



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
División de Estudios de Posgrado

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y
NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN



**Trastornos de la N-glicosilación en pacientes adultos
con afectación del SNC de etiología desconocida
mediante el estudio de Isoelectroenfoque de
Transferrina.**

T E S I S

PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE LA
Especialidad en:
GENÉTICA MÉDICA

PRESENTA

Gabriela Denisse Mata Salgado

TUTOR

Dr. Juan José Morales Suárez

COTUTORES

Dr. Iván Martínez Duncker

Q.F.B. María Aurelia López Hernández

Ciudad de México, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Esta nota de agradecimiento está dirigida a todos los que fueron un apoyo considerable e imprescindible en el transcurso de la especialidad y para el desarrollo posterior de esta tesis. Primeramente, a mis padres que fueron el apoyo moral y espiritual necesario para continuar cuando las dificultades se presentaron. Su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo y valentía.

Agradezco grandemente al equipo de profesores (Cristy, Virginia, Renata, Eugenia, Luis, Leo) que fueron guías y soporte intelectual a través de estos tres años de residencia, sin ellos esto no hubiese podido ser posible. Gracias por su esfuerzo, paciencia, y consideración.

A mi hermana Fernanda quien me enseñó a su corta edad que los sueños se hacen realidad, que cuando a algo le pones el corazón y la dedicación las cosas suceden, que siempre hay tiempo para un café y que la vida está llena de cosas inesperadas, pero siempre se sale bien librado si pones el alma.

A mi hermana Paloma que cada día me enseña que los miedos solo sirven cuando te impulsan hacia adelante, a quien la incomodidad la ha llevado a desafiarse, gracias por enseñarme que los cambios son una constante en la vida, que cada uno decide que tomar de las experiencias y que, aunque sé que el camino no ha sido fácil ni será fácil, siempre sabes sacar el mejor provecho.

A mi hermana Karla que siempre me ha acompañado en cada paso que he dado, cuando las cosas se han puesto difíciles y cuando no tanto, gracias por aconsejarme, por ser mi mejor amiga y mi hermana, porque cuando no veo más allá de mi nariz siempre me muestra un mundo de posibilidades, me ha enseñado el valor de compartir y que la generosidad, y la honestidad son valores imprescindibles en la vida.

Quiero agradecerle a la Dra. Jazmín Arteaga por todo el apoyo durante estos tres años quien además de brindarme sus conocimientos y experiencias profesionales desde el primer momento, me ha sabido guiar y a quien tengo profundo respeto y admiración, gracias Dra. por sus múltiples palabras de aliento, cuando más las necesite; por estar ahí cuando mis horas de trabajo se hacían confusas, por confiar, y creer en mí. Muchas gracias.

Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento a la Q.F.B María López por su importante aporte y participación activa en el desarrollo de esta tesis. Debo destacar, por encima de todo, su disponibilidad y paciencia, no cabe duda de que su participación ha enriquecido el trabajo realizado. Gracias por compartir tus conocimientos de manera profesional, por tu dedicación perseverancia y tolerancia. Gracias por tu cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento.

Debo agradecer de manera especial y sincera al Dr. Juan José Morales por aceptarme para realizar esta tesis bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación. Gracias Dr. por escuchar y ordenar, pacientemente, mis enmarañadas ideas.

Sin duda, el impulso en este trabajo también fue motivado por el Dr. Iván Duncker, a quien antes del presente trabajo ya tenía profunda admiración y que el colaborar juntos genero en mí, más inquietudes y más preguntas que me han motivado seguir este camino, gracias Dr. por escucharme y por confiar, tener la mejor disposición y siempre guiar mis pasos.

Al Dr. Osvaldo Mutchinick, usted formó parte importante de esta historia con sus aportes profesionales que lo caracterizan. Sus palabras fueron sabias, sus conocimientos rigurosos y precisos.

Así mismo, les quiero agradecer a todos y cada uno de mis compañeros de la especialidad, sin duda gracias a Luis, Gabriela, Tamara y también a Quetzali (estudiante de doctorado) que se convirtieron en mi apoyo, y en mis amigos, los admiro por sus ganas de salir siempre adelante, cada día aprendo algo nuevo de ustedes, aunque a veces diferimos en opinión o maneras de ver la vida sé que siempre estarán para mí y siempre estaré para Uds., los admiro mucho.

