter 9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453020/> doi: 10.1101/glycobiology.3e.009
16. Stick, R. v., & Williams, S. J. (2009). Monosaccharide Metabolism. In *Carbohydrates: The Essential Molecules of Life* (pp. 225–251). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-240-52118-3.00006-5>
17. Gámez, A., Serrano, M., Gallego, D., Vilas, A., & Pérez, B. (2020). New and potential strategies for the treatment of PMM2-CDG. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1864(11). <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129686>
18. Varki A, Gagneux P. Biological Functions of Glycans. 2017. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology* [Internet]. 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015-2017. Chapter 7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453034/>doi: 10.1101/glycobiology.3e.007
19. Freeze H. H. (2007). Congenital Disorders of Glycosylation: CDG-I, CDG-II, and beyond. *Current molecular medicine*, 7(4), 389–396. <https://doi.org/10.2174/156652407780831548>
20. Al Teneiji, A., Bruun, T. U., Sidky, S., Cordeiro, D., Cohn, R. D., Mendoza-Londono, R., Moharir, M., Raiman, J., Siriwardena, K., Kyriakopoulou, L., & Mercimek-Mahmutoglu, S. (2017). Phenotypic and genotypic spectrum of congenital disorders of glycosylation type I and type II. *Molecular genetics and metabolism*, 120(3), 235–242. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.12.014>
21. Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Stanley, P., Hart, G. W., Aebi, M., ... Seeberger, P. H. (2017). *Essentials of glycobiology*, third edition. – Cold

- Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 823.  
[https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(00\)01855-9](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(00)01855-9)
22. Scott, K., Gadomski, T., Kozicz, T., & Morava, E. (2014). Congenital disorders of glycosylation: New defects and still counting. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 37(4), 609–617. <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9720-9>
  23. Jiménez Martínez, M. D. C., Trejo Márquez, H., Herrera Sánchez, A., Romero Ibarra, J. L., Chávez, R., Lascurain, R., & Zenteno, E. (2002). Alteraciones de la glicosilación en enfermedades humanas. *Revista Del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 15(1), 39–47.
  24. Martinez-Duncker, I., Dupré, T., Piller, V., Piller, F., Candelier, J. J., Trichet, C., ... Mollicone, R. (2005). Genetic complementation reveals a novel human congenital disorder of glycosylation of type II, due to inactivation of the Golgi CMP-sialic acid transporter. *Blood*, 105(7), 2671–2676. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3509>
  25. Ohtsubo, K., & Marth, J. D. (2006). Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell*, 126(5), 855–867. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.019>
  26. Guillard, M., Dimopoulou, A., Fischer, B., Morava, E., Lefeber, D. J., Kornak, U., & Wevers, R. A. (2009). Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase meets glycosylation in patients with cutis laxa. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1792(9), 903–914. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.12.009>
  27. Blood, R. C., & Woo, D. C. (1965). on Glycoproteins, 240(7), 73–84.
  28. Drouin-garraud, Â., Belgrand, M., Seta, N., Matthijs, G., Cormier-daire, Â., Fre, T., ... Saugier-veber, P. (2001). Neurological Presentation of a Congenital Disorder of Glycosylation CDG-Ia : Implications for Diagnosis and Genetic Counseling, 49(July 2000), 46–49.
  29. Orlean, P., & Orlean, P. (2000). Congenital disorders of glycosylation caused by defects in mannose addition during N-linked oligosaccharide assembly Find the latest version: Congenital disorders of glycosylation caused by defects in mannose addition during N-linked oligosaccharide assembly, 105(2), 131–132.
  30. Imbach, T., Aebi, M., Hennet, T., Imbach, T., Schenk, B., Schollen, E., ... Hennet, T. (2000). Deficiency of dolichol-phosphate-mannose synthase-1 causes congenital disorder of glycosylation type Ie: causes congenital disorder of glycosylation type Ie, 105(2), 233–239
  31. Papers, J. B. C., Doi, M., Thiel, C., Schwarz, M., Peng, J., Grzmil, M., ... Ko, C. (2003). A New Type of Congenital Disorders of Glycosylation (CDG-Ii) Provides New Insights into the Early Steps of Dolichol-linked Oligosaccharide Biosynthesis revealed a severely reduced activity of the mannosyl-, 278(25), 22498–22505. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302850200>

32. Sturiale, L., Barone, R., & Garozzo, D. (2011). The impact of mass spectrometry in the diagnosis of congenital disorders of glycosylation, 891–899. <https://doi.org/10.1007/s10545-011-9306-8>
33. Freeze, H. H. (2001). Update and perspectives on congenital disorders of glycosylation. *Glycobiology*, 11(12), 1299–1309. <https://doi.org/10.1093/glycob/11.12.1299>
34. Matthijs, G., Schollen, E., Van Schaftingen, E., Cassiman, J. J., & Jaeken, J. (1998). Lack of homozygotes for the most frequent disease allele in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1A. *American Journal of Human Genetics*, 62(3), 542–550. <https://doi.org/10.1086/301763>
35. Bjursell, C., Wahlström, J., Berg, K., Stibler, H., Kristiansson, B., Matthijs, G., & Martinsson, T. (1998). Detailed mapping of the phosphomannomutase 2 (PMM2) gene and mutation detection enable improved analysis for Scandinavian CDG type I families. *European Journal of Human Genetics*, 6(6), 603–611. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200234>
36. Carchon, H., Van Schaftingen, E., Matthijs, G., & Jaeken, J. (1999). Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type IA (phosphomannomutase-deficiency). *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1455(2–3), 155–165. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(99\)00073-3](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(99)00073-3)
37. Fiumara, A., Barone, R., Buttitta, P., Di Pietro, M., Scuderi, A., Nigro, F., & Jaeken, J. (1994). Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type I: Ophthalmic aspects in four Sicilian patients. *British Journal of Ophthalmology*, 78(11), 845–846. <https://doi.org/10.1136/bjo.78.11.845>
38. Matthijs, G., Schollen, E., Bjursell, C., Erlandson, A., Freeze, H., Imtiaz, F., ... Winchester, B. (2000). Mutations in PMM2 that cause congenital disorders of glycosylation, type Ia (CDG-Ia). *Human Mutation*, 16(5), 386–394. [https://doi.org/10.1002/1098-1004\(200011\)16:5<386::AID-HUMU2>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1098-1004(200011)16:5<386::AID-HUMU2>3.0.CO;2-Y)
39. Schollen, E., Pardon, E., Heykants, L., Renard, J., Doggett, N. A., Callen, D. F., ... Matthijs, G. (1998). Comparative analysis of the phosphomannomutase genes PMM1, PMM2 and PMM2Ψ: The sequence variation in the processed pseudogene is a reflection of the mutations found in the functional gene. *Human Molecular Genetics*, 7(2), 157–164. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.2.157>
40. Cylwik, B., Naklicki, M., Chrostek, L., & Gruszewska, E. (2013). Congenital disorders of glycosylation. part I. defects of protein N-glycosylation. *Acta Biochimica Polonica*, 60(2), 151–161. <https://doi.org/10.18388/abp.2013.1965>
41. González-Domínguez, C. A., Raya-Trigueros, A., Manrique-Hernández, S., González Jaimes, A., Salinas-Marín, R., Molina-Garay, C., Carrillo-Sánchez,

- K., Flores-Lagunes, L. L., Jiménez-Olivares, M., Dehesa-Caballero, C., Alaez-Versón, C., & Martínez-Duncker, I. (2020). Identification through exome sequencing of the first PMM2-CDG individual of Mexican mestizo origin. *Molecular genetics and metabolism reports*, 25, 100637. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2020.100637>
42. Ng, B. G., Shiryayev, S. A., Rymen, D., Eklund, E. A., Raymond, K., Kircher, M., Abdenur, J. E., Alehan, F., Midro, A. T., Bamshad, M. J., Barone, R., Berry, G. T., Brumbaugh, J. E., Buckingham, K. J., Clarkson, K., Cole, F. S., O'Connor, S., Cooper, G. M., Van Coster, R., Demmer, L. A., ... Freeze, H. H. (2016). ALG1-CDG: Clinical and Molecular Characterization of 39 Unreported Patients. *Human mutation*, 37(7), 653–660. <https://doi.org/10.1002/humu.22983>
43. Rohlfig, A. K., Rust, S., Reunert, J., Tirre, M., Du Chesne, I., Wemhoff, S., Meinhardt, F., Hartmann, H., Das, A. M., & Marquardt, T. (2014). ALG1-CDG: a new case with early fatal outcome. *Gene*, 534(2), 345–351. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.10.013>
44. Matera, A. G., & Wang, Z. (2014). A day in the life of the spliceosome. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(2), 108–121. <https://doi.org/10.1038/nrm3742>
45. Will, C. L., & Lührmann, R. (2011). Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(7), a003707. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003707>
46. Valadkhan S. (2010). Role of the snRNAs in spliceosomal active site. *RNA biology*, 7(3), 345–353. <https://doi.org/10.4161/rna.7.3.12089>
47. Flynn, R. A., Pedram, K., Malaker, S. A., Batista, P. J., Smith, B., Johnson, A. G., George, B. M., Majzoub, K., Villalta, P. W., Carette, J. E., & Bertozzi, C. R. (2021). Small RNAs are modified with N-glycans and displayed on the surface of living cells. *Cell*, S0092-8674(21)00503-1. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.023>
48. Péanne, R., de Lonlay, P., Foulquier, F., Kornak, U., Lefeber, D. J., Morava, E., Pérez, B., Seta, N., Thiel, C., Van Schaftingen, E., Matthijs, G., & Jaeken, J. (2018). Congenital disorders of glycosylation (CDG): Quo vadis?. *European journal of medical genetics*, 61(11), 643–663. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2017.10.012>
49. Wu, R. H., Li, D. F., Tang, W. T., Qiu, K. Y., Li, Y., Liao, X. Y., Tang, D. X., Qin, L. J., Deng, B. Q., & Luo, X. Y. (2018). Atrial septal defect in a patient with congenital disorder of glycosylation type 1a: a case report. *Journal of medical case reports*, 12(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s13256-017-1528-4>
50. Le Bizec, C., Vuillaumier-Barrot, S., Barnier, A., Dupré, T., Durand, G., & Seta, N. (2005). A new insight into PMM2 mutations in the French

- population. *Human mutation*, 25(5), 504–505.  
<https://doi.org/10.1002/humu.9336>
51. Vuillaumier-Barrot, S., Hetet, G., Barnier, A., Dupré, T., Cuer, M., de Lonlay, P., Cormier-Daire, V., Durand, G., Grandchamp, B., & Seta, N. (2000). Identification of four novel PMM2 mutations in congenital disorders of glycosylation (CDG) la French patients. *Journal of medical genetics*, 37(8), 579–580. <https://doi.org/10.1136/jmg.37.8.579>
52. Vega, A. I., Pérez-Cerdá, C., Abia, D., Gámez, A., Briones, P., Artuch, R., Desviat, L. R., Ugarte, M., & Pérez, B. (2011). Expression analysis revealing destabilizing mutations in phosphomannomutase 2 deficiency (PMM2-CDG): expression analysis of PMM2-CDG mutations. *Journal of inherited metabolic disease*, 34(4), 929–939. <https://doi.org/10.1007/s10545-011-9328-2>
53. Yuste-Checa, P., Gámez, A., Brasil, S., Desviat, L. R., Ugarte, M., Pérez-Cerdá, C., & Pérez, B. (2015). The Effects of PMM2-CDG-Causing Mutations on the Folding, Activity, and Stability of the PMM2 Protein. *Human mutation*, 36(9), 851–860. <https://doi.org/10.1002/humu.22817>
54. Peng, T., Lv, C., Tan, H., Huang, J., He, H., Wang, Y., Zeng, M., Yi, D., Li, J., Deng, H., Shi, X., & Xiao, H. (2020). Novel PMM2 missense mutation in a Chinese family with non-syndromic premature ovarian insufficiency. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 37(2), 443–450. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01675-8>
55. Ondruskova, N., Cechova, A., Hansikova, H., Honzik, T., & Jaeken, J. (2021). Congenital disorders of glycosylation: Still "hot" in 2020. *Biochimica et biophysica acta. General subjects*, 1865(1), 129751. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129751>
56. Verheijen, J., Tahata, S., Kozicz, T., Witters, P., & Morava, E. (2020). Therapeutic approaches in Congenital Disorders of Glycosylation (CDG) involving N-linked glycosylation: an update. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*, 22(2), 268–279.
57. Bogdańska, A., & Tylki-Szymańska, A. (2020). Wrodzone zaburzenia glikozylacji białek – stale powiększająca się grupa chorób metabolicznych [Congenital disorders of glycosylation - constantly growing group of metabolic diseases]. *Postepy biochemii*, 66(3), 213–228.
58. Jaeken, J., & Péanne, R. (2017). What is new in CDG?. *Journal of inherited metabolic disease*, 40(4), 569–586. <https://doi.org/10.1007/s10545-017-0050-6>
59. Chang, I. J., He, M., & Lam, C. T. (2018). Congenital disorders of glycosylation. *Annals of translational medicine*, 6(24), 477. <https://doi.org/10.21037/atm.2018.10.45>
60. Casetta, B., Malvagia, S., Funghini, S., Martinelli, D., Dionisi-Vici, C., Barone, R., Fiumara, A., Donati, M. A., Guerrini, R., & la Marca, G. (2020). A new

- strategy implementing mass spectrometry in the diagnosis of congenital disorders of N-glycosylation (CDG). *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 59(1), 165–171. <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-0650>
61. Ferreira, C. R., Altassan, R., Marques-Da-Silva, D., Francisco, R., Jaeken, J., & Morava, E. (2018). Recognizable phenotypes in CDG. *Journal of inherited metabolic disease*, 41(3), 541–553. <https://doi.org/10.1007/s10545-018-0156-5>
62. Dupré, T., Vuillaumier-Barrot, S., Chantret, I., Sadou Yayé, H., Le Bizec, C., Afenjar, A., Altuzarra, C., Barnérias, C., Burglen, L., de Lonlay, P., Feillet, F., Napuri, S., Seta, N., & Moore, S. E. (2010). Guanosine diphosphate-mannose:GlcNAc2-PP-dolichol mannosyltransferase deficiency (congenital disorders of glycosylation type I<sub>k</sub>): five new patients and seven novel mutations. *Journal of medical genetics*, 47(11), 729–735. <https://doi.org/10.1136/jmg.2009.072504>
63. Zhang, W., James, P. M., Ng, B. G., Li, X., Xia, B., Rong, J., Asif, G., Raymond, K., Jones, M. A., Hegde, M., Ju, T., Cummings, R. D., Clarkson, K., Wood, T., Boerkoel, C. F., Freeze, H. H., & He, M. (2016). A Novel N-Tetrasaccharide in Patients with Congenital Disorders of Glycosylation, Including Asparagine-Linked Glycosylation Protein 1, Phosphomannomutase 2, and Mannose Phosphate Isomerase Deficiencies. *Clinical chemistry*, 62(1), 208–217. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.243279>
64. González-Domínguez, C. A., Villarroel, C. E., Rodríguez-Morales, M., Manrique-Hernández, S., González-Jaimes, A., Olvera-Rodríguez, F., Beutelspacher, K., Molina-Garay, C., Carrillo-Sánchez, K., Flores-Lagunes, L. L., Jiménez-Olivares, M., Muñoz-Rivas, A., Cruz-Muñoz, M. E., Mora-Montes, H. M., Salinas-Marín, R., Alaez-Verson, C., & Martínez-Duncker, I. (2021). Non-functional alternative splicing caused by a Latino pathogenic variant in a case of PMM2-CDG. *Molecular genetics and metabolism reports*, 28, 100781. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2021.100781>
65. Chen, J., Li, X., Edmondson, A., Meyers, G. D., Izumi, K., Ackermann, A. M., Morava, E., Ficicioglu, C., Bennett, M. J., & He, M. (2019). Increased Clinical Sensitivity and Specificity of Plasma Protein N-Glycan Profiling for Diagnosing Congenital Disorders of Glycosylation by Use of Flow Injection-Electrospray Ionization-Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clinical chemistry*, 65(5), 653–663. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2018.296780>
66. Bengtson, P., Ng, B. G., Jaeken, J., Matthijs, G., Freeze, H. H., & Eklund, E. A. (2016). Serum transferrin carrying the xeno-tetrasaccharide NeuAc-Gal-GlcNAc2 is a biomarker of ALG1-CDG. *Journal of inherited metabolic disease*, 39(1), 107–114. <https://doi.org/10.1007/s10545-015-9884-y>

67. Chen, J., Li, X., Edmondson, A., Meyers, G. D., Izumi, K., Ackermann, A. M., Morava, E., Ficicioglu, C., Bennett, M. J., & He, M. (2019). Increased Clinical Sensitivity and Specificity of Plasma Protein *N*-Glycan Profiling for Diagnosing Congenital Disorders of Glycosylation by Use of Flow Injection-Electrospray Ionization-Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clinical chemistry*, 65(5), 653–663. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2018.296780>

## 10.0 Anexos

### 10.1 Información sobre CDG asociados a la N-glicosilación

SNC: Sistema Nervioso Central. AR: Autosómica recesiva. XD: Dominante ligado a X. XR: Recesivo ligado a X. OMIM: Herencia Mendeliana en el Hombre (del inglés Online Mendelian Inheritance in Man).