No puedo concluir estos agradecimientos sin mencionar a mis amigos (Mafer, Oliver, Fernando, Dalia, Cristian) esta pandemia solo reforzó nuestra amistad, a pesar de no poder vernos como hubiéramos querido, sabíamos que estábamos del otro lado del teléfono, siempre disponibles, gracias por enseñarme a detener el mundo un poco para poder ir por café o tacos. No fueron años fáciles, pero siempre nos tuvimos.

INDICE

1.- <u>RESUMEN</u>	5
2.- <u>ABREVIATURAS</u>	6
3.- <u>MARCO TEÓRICO</u>	7
4.- <u>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</u>	29
5.- <u>JUSTIFICACIÓN</u>	30
6.- <u>HIPÓTESIS</u>	31
7.- <u>OBJETIVO GENERAL</u>	31
8.- <u>METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN</u>	32
9.- <u>CONDICIONES DE BIOSEGURIDAD</u>	37
10.- <u>RECURSOS</u>	38
11.- <u>RESULTADOS</u>	40
12.- <u>DISCUSIÓN</u>	47
13.- <u>CONCLUSIÓN</u>	53
14.- <u>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</u>	55

1.-RESUMEN

Antecedentes: La glicosilación es la modificación postraduccional más común de proteínas, su papel biológico es crucial en los procesos de desarrollo, crecimiento y funcionamiento del organismo. La glicosilación incorrecta de las proteínas origina un grupo de enfermedades metabólicas llamadas desórdenes congénitos de la glicosilación (DCG). El grupo diagnosticado con mayor frecuencia son los desórdenes de la N-glicosilación. En donde la manifestación clínica principal es la afección en el SNC (retraso psicomotor/trastornos cognitivos, epilepsia, hipotonía, ataxia, eventos similares a accidentes cerebrovasculares).

Métodos: Es un estudio ambispectivo, observacional y descriptivo. Incluyó a pacientes entre 18 y 75 años de edad, de sexo indistinto vistos en la consulta de genética de este Instituto, del año 2015 a 2020 que presentaron afección neurológica y que además manifestaron alteraciones en uno o más sistemas como el neuromuscular, endocrinológico, hematológico, inmunológico, gastrointestinal, óseo, renal, así como malformaciones congénitas. En los pacientes que cumplieron criterios clínicos se realizó Isoelectroenfoque de Transferrina sérica (IEFTf) en el Centro de Investigación en Dinámica Celular de la UAEM.

Resultados: Se evaluó a 40 pacientes, 36 no relacionados con alteración en SNC y uno o más sistemas involucrados sin etiología conocida, para la detección de hipoglicosilación proteica mediante el Isoelectroenfoque de Transferrina sérica (IEFTf). Se identificaron inicialmente a dos pacientes, y debido a la historia familiar de la paciente 9 se realizó estudio de extensión a cuatro hermanos, resultando en seis pacientes con alteraciones en el IEFTf, representando el 16.6%, el cual es mayor a lo reportado en la literatura de estudios de tamizaje en pacientes pediátricos.

Conclusiones: Actualmente, a nuestro conocimiento no existen trabajos previos de búsqueda dirigida de DCG en pacientes adultos con las características establecidas en este estudio. Este estudio nos ayudó a identificar dos casos con IEFTf anormal sugerente de un DCG, que no habían sido diagnosticados anteriormente. Proponemos un abordaje diagnóstico para pacientes con alteración multisistémica sin etiología conocida con sospecha de un DCG.