| CDG asociados a N-Glicosilación |   |   |        |          |
|---------------------------------|---|---|--------|----------|
| CDG                             | Hallazgos clínicos  | Proteína afectada   | OMIM   | Herencia |
| <b>Con afectaciones en SNC</b>  |   |   |        |          |
| ALG1                            | Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, convulsiones, hipotonía, inmunodeficiencia, infecciones, falla hepática, hipogonadismo, miocardiopatía hipertrófica, nefropatía, microcefalia, micrognatia, hipertelorismo, fontanela alargada.   | GDP-Man: GlcNAc2-PP-Dol manosiltransferasa I                  | 608540 | AR       |
| ALG2                            | Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, convulsiones, hipotonía, hipomielinización, nistagmo, coloboma del iris, hepatomegalia, coagulopatía, infecciones, microcefalia, cataratas.   | GDP-Man: Man1GlcNAc2-PP-Dol manosiltransferasa II             | 607906 | AR       |
| ALG3                            | Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, convulsiones, hipotonía, atrofia cerebral, atrofia cerebelar progresiva, atrofia del nervio óptico, microcefalia postnatal, hipertelorismo con puente nasal ancho, orejas gruesas y alargadas, labios delgados, micrognatia.  | Dol-P-Man: Man5GlcNAc2-PP-Dol manosiltransferasa VI           | 601110 | AR       |
| ALG6                            | Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, ataxia, convulsiones, hipotonía, falla hepática, problemas de alimentación, microcefalia.   | Dol-P-Glc: Man9GlcNAc2-PP-Dol glucosiltransferasa I           | 603147 | AR       |
| ALG8                            | Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, convulsiones, hipotonía, ascitis, coagulopatía, enteropatía perdedora de proteínas, hepatomegalia, nefropatía, linfedema, cataratas, orejas de implantación baja, retrognatia.  | UDP-GlcNAc-GlcNAc-PP-Dolglucosiltransferasa II                | 608104 | AR       |
| ALG9                            | Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, convulsiones, hipotonía muscular, hepatomegalia, microcefalia progresiva, hipertelorismo, puente nasal deprimido, frente protuberante, orejas con implantación baja, boca grande.   | Dol-P-Man: Man 6 y 8 GlcNAc2-PP-Dol manosiltransferasa VII/IX | 608776 | AR       |
| ALG11                           | Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, falta de desarrollo del habla convulsiones, opistótono, hipotonía, deterioro auditivo neurosensorial, desorden en la termorregulación, dificultades en la ingesta de alimentos y vómitos, pezones invertidos, microcefalia, estrabismo, frente alta, línea de cabello posterior baja.   | Dol-P-Man: Man 4 y 5 GlcNAc2-PP-Dol manosiltransferasa IV/V   | 613661 | AR       |
| ALG12                           | Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, hipotonía, convulsiones, hipogonadismo, hipogamaglobulinemia, infecciones respiratorias recurrentes, coagulopatía, microcefalia progresiva.   | Dol-P-Man: Man7GlcNAc2-PP-Dol manosiltransferasa VIII         | 607143 | AR       |
| ALG13                           | Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, desarrollo tardío del habla y lenguaje, deterioro cognitivo, autismo, convulsiones, hipotonía, anomalía del ventrículo lateral, atrofia del nervio óptico, nistagmo horizontal, hirsutismo, pobre control de la cabeza, contacto visual deficiente, disminución del peso corporal, hepatomegalia, infecciones recurrentes, microcefalia, pulgar aducido, punta nasal hacia arriba, barbilla corta, filtrum largo, hipertelorismo. | UDP-GlcNAc:Dol-P-GlcNAc-P transferasa                         | 300884 | X D      |
| ALG14                           | Retraso psicomotor, hipotonía, síndrome miasténico, parálisis facial, calambres musculares, escoliosis, múltiples contracturas articulares, hiperlaxitud articular, ptosis, estrabismo.   | UDP-GlcNAc:Dol-PP-GlcNAc transferasa                          | 616227 | AR       |
| DDOST                           | Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, hipotonía, convulsiones, disfunción motora-oral, hipomielinización, coagulopatía, esteatosis hepática, hipotiroidismo primario, falta de crecimiento, maduración esquelética acelerada, infecciones del oído, lipodistrofia, movimiento muscular no intencional, osteopenia, piel seca, proteinuria nefrótica, reflujo gastroesofágico, baja estatura, esotropía, baja estatura.  | Subunidad DDOST del complejo OST                              | 614507 | AR       |
| DPAGT1                          | Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, hipotonía, convulsiones, infecciones, síndrome miasténico congénito, microcefalia, micrognatia, clinodactilia del quinto dedo.  | UDP-GlcNAc:Dol-P-GlcNAc-1-P transferasa                       | 608093 | AR       |
| FUT8                            | Discapacidad intelectual, retraso psicomotor severo, dificultades respiratorias, problemas de alimentación, baja estatura, osteopenia, dislocación de cadera, cifoescoliosis.   | $\alpha$ 1-6 fucosiltransferasa                               | 618005 | AR       |
| MAN1B1                          | Discapacidad intelectual no sindrómica (NSID), retraso psicomotor, retraso del habla, características dismórficas variables, obesidad troncal, macrocefalia.  | Manosidasa I  | 614202 | AR       |
| MGAT2                           | Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, problemas de alimentación, coagulopatía, diarrea severa, orejas largas con rotación posterior con antihélix prominente, boca abierta, dientes grandes y compactados, estatura alta.   | GlcNAc transferasa II   | 212066 | AR       |

|                                |   |  |        |     |
|--------------------------------|---|--|--------|-----|
| MOGS                           | Convulsiones, hipotonía, dificultad en la ingesta de alimentos, hepatomegalia, coagulopatía, hipoplasia genital, escoliosis, movimientos estereotípicos de las manos, occipucio prominente, fisuras palpebrales cortas, cejas largas, nariz ancha, paladar con arco alto, retrognatia, tetrasacárido único en la orina, hipogamaglobulinemia severa.  | Glucosidasa I  | 606056 | AR  |
| PMM2                           | Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, retraso en el crecimiento, convulsiones, hipotonía, hipoplasia cerebelosa, hipoflexia, diarrea, coagulopatía, cardiomiopatía, endocrinopatía, hepatopatía, estrabismo, dedos largos, lipodistrofia, boca ancha, pezones invertidos, filtrum largo, laxitud articular.   | Fosfomanomutasa II   | 212065 | AR  |
| RFT1                           | Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, discapacidad auditiva, discapacidad visual sin fijación, anormalidad de la fosa craneal posterior, lesión de los ganglios basales, ataxia, hipotonía, atrofia cortical cerebral, convulsiones, estatura baja, artrogriposis múltiple congénita, dificultad en la ingesta de alimentos, hepatomegalia, coagulopatía, microcefalia, micrognatia, pulgares aducidos, pezones invertidos. | Man5GlcNAc2-PP-Dol-flipasa   | 612015 | AR  |
| SSR3                           | Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, convulsiones, estructura cerebral anormal, microcefalia.  | Proteína de la secuencia señal del receptor del complejo TRAP, gamma | 606213 | AR  |
| SSR4                           | Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, convulsiones, hipotonía, coagulopatía, conducto arterioso persistente, dificultad en la ingesta de alimentos, reflujo gastroesofágico, vómito, dislocación articular, escoliosis, riñón en herradura, microcefalia, estrabismo, boca ancha, macrotia, dientes espaciados, micrognatia, exceso de piel alrededor del cuello.   | Proteína de la secuencia señal del receptor del complejo TRAP, delta | 300934 | X R |
| STT3A                          | Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, atrofia cerebelosa, convulsiones, hipotonía, criptorquidia, dificultad en la ingesta de alimentos, microcefalia, micropene, hipoplasia escrotal.  | Subunidad del complejo OST   | 615596 | AR  |
| STT3B                          | Discapacidad intelectual, retraso en el crecimiento intrauterino, retraso psicomotor, atrofia cerebelosa, hipotonía, atrofia óptica, convulsiones, criptorquidia, dificultad en la ingesta de alimentos, dificultad respiratoria, trombocitopenia, microcefalia, micropene.   | Subunidad del complejo OST   | 615597 | AR  |
| TUSC3                          | Discapacidad intelectual no sindrómica (NSID). Retraso en el crecimiento, dismorfia, camptodactilia, sindactilia.   | Subunidad del complejo OST   | 611093 | AR  |
| <b>Sin afectaciones en SNC</b> |   |  |        |     |
| GANAB                          | Enfermedad renal y poliquística autosómica dominante.   | Subunidad $\alpha$ de la glucosidasa II                              | 600666 | AR  |
| MPI                            | Coagulopatía, enteropatía perdedora de proteínas, fibrosis hepática, hipoglucemia hiperinsulinémica, linfangiectasia, vómitos.  | Fosfomano isomerasa  | 602579 | AR  |
| PRKCSH                         | Enfermedad renal y poliquística autosómica dominante.   | Subunidad $\beta$ de la glucosidasa II                               | 174050 | AR  |

## 10.2 Información sobre CDG mixtos

| CDG mixtos                     |   |  |        |           |
|--------------------------------|---|--|--------|-----------|
| CDG                            | Hallazgos clínicos  | Proteína afectada                            | OMIM   | Herencia  |
| <b>Con afectaciones en SNC</b> |   |  |        |           |
| ARCN1                          | Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, autismo, convulsiones, defecto del tabique ventricular, criptorquidia, catarata posterior, microcefalia, micrognatia, paladar hendido, laxitud de las articulaciones pequeñas.  | COP-I subunidad delta                        | 617164 | AD        |
| ATP6AP1                        | Discapacidad intelectual, anomalías neurocognitivas variables, disfunción hepática, inmunodeficiencia, hipogammaglobulinemia.   | Subunidad S1 de la V-ATPasa                  | 300972 | X R       |
| ATP6AP2                        | Discapacidad intelectual, hiporreflexia, parkinsonismo, cutis laxa, atrofia cerebelar.  | Subunidad de la V-ATPasa                     | 300556 | X R       |
| ATP6V0A2                       | Discapacidad intelectual, hipotonía, epilepsia, convulsiones, dificultad en la ingesta de alimentos, miopatía, osteoporosis, anomalías craneofaciales, cierre tardío de las fontanelas, microcefalia, cutis laxa, hiperlaxitud articular, dislocación congénita de la cadera, escoliosis, hernias abdominales, filtrum largo.   | Subunidad A2, dominio V0 de la V-ATPasa      | 219200 | AR        |
| ATP6V1A                        | Discapacidad intelectual, anomalías de la materia blanca, anomalías cardíacas, hipotonía, orejas prominentes, pequeñas fisuras palpebrales, cataratas, estrabismo, retrognatia, cutis laxa, microcefalia, cara triangular.  | Subunidad A, dominio V1 de la V-ATPasa       | 617403 | AR        |
| ATP6V1E1                       | Discapacidad intelectual, anomalías cardíacas, estenosis pilórica, frente corta, blefarofimosis, estrabismo, entropión, hinchazón infraorbitaria, hipoplasia maxilar, apiñamiento de los dientes, mandíbula prominente, mejillas caídas, nares antevertidos, fístula larga, paladar medio, venas prominentes, testículos bilaterales no descendidos, micropene, camptodactilia, cutis laxa. | Subunidad E1, dominio V1 de la V-ATPasa      | 617402 | AR        |
| B4GALT1                        | Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, malformación de Dandy-Walker, hipotonía, miopatía, coagulopatía, hepatomegalia, anomalías craneofaciales, hidrocefalia, hipertensión intracraneal, macrocefalia.  | $\beta$ 1-4 galactosiltransferasa            | 607091 | AR        |
| SLC35A1                        | Discapacidad intelectual, ataxia, convulsiones, neutropenia, sangrado, trombocitopenia, afectación renal y cardíaca, occipital plano, hipertelorismo, ojos hundidos, filtrum corto, clinodactilia, hiperlaxitud articular.  | Transportador de CMP-NeuAc                   | 603585 | AR        |
| SLC35A2                        | Discapacidad intelectual, convulsiones, hipsarritmia, anomalías esqueléticas, hipotonía, extremidades acortadas, cejas gruesas, puente nasal ancho, labios gruesos, boca semiabierta y prognatismo maxilar.   | Transportador de UDP-Gal                     | 300896 | SMo / X D |
| SLC35A3                        | Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, epilepsia, hipotonía, trastorno del espectro autista, artrogriposis, dislocación de cadera, microcefalia, retromicrognatia.   | Transportador de UDP-GlcNAc                  | 615553 | AR        |
| SLC35C1                        | Discapacidad intelectual, convulsiones, epilepsia, hipotonía, infecciones con neutrofilia, otitis, enanismo, microcefalia.  | Transportador de GDP-Fucosa                  | 266265 | AR        |
| SLC35D1                        | Condrodisplasia letal neonatal, displasia esquelética de miembros cortos.   | Transportador de Golgi UDP-GlcA / UDP-GalNAc | 269250 | AR        |

|       |  |   |        |    |
|-------|--|---|--------|----|
| COG1  | Discapacidad intelectual, hipotonía, anomalías cardiovasculares, baja estatura, dificultad en la ingesta de alimentos, espondilosis, hepatomegalia, osteoporosis, anomalías craneofaciales, micrognatia, hipertelorismo, puente nasal ancho, filtrum largo, boca pequeña, paladar alto, orejas poco rotadas, microtia derecha, huesos acortados.   | Complejo COG, subunidad 1                         | 611209 | AR |
| COG2  | Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, cuadriplejía espástica, convulsiones, disfunción hepática, hipoceruloplasmia, hipocupremia, microcefalia.  | Complejo COG, subunidad 2                         | 617395 | AR |
| COG4  | Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, epilepsia, ataxia, hipotonía, convulsiones, falta de crecimiento en la infancia con diarrea recurrente, dificultad en la ingesta de alimentos, hepatoesplenomegalia, infecciones del tracto respiratorio, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, muerte prematura, anomalías craneofaciales, microcefalia, nistagmo, hiperreflexia. | Complejo COG, subunidad 4                         | 613489 | AR |
| COG5  | Discapacidad intelectual, ataxia, discinesia, hipotonía, retraso del habla, atrofia del cerebelo y del tronco cerebral.  | Complejo COG, subunidad 5                         | 613612 | AR |
| COG6  | Discapacidad intelectual, convulsiones, epilepsia, hipotonía, hepatomegalia, diarrea, vómitos, enfermedades renales, hiperhidrosis e hiperqueratosis, retrognatia, microcefalia, fisuras palpebrales amplias, retrognatia, polidactilia postaxial y anteposición anal.   | Complejo COG, subunidad 6                         | 614576 | AR |
| COG7  | Discapacidad intelectual, retraso en el crecimiento, anomalías cardíacas, convulsiones, epilepsia, hipotonía, hepatomegalia, hiperbilirrubinemia, ictericia, muerte prematura, micrognatia, microcefalia, cuello corto, pulgares aducidos, cutis laxa.   | Complejo COG, subunidad 7                         | 608779 | AR |
| COG8  | Discapacidad intelectual, epilepsia, convulsiones, hipotonía, letargo, mioclono, estrabismo, microcefalia.   | Complejo COG, subunidad 8                         | 611182 | AR |
| COPB2 | Retraso psicomotor grave, falta de crecimiento, ceguera cortical, microcefalia, espasticidad.  | COP-I subunidad beta 2                            | 617800 | AR |
| DOLK  | Discapacidad intelectual, hipotonía, convulsiones, epilepsia, distrofia muscular, hiperqueratosis, ictiosis, infecciones en el tracto respiratorio, coagulopatía, cardiomiopatía, hipoglucemia, nistagmo, enanismo, microcefalia.  | Dolicol cinasa                                    | 610768 | AR |
| DPM1  | Discapacidad intelectual, ataxia, hipotonía, convulsiones, epilepsia, ceguera, distrofia muscular, dificultad para tragar, discinesia. CK elevada, trigonocefalia, microcefalia, micrognatia, frente prominente, puente nasal alto, nistagmo, estrabismo, hipertelorismo.  | Dol-P-Man transferasa I                           | 608799 | AD |
| DPM2  | Discapacidad intelectual, convulsiones, hipoplasia cerebelosa, hipotonía, distrofia muscular. CK y transaminasas elevadas, trigonocefalia, microcefalia, micrognatia, hipotelorismo, nariz pequeña, paladar arqueado.  | Dol-P-Man transferasa 2                           | 615042 | AR |
| DPM3  | Discapacidad intelectual, episodio similar a un accidente cerebrovascular, miocardiopatía dilatada, distrofia muscular. CK elevada.  | Dol-P-Man transferasa 3                           | 612937 | AR |
| GMPPA | Discapacidad intelectual, hipotonía, acalasia, alacrimia, sordera, anomalías de la marcha, espasticidad, hipohidrosis.   | Subunidad $\alpha$ de la GDP-Man: pirofosforilasa | 615510 | AR |
| GMPPB | Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, retraso en el habla, ataxia, disfunción retinal. CK elevada, microcefalia, malformaciones del cerebro y los ojos.  | Subunidad $\beta$ de la GDP-Man: pirofosforilasa  | 615350 | AR |
| MPDU1 | Discapacidad intelectual, convulsiones, epilepsia, hipotonía, dermatitis, trastorno cutáneo similar a ictiosis, dificultades graves de alimentación, trastorno de la respiración, enanismo.  | Dol-P-Man flipasa                                 | 609180 | AR |