2.-ABREVIATURAS

SNC: Sistema Nervioso Central

ADN: Acido Desoxirribonucleico

DCG: Desordenes Congénitos de la Glicosilación

RE: Retículo Endoplásmico

UDP: Uridina Difosfato

Man: Manosa

Glc: Glucosa

GlcNAc: N-acetilglucosamina

OST: Oligosacariltransferasa

IEF: Isoelectroenfoque

Tf: Transferrina Sérica

HPLC: Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento

CZE: Electroforesis Capilar de Zona

MS: Espectrometría de Masas

pI: Punto Isoeléctrico

3.- MARCO TEÓRICO

Inicialmente los carbohidratos fueron reconocidos como una fuente de producción de energía y componentes estructurales de las células, dejando a un lado su papel clave en otros procesos. Actualmente se reconoce su importancia en numerosos procesos metabólicos y cruciales para el desarrollo, crecimiento, mantenimiento y supervivencia del organismo (Varki y Gagneux, 2017).

Los carbohidratos son biomoléculas compuestas por hidrogeno, carbono y oxígeno en una proporción de 1:2:1, que estructuralmente están compuestos por un grupo carbonilo al final de la cadena de carbonos (aldehído) o en un carbono interno (cetona), denominándose aldosas y cetonas respectivamente, teniendo la capacidad de ciclación cuando están formados por más de cuatro átomos de carbono, al producirse ciclación, el carbono carbonilo se transforma en un nuevo centro quiral denominándose carbono anomérico. La posición del hidroxilo del carbono anomérico se pueden presentar en dos tipos de conformación la α , si el hidroxilo del carbono anomérico está por debajo del anillo ciclado y la β , si el hidroxilo se encuentre por encima, estas conjugaciones estereoquímicas α o β , crean una mayor diversidad entre los glucanos generando así maneras alteras de unión de un monosacárido con el siguiente, a este enlace entre el carbono anomérico de un monosacárido y un grupo hidroxilo del otro se denomina enlace glucosídico.

De acuerdo al grado de polimerización los carbohidratos se pueden clasificar en monosacáridos (monómeros), disacáridos (la unión de dos monosacáridos) y polisacáridos (unión a un gran número de monosacáridos unidos por enlaces glucosídicos). Estos últimos a su vez se dividen en homoglicanos, formados por un solo tipo de monosacárido y heteroglicanos que contiene dos o más tipos de monosacáridos. Los principales heteroglicanos hallados en mamíferos son heteropolisacáridos con enlaces N y con enlaces O unidos a proteínas, los glucosaminoglicanos de la matriz extracelular, los componentes de los glucolípidos y los de anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI; Seeberger, 2017).

La unión de carbohidratos a proteínas o lípidos se realiza gracias a un proceso denominado reacción de glicosilación, la cual está catalizada por las enzimas transferasas de glucosilo, que forman enlaces glucosídicos entre carbonos anoméricos de los glucanos y entre átomos de nitrógeno y oxígeno de otras macromoléculas, formando glucoconjugados.

La glicosilación es la modificación postraducciona l más común de las proteínas, considerándose como el nivel más informativo y final, después de la síntesis de ADN y proteínas, que combina el producto del genoma (proteínas) y los factores ambientales (como la glucosa y la fructosa provenientes de los alimentos) para aumentar la complejidad de las proteínas. Aunado a que no solo existe un único sitio de glicosilación, sino que pueden tener muchos sitios potenciales; por lo tanto, dentro de una proteína se pueden originar muchas moléculas glucosiladas, llamadas glicofomas (Van Scherpenzeel, Willems y Lefeber, 2016).

La glicosilación ha persistido a través de la evolución, no existe ninguna célula viva que carezca de glicanos en la superficie celular, por lo tanto, estos han sido tan esenciales para la vida como el código genético. La mayoría de las proteínas de los principales dominios de la vida (eubacterias, arqueas, bacterias y eucariontas) se encuentran glucosiladas, siendo clave en muchos procesos biológicos. Se estima que aproximadamente el 70-80% de las proteínas humanas están glucosiladas, lo que hace que la glicosilación sea una de las modificaciones pos-traduccionales más importantes en la especificidad de los organismos (Varki, 2011; Reily, Stewart, Renfrow y Novak, 2019).