| Sin afectaciones en SNC |   |  |        |       |
|-------------------------|---|--|--------|-------|
| CHST6                   | Fotofobia dolorosa, nubes y erosiones corneales.  | Queratán sulfato 6-O-sulfotransferasa            | 217800 | AR    |
| COPA                    | Artritis inflamatoria, enfermedad pulmonar intersticial, dificultad para respirar o tos, enfermedad renal mediada por complejos inmunitarios.   | COP-I subunidad alfa                             | 616414 | AD    |
| GNE                     | Debilidad muscular proximal y distal, desgaste de las extremidades superiores e inferiores, preservación del cuádriceps.  | UDP-GlcNAc2 epimerasa/N-acetil-manosamina cinasa | 605820 | AR    |
| PGM1                    | Cardiomiopatías, disnea, hepatopatía, hipertermia maligna, hipoglucemia, miocardiopatía dilatada, paro cardíaco, rabdomiólisis, trombosis, labio leporino, paladar hendido, úvula bífida. | Fosfoglucomutasa I                               | 614921 | AR    |
| SAR1B                   | Retraso en el crecimiento, diarrea, esteatorrea.  | GTPasa COP II                                    | 246700 | AR    |
| SEC23A                  | Defectos esqueléticos, displasia cráneo lenticulosutural, cataratas suturales, hipertelorismo, fontanelas de cierre tardío, nariz prominente, paladar hendido, macrocefalia.              | COP II   | 607812 | AR    |
| SEC23B                  | Anemia, colelitiasis, eritropoyesis interrumpida con eritroblastos multinucleados en la médula ósea, hiperbilirrubinemia, ictericia.  | COP II   | 224100 | AR AD |

## 10.3 Variantes reportadas en PMM2 y su significancia clínica

| Variante         | Cambio proteico | Significancia clinica       | Variante     | Cambio proteico | Significancia clinica   | Variante        | Cambio proteico | Significancia clinica   | Variante   | Cambio proteico | Significancia clinica   |
|------------------|-----------------|-----------------------------|--------------|-----------------|-------------------------|-----------------|-----------------|-------------------------|------------|-----------------|-------------------------|
| c.1>G            | M1V             | Patogena                    | c.186del     | K63fs           | Potencialmente patogena | c.394A>T        | I132F           | Patogena                | c.584A>G   | H195R           | Potencialmente patogena |
| c.14G>A          | G5D             | Potencialmente patogena     | c.190del     | Y64fs           | Patogena                | c.395T>C        | I132T           | Patogena                | c.601T>G   | Y201*           | Potencialmente patogena |
| c.24del          | C9fs            | Patogena                    | c.193G>T     | D65Y            | Patogena                | c.414del        | E139fs          | Potencialmente patogena | c.620T>C   | F207S           | Patogena                |
| c.26G>A          | C9*             | Patogena                    | c.201_202del | F68fs           | Patogena                | c.415G>A        | E139K           | Patogena                | c.623G>C   | G208A           | Patogena                |
| c.28C>T          | L10F            | Potencialmente patogena     | c.243_244del | L82fs           | Patogena                | c.421C>T        | R141C           | Potencialmente patogena | c.639+1G>A |                 | Potencialmente patogena |
| c.43G>A          | G15R            | Potencialmente patogena     | c.255G>A     |                 | Patogena                | c.422G>A        | R141H           | Patogena                | c.640-9T>G |                 | Potencialmente patogena |
| c.53C>G          | T18S            | Potencialmente patogena     | c.255+1G>A   |                 | Patogena                | c.430T>C        | F144L           | Potencialmente patogena | c.647A>T   | N216I           | Patogena                |
| c.55del          | A19fs           | Patogena                    | c.255+2T>C   |                 | Patogena                | c.432C>A        | F144L           | Potencialmente patogena | c.652C>G   | H218D           | Potencialmente patogena |
| c.66+1del        |                 | Potencialmente patogena     | c.256-1G>C   |                 | Patogena                | c.442G>A        | D148N           | Patogena                | c.655A>T   | H218L           | Patogena                |
| c.66+1G>A        |                 | Patogena                    | c.264_265del | H90fs           | Patogena                | c.447+5G>A      |                 | Potencialmente patogena | c.668C>G   | D223E           | Patogena                |
| c.67-1G>T        |                 | Potencialmente patogena     | c.310C>G     | L104V           | Patogena                | c.448-2A>G      |                 | Potencialmente patogena | c.677C>G   | T265S           | Patogena                |
| c.67-2A>T        |                 | Potencialmente patogena     | c.323C>T     | A108V           | Patogena                | c.448-1_448del  |                 | Potencialmente patogena | c.682G>T   | C228C           | Patogena                |
| c.72del          | T25fs           | Patogena                    | c.324del     | I110fs          | Patogena                | c.451_454del    | N152fs          | Potencialmente patogena | c.687C>G   | Y229*           | Potencialmente patogena |
| c.73dup          | T25dup          | Patogena                    | c.337C>A     | P113T           | Patogena                | c.434_455del    | I153fs          | Patogena                | c.691G>A   | V231M           | Patogena                |
| c.95_96delins GC | L32R            | Patogena                    | c.338C>T     | P113L           | Patogena                | c.457dup        | I153fs          | Patogena                | c.710C>T   | T237R           | Patogena                |
| c.95T>G          | L32R            | Patogena                    | c.345dup     | R116fs          | Potencialmente patogena | c.438_462del    | I153fs          | Patogena                | c.710C>G   | T237R           | Patogena                |
| c.97C>T          | L33*            | Patogena                    | c.348-2A>C   |                 | Potencialmente patogena | c.463C>T        | I153T           | Patogena                | c.722G>C   | C241S           | Patogena                |
| c.104T>A         | L35*            | Patogena                    | c.347+15A>C  |                 | Potencialmente patogena | c.470T>C        | Q155*           | Patogena                |            |                 |                         |
| c.127G>A         | Q37*            | Patogena                    | c.348-1G>C   |                 | Potencialmente patogena | c.484C>T        | F157S           | Potencialmente patogena |            |                 |                         |
| c.131T>C         | V44M            | Potencialmente patogena     | c.349G>T     | G117            | Patogena                | c.488_491del    | R162W           | Patogena                |            |                 |                         |
| c.157C>T         | C63*            | Patogena                    | c.349G>C     | G117R           | Patogena                | c.511dup        | K163fs          | Patogena                |            |                 |                         |
| c.160dup         | E54fs           | Patogena                    | c.355T>C     | F119L           | Patogena                | c.548T>C        | T177fs          | Potencialmente patogena |            |                 |                         |
| c.176G>T         | V60L            | Patogena                    | c.357C>A     | F119L           | Patogena                | c.560G>A        | F183S           | Patogena                |            |                 |                         |
| c.178+1G>A       |                 | Conflicto de interpretación | c.357C>T     | R123*           | Patogena                | c.561G>A        | W187*           | Patogena                |            |                 |                         |
| c.178+2T>G       |                 | Potencialmente patogena     | c.377_381del | M126fs          | Patogena                | c.561G>A        | W187*           | Patogena                |            |                 |                         |
| c.179-2A>G       |                 | Potencialmente patogena     | c.385G>T     | V129L           | Patogena                | c.563A>G        | D188G           | Patogena                |            |                 |                         |
| c.179-1G>T       |                 | Potencialmente patogena     | c.385G>A     | V129M           | Potencialmente patogena | c.566_571delins | K189fs          | Potencialmente patogena |            |                 |                         |
|                  |                 |                             | c.392del     | P131fs          | Potencialmente patogena | c.580C>T        | R194*           | Patogena                |            |                 |                         |

## 10.4 Pacientes reportados con PMM2-CDG, variantes y estrategia de diagnóstico

ND: No descrito, TIEF: Isoelectroenfoco de Transferrina

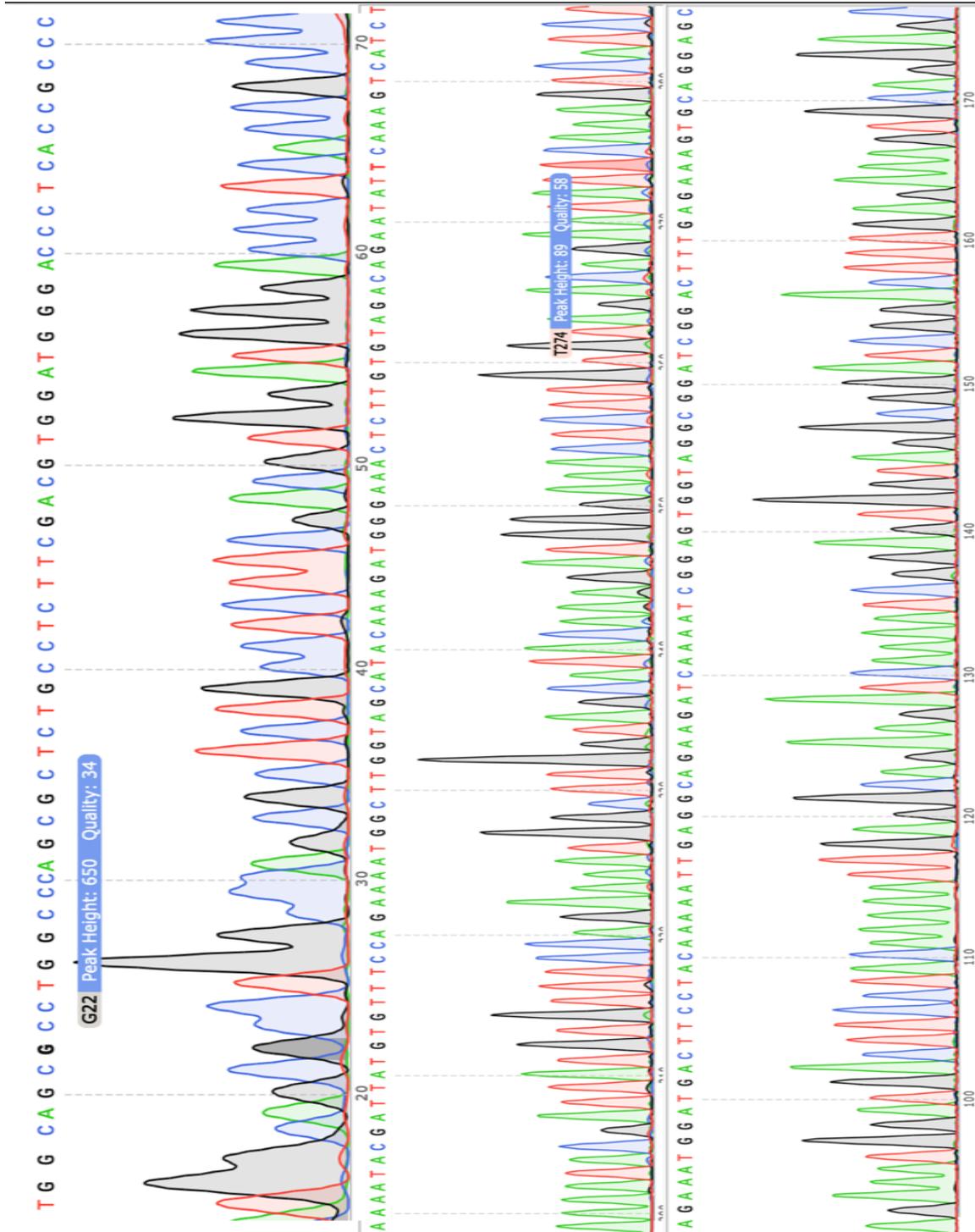
| Mutaciones y estrategias para su diagnóstico |  |   |                                   |
|--|--|---|-----------------------------------|
| Casos reportados                             | Mutaciones   | Estrategia  | Autor                             |
| 96 pacientes de Francia                      | N65Y, L32R, R141H, E139K, V129M, C9Y, V231M, A108V, G214S, C241S.  | TIEF y secuenciación de ADN genómico.   | Manuel Schiff et al., 2017.       |
| 26 pacientes de Francia                      | I132T/R123Q, R141H/I132T, T226S/R141H, R141H/C241S, A108V/R141H, F157S/C241S, R141H/I153T, R141H/E139K, F119L/R141H, P113L/R141H, V129M/R141H, D65Y/R141H, V231M/R141H.  | TIEF y secuenciación de ADN genómico.   | P. de Lonlay et al., 2001         |
| 19 pacientes de Estonia                      | R141H/V231M, R239W/V231M, R123QV231M, V67M, T237R.   | TIEF y secuenciación masiva   | Mari-Anne Vais et al., 2017       |
| 6 pacientes con diferente origen             | V231M/R239W, C241S/R141H, I120C/G228C  | TIEF, secuenciación de segunda generación, ensayos enzimáticos y secuenciación en ADN genómico. | Mari-Anne Vais et al., 2016       |
| 29 pacientes de Francia                      | F157S/C241S, R141H/C41S, R141H/C9Y, R141H/F19L, R141H/I153T, R141H/P113L, R141H/G214S, R141H/Q177H, R141H/V129M, R141H/E139K, R141H/T226S, R141H/S103F, R141H/I132T, I132T/P20S, R141H/A108V, A108V/R123Q, G255A/E139K, T237R/R162W. | TIEF, ensayos enzimáticos, secuenciación de ADNng por exones                                    | Marié-Lorraine Monin et al., 2014 |
| ND   | V44A/R141H.  | TIEF, secuenciación de ADNng, ensayos enzimáticos y Westem-blot.                                | Els Schollen et al., 2007         |
| 37 pacientes de Italia                       | R141H/N216I, V129M/R141H, V231M/R141H, I132T/R141H, G15E/D223N, D223N/R141H, V231M/F157S, L193V/T237R, I132T/I132T.  | TIEF/HPLC, secuenciación de ANDg y ensayos enzimáticos.   | Rita Barone et al., 2014          |
| 1 paciente                                   | N216I  | TIEF, ensayos enzimáticos, secuenciación de ADNng por exones.                                   | Luitgard Neuman et al., 2003      |
| 3 pacientes de Australia                     | R141H/L32R   | TIEF ensayos enzimáticos, secuenciación de ADNng por exones.                                    | D. Coman et al., 2006             |
| 1 paciente de Malasia                        | R141H/F206L  | TIEF, ensayos enzimáticos, secuenciación de ADNng por exones                                    | Thong et al., 2008                |
| 65 familias de Escandinavia                  | ND   | TIEF, secuenciación de ADNng, ensayos enzimáticos y de restricción.                             | Cecilia Bjursell et al., 1998     |
| 6 pacientes                                  | Y205C/R123X  | TIEF y secuenciación de ADN genómico.   | Vuillaumier-Barrot et al., 2011   |
| 2 pacientes de Italia                        | V129M/R141H  | TIEF y secuenciación de ADN genómico.   | Rita Barone et al., 2008          |
| 50 pacientes de Bélgica                      | I132T/R123Q, R141H/I132T, T226S/R141H, R141H/C241S, A108V/R141H, F157S/C241S, R141H/I153T, R141H/E139K, F119L/R141H, P113L/R141H, V129M/R141H, D65Y/R141H, V231M/R141H, F119L/F19L, D65Y/D65Y.                                       | TIEF, ensayos enzimáticos y secuenciación de ADNng  | S. Grunewald et al., 2001         |
| 2 pacientes de China                         | I132T/L82V   | TIEF y secuenciación exómica.   | Zheng Zhang et al., 2019          |
| 16 pacientes de diferente origen             | R141H/N216I, V129M/R162W, F119L/R162W, P131A/R162W, R141H/T237M, R141H/V231M, A108V/R141H, F119L/R141H, R141H/R162W, Y106C/R141H.  | TIEF y SSCP (polimorfismo de conformación de cadena simple)                                     | Gert Matthijs et al., 1997        |