Estructuralmente, la glicosilación es muy compleja debido al hecho de que puede haber heterogeneidad con respecto al sitio de unión del glucano (macroheterogeneidad) y con respecto a la estructura del glucano (microheterogeneidad), que a su vez permite que los glucoconjugados tengan diversas funciones, por ejemplo, los glucanos unidos a las moléculas de la matriz extracelular son importantes para la estructura, porosidad e integridad de los tejidos. Además, estas mismas moléculas, contienen sitios de unión para tipos específicos de glucanos que ayudan a la organización general de la matriz extracelular, y su ubicación externa también funciona como barrera evitando el reconocimiento de agentes patogénicos (Van Scherpenzeel, Willems y Lefeber, 2016).

Una importante función de los glucoconjugados (carbohidratos unidos a proteínas) es el reconocimiento de un patrón específico para la interacción célula-célula, para cada organismo. Esto permite, diferenciar a los glucanos propios; reconocimiento intrínseco, de los glucanos de organismos diferentes; reconocimiento extrínseco (virus, bacterias, parásitos y toxinas; Varki, 2017) protegiendo a la célula de organismos invasores. La característica de los glucanos para escapar de los patógenos radica en su capacidad de movimiento en solución acuosa, además de que las funciones de los glucanos no están mediadas por una única secuencia absolutamente necesaria, sino por un conjunto de estructuras de glucanos, que abarcan un continuo que puede llevar a cabo las funciones. Sería más fácil para un huésped escapar de un patógeno cambiando parcial o sutilmente su glicosilación (cambio en su ramificación, en el tipo de enlace o en el glucano terminal), sin alterar drásticamente su estructura (Varki, 2011).

Las uniones de carbohidratos a proteínas desempeñan funciones importantes en varios procesos biológicos, dentro de esta interacción podemos tener dos clases de conjugados carbohidrato-proteína: los proteoglicanos y las glicoproteínas. Los enlaces glucosídicos N y glucosídicos O son características estructurales en estas uniones (Reily, Stewart, Renfrow y Novak, 2019).

Los proteoglicanos se encuentran en las superficies celulares o se secretan dentro de la matriz extracelular, y funcionan como constituyentes estructurales de matrices complejas como cartílago, cerebro, discos intervertebrales, etc. Todos los proteoglicanos contienen cadenas de glucosaminoglucanos las cuales están unidas a moléculas proteínicas (conocidas como proteínas centrales) por enlaces N u O glucosídico. La diversidad de los proteoglicanos es consecuencia del número de diferentes proteínas centrales y la variedad de longitudes de las cadenas de carbohidratos (Lindahl, Couchman, Kimata y Esko, 2017).

Las glicoproteínas se definen como proteínas unidas covalentemente mediante enlaces N u O a carbohidratos, la ubicación externa de los glucanos en la mayoría de las glicoproteínas puede proporcionar un escudo, bloqueando la unión de anticuerpos e incluso

(en el caso de las mucinas) protegiendo superficies de tejidos de la unión microbiana. La composición de carbohidratos de las glucoproteínas varía del 1% a más del 85% del peso total. Aunque a veces se considera que las glucoproteínas incluyen a los proteoglicanos por razones estructurales se consideran de forma separada. En las glucoproteínas hay una ausencia relativa de ácidos urónicos, de grupo sulfato y de unidades disacáridos repetidas que son características de los proteoglicanos (Varki y Sharon, 2009).

La alteración en el proceso de formación de glucoconjugados (glicosilación) ocasiona alteraciones en la salud del individuo, produciendo un grupo de enfermedades denominadas desórdenes congénitos de la glicosilación (DCG), que son una familia de enfermedades metabólicas, fenotípicamente diversas, en las cuales se encuentran involucrados más de 130 genes (Francisco et. al., 2020).

La unión de los glucanos a proteínas o lípidos, permite clasificar a los DCG en cuatro grupos, (I) glicosilación ligada a N, (II) glicosilación ligada a O, (III) glicosilación múltiple combinada / ligada a N y O, (IV) defectos de biosíntesis de anclaje de lípidos y glucosilfosfatidilinositol (GPI; Lipiński y Tylki-Szymańska, 2021).

Sin embargo, los grupos que involucran la unión de glucanos a proteínas, N-glicosilación y la O-glicosilación, son los más ampliamente descritos en la literatura y se han encontrado más genes relacionados. Actualmente se informa que los desórdenes en la vía de la N-glicosilación son el tipo más común.