ND: No descrito, TIEF: Isoelectroenfoque de Transferrina

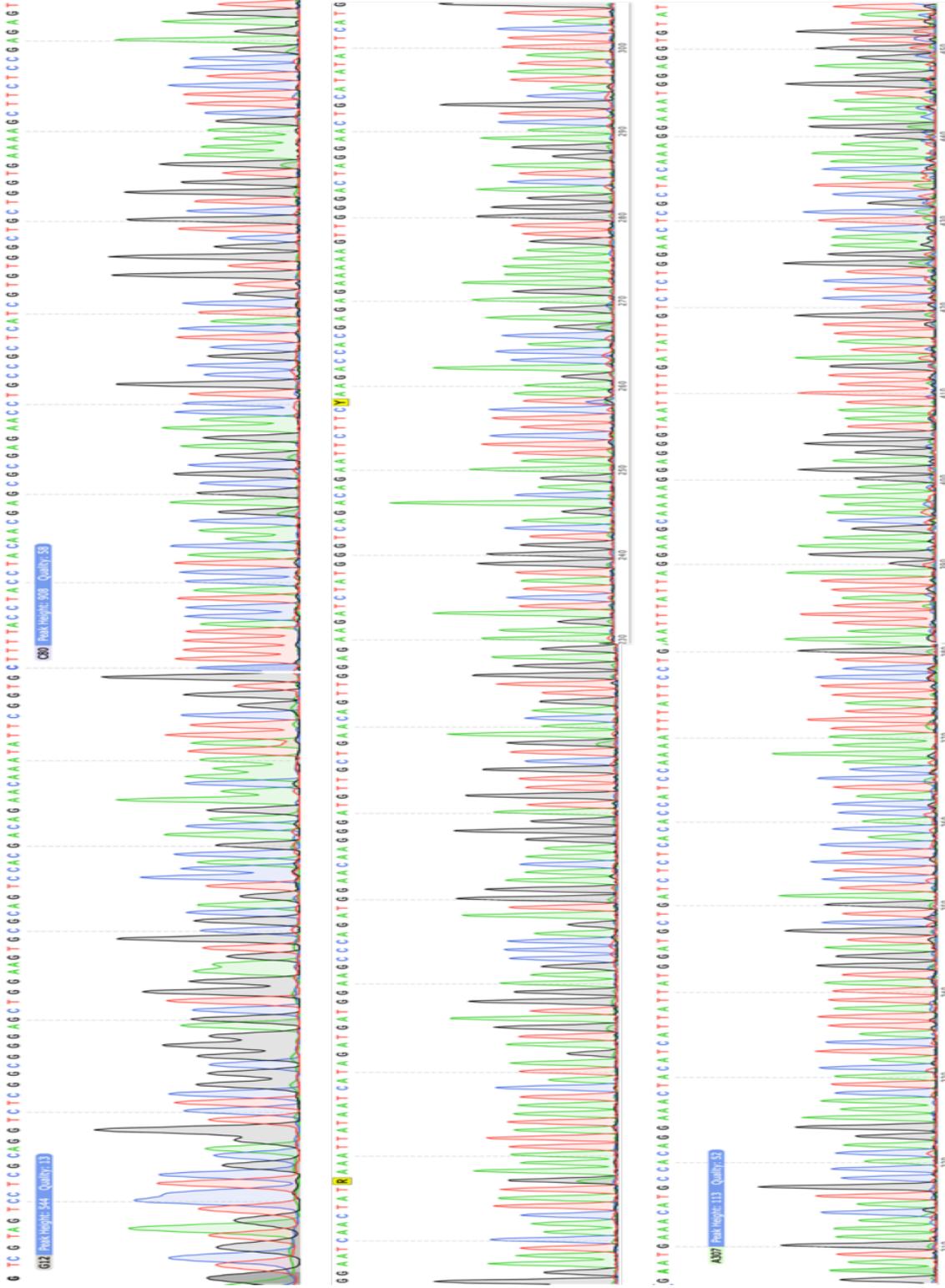
| Mutaciones y estrategias para su diagnóstico |  |  |                                 |
|--|--|--|---------------------------------|
| Casos reportados                             | Mutaciones   | Estrategia   | Autor                           |
| 61 pacientes de Escandinavia                 | C9Y, F11C, V67M, P113L, G117R, F119L, R123Q, V129M, R141H, F172V, G175R, F183S, D185G, C192G, N216S, D217E, G228R, V231M, T237R.   | TIEF, ensayos enzimáticos, secuenciación de ADNg por exones                          | Cecilia Bjursell et al., 2000   |
| 26 pacientes de España                       | R141H/C41S, Y64C/Y64C, R141H/Y64C, R123Q/P113L, V129/T237M, R141H/T237M, F157S/D65Y, R123Q/V44A, Y76C/F207S, R141H/P113L, F207S/N216I, E93A/ R141H, R123Q/T226S.   | TIEF, ensayos enzimáticos, secuenciación de ADNg por exones                          | P. Briones et al., 2002         |
| 2 pacientes de China                         | G186R  | TIEF, ensayos enzimáticos, secuenciación exómic y de ADNg por exones                 | Tianliu Peng et al., 2020       |
| 2 pacientes de Francia                       | E139K  | TIEF, secuenciación de ADNg, ensayos enzimáticos y de restricción.                   | Vuillaumier-Barrot et al., 1999 |
| 4 pacientes de Italia                        | L32R/R141H, T237R/L32R   | TIEF/HPLC, ensayos enzimáticos y secuenciación de ADNg                               | Barbara Bartot et al., 2013     |
| 1 paciente de Asia                           | L104V  | TIEF, ensayos enzimáticos, secuenciación de ADNg por mitades y secuenciación de ADNg | Vibeke Westphal et al., 2001    |
| 11 pacientes de Turquía                      | R141H/V231M, V231M/V231M, R141H/N216I, I132T/R141H, V129M/V129M.   | TIEF y secuenciación masiva  | Yilmaz Yildiz et al., 2020      |
| 22 pacientes de España                       | IVS3-1G>C/L32R, R141H/V44A, F207S/V44A, V44A/D65Y, R141H/D65Y, IVS7-9 T>G/D65Y, P113L/P113L, D209G/P113L, R141H/R162W, F157S/R162W, R123Q/F183S, R141H/T226S, IVS7-9 T>G/T237M, R123Q/C241S, R141H/C41S. | TIEF, ensayos enzimáticos, secuenciación de ADNg por exones                          | Ana Isabel Vega et al., 2011    |
| 2 pacientes de España                        | C241S/R123Q, C241S/F157S   | TIEF, ensayos enzimáticos, secuenciación de ADNg por exones                          | M. Casado et al., 2012          |
| 3 pacientes de Canadá                        | C241S/R141H  | TIEF y secuenciación exómic  | Anne Noreau et al., 2014        |
| 6 pacientes de Japón                         | F144L, Y229S, R238P.   | TIEF, ensayos enzimáticos, secuenciación de ADNg por mitades y secuenciación de ADNg | I. Kondo et al., 1999           |
| 2 pacientes de Alemania                      | Inserción en el exón 2 161-162/V129L   | TIEF y secuenciación masiva  | Donald Wurm et al., 2007        |
| 33 pacientes de Francia                      | F157S/C241S, R141H/C41S, R141H/F199L, R141H/I153T, R141H/P113L, R141H/G214S, R141H/E139K, R141H/T226S, R141H/S103F, R141H/I132T, I132T/P20S, R141H/A108V, G255A/E139K, T237R/R162W.                      | TIEF y secuenciación exómic  | Xiang Yang et al., 2019         |
| 2 pacientes de Francia                       | IVS7-23 A>G/R141H, IVS2-25 A>G/D65Y  | TIEF y secuenciación de ADNg   | Vuillaumier-Barrot et al., 2006 |
| 4 pacientes de España                        | V231M/IVS7-15479 C>T, D65Y/IVS7-9 T>G, T237M/IVS7-9 T>G, L32R/ IVS3-1G>C   | TIEF, ensayos enzimáticos, secuenciación de ADNg por mitades y secuenciación de ADNg | Ana Isabel Vega et al., 2008    |

### 10.5 Cromatogramas de la secuenciación de Sanger del paciente 2

Cromatograma resultante de la secuenciación del segundo paciente con el oligonucleótido PMM2s:

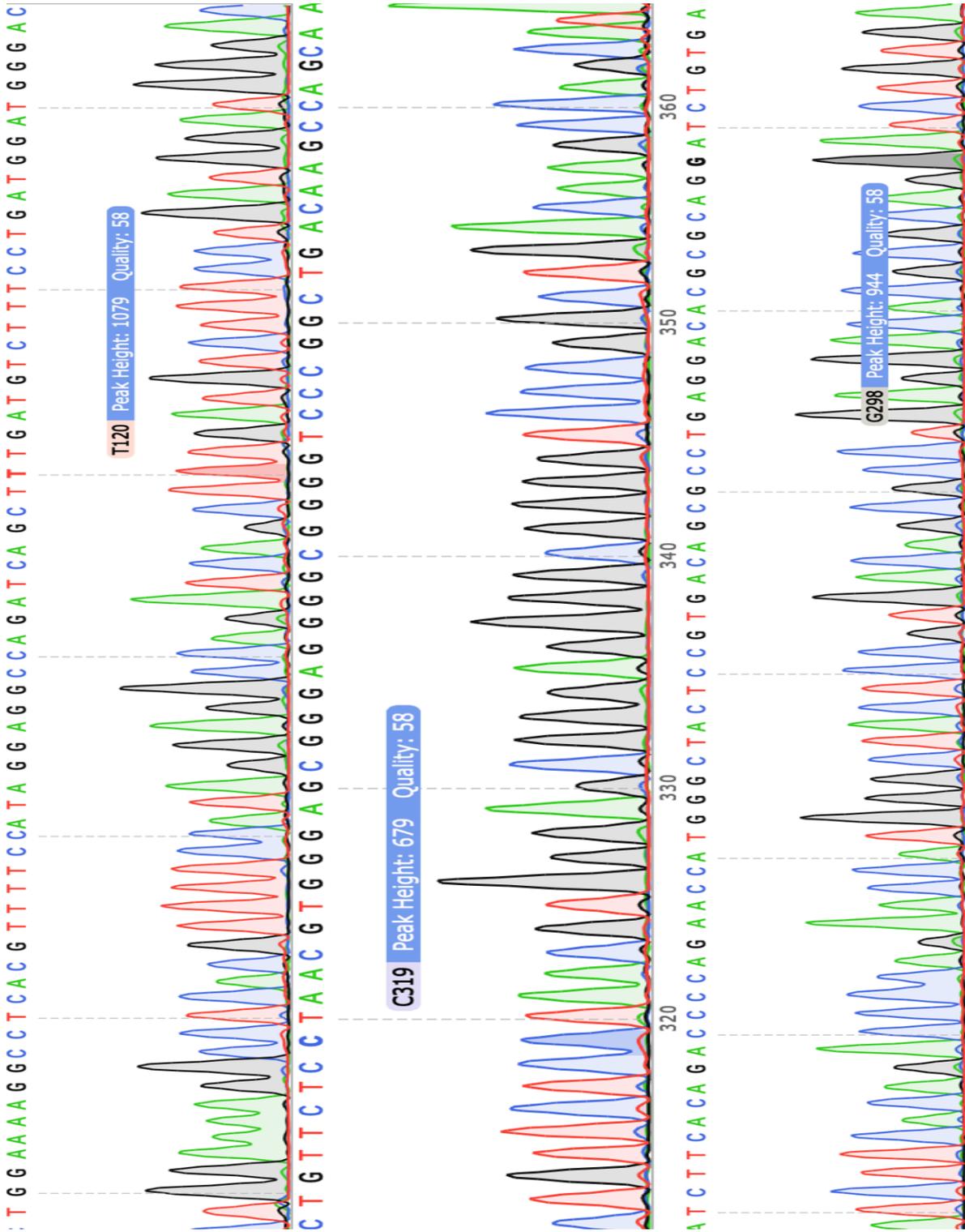


Cromatograma resultante de la secuenciación del segundo paciente con el oligonucleótido PMM2as:



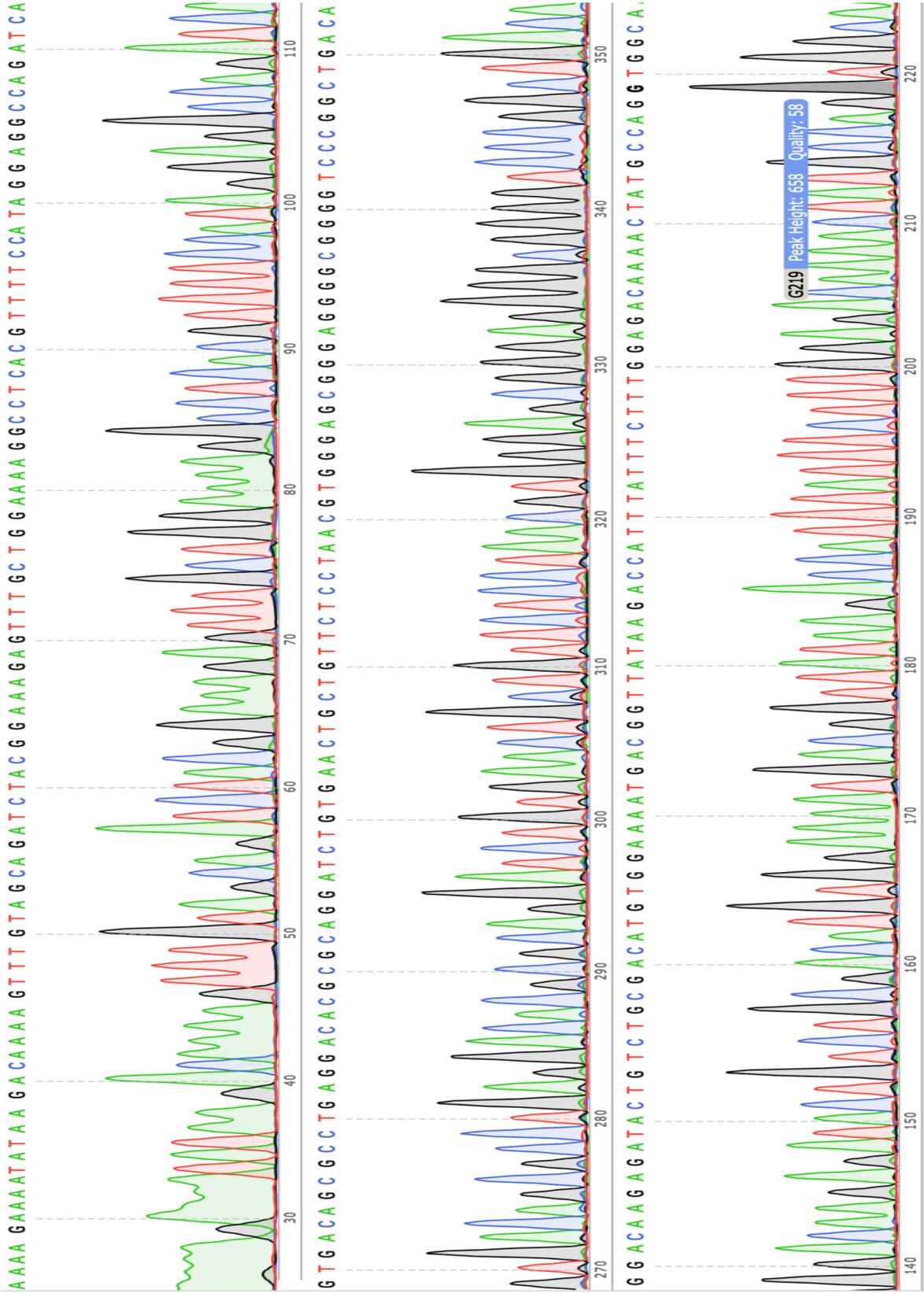
### 10.6 Cromatogramas de la secuenciación de Sanger del paciente 3 de *PMM2*

Cromatograma resultante de la secuenciación del tercer paciente con el oligonucleótido



PMM2s:

Cromatograma resultante de la secuenciación del tercer paciente con el oligonucleótido PMM2as:



## 10.7 Preparación de soluciones para realizar electroforesis en gel de agarosa.

### 1. Buffer TAE 50X (200mL)

- 48.04 g Tris Base
- 11.42 ml CH<sub>3</sub>COOH
- 20 ml EDTA 0.5M

### 2. EDTA 0.5M (200mL)

- 73.06 g EDTA
- 500 ml H<sub>2</sub>O
- Ajustar pH=8

### 3. Buffer de carga 6X

- 10mM Tris-HCl pH=7.6
- 0.03% Bromofenol azul
- 60% Glicerol
- 60 µL de EDTA 0.5 M

## 11.0 Publicaciones durante la estancia de maestría

### Publicaciones relacionadas al trabajo de la maestría

- 1) González-Domínguez, C. A., Raya-Trigueros, A., Manrique-Hernández, S., González Jaimes, A., Salinas-Marín, R., Molina-Garay, C., Carrillo-Sánchez, K., Flores-Lagunes, L. L., Jiménez-Olivares, M., Dehesa-Caballero, C., Alaez-Versón, C., & Martínez-Duncker, I. (2020). Identification through exome sequencing of the first PMM2-CDG individual of Mexican mestizo origin. *Molecular genetics and metabolism reports*, 25, 100637. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2020.100637>
- 2) González-Domínguez, C. A., Villarroel, C. E., Rodríguez-Morales, M., Manrique-Hernández, S., González-Jaimes, A., Olvera-Rodriguez, F., Beutelspacher, K., Molina-Garay, C., Carrillo-Sánchez, K., Flores-Lagunes, L. L., Jiménez-Olivares, M., Muñoz-Rivas, A., Cruz-Muñoz, M. E., Mora-Montes, H. M., Salinas-Marín, R., Alaez-Verson, C., & Martínez-Duncker, I. (2021). Non-functional alternative splicing caused by a Latino pathogenic variant in a case of PMM2-CDG. *Molecular genetics and metabolism reports*, 28, 100781. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2021.100781>
- 3) González-Domínguez, C. A., Fiesco-Roa, M. O., Gómez-Carmona, S., Kleinert-Altamirano, A. P. I., He, M., Daniel, E. J. P., Raymond, K. M., Abreu-González, M., Manrique-Hernández, S., González-Jaimes, A., Salinas-Marín, R., Molina-Garay, C., Carrillo-Sánchez, K., Flores-Lagunes, L. L., Jiménez-Olivares, M., Muñoz-Rivas, A., Cruz-Muñoz, M. E., Ruíz-García, M., Freeze, H. H., ... Martínez-Duncker, I. (2021). ALG1-CDG Caused by Non-functional Alternative Splicing Involving a Novel Pathogenic Complex Allele. *Frontiers in Genetics*, 12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.744884>

### Otras publicaciones

- 1) González-Domínguez C. A., López-Valdez Jaime, Martínez-Duncker Iván, Salinas-Marín Roberta. (2020). Análisis de la mutación c.187 C>T en el gen ATP6V0A2 mediante PCR-ARMS. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 23, 9.