Se han descrito más de 60 genes relacionados con la alteración de la vía de N-glicosilación, la mayoría con un patrón de herencia autosómico recesivo, que pueden afectar solo esta vía y algunos de ellos la vía de la O-glicosilación (tipo combinada o mixta).

Tabla1. Listado de genes involucrados de la vía de la N-glicosilación

Genes de la vía de la N-glicosilación	Función	Mixta	Función
<i>DPAGT1</i>	GlcNAc-1-P Transferasa	PMM2	Conversión de Man-6-fosfato a Man-1-fosfato
<i>ALG1</i>	β -1,4 Manosiltransferasa	MPI	Conversión de Fruct-6-fosfato y Man-6-fosfato
<i>DPAGT1</i>	GlcNAc-1-P Transferasa	DHDDS	Difosfato de Deshidrodolicol Sintasa
<i>ALG2</i>	α -1,3 Manosiltransferasa	DOLK	Dolicol Quinasa
<i>ALG3</i>	α -1,3 Manosiltransferasa	SRD5A3	Poliprenol Reductasa
<i>ALG6</i>	α -1,3 Glucosiltransferasa	DPM1	Complejo Dol-P-Man Sintasa
<i>ALG8</i>	α -1,3 Glucosiltransferasa	DPM2	Complejo Dol-P-Man Sintasa
<i>ALG9</i>	α -1,2 Manosiltransferasa	DPM3	Complejo Dol-P-Man Sintasa
<i>ALG11</i>	α -1,2 Manosiltransferasa	GMPPA	GDP- manosa pirofosforilasa A
<i>ALG12</i>	α -1,6 Manosiltransferasa	GMPPB	GDP-manosa pirofosforilasa B
<i>ALG13</i>	UDP-GlcNAc Transferasa	FUCT1	Transportador de GDP-Fucosa
<i>ALG14</i>	UDP-GlcNAc Transferasa	B4GALT1	β -1,4 Galactosiltransferasa
<i>RFT1</i>	Man5GlcNAc2 Flippasa	SLC35A1	Transportador de ácido siálico-CMP
<i>MPDU1</i>	Manosa-P-Dolichol	SLC35A2	Transportador de UDP-Galactosa
<i>TUSC3</i>	Subunidad del complejo OST	SLC35A3	Transportador 3 UDP-GlcNAc
<i>MAGT1</i>	Subunidad del complejo OST	SLC39A8	Transportador de varios cationes divalentes
<i>DDOST</i>	Subunidad del complejo OST	COG1	Golgi-a-RE transporte retrógrado
<i>STT3A</i>	Subunidad del complejo OST	COG2	Golgi-a-RE transporte retrógrado
<i>STT3B</i>	Subunidad del complejo OST	COG4	Golgi-a-RE transporte retrógrado
<i>MGAT2</i>	GlcNAc Transferasa II	COG5	Golgi-a-RE transporte retrógrado
<i>MOGS</i>	α -1,2 Glucosidasa	COG6	Golgi-a-RE transporte retrógrado
<i>MAN1B1</i>	α -1,2 Manosidasa	COG7	Golgi-a-RE transporte retrógrado
<i>NGLY1</i>	N-Glicanasa-1	COG8	Golgi-a-RE transporte retrógrado
<i>PRKCSH</i>	Glucosidasa II Subunidad beta	ATP6V0A2	Regulador de pH de Golgi
		TMEM165	Regulador de Golgi pH y Homeostasis del calcio
		PGM1	Conversión reversible de Glc-1 Fosfato y fosfato Glc-6
		G6PC3	Glc-6 Fosfatasa, catalítica, 3
		G6PT1	Transporte de Glucosa-6-Fosfato
		ST3GAL3	N-acetilactosaminida α 2,3Sialiltransferasa

SEC23A	Tráfico de Golgi
SEC23B	Tráfico de Golgi
GMAP210	Estructura de Golgi
GFAT1	Glutamina-fructosa-6-fosfato transaminasa 1
SEC63	Tráfico de Golgi
SLC35C1	Transportador de GDP-fucosa 1
DHDDS	Subunidad del complejo dehidrodolicil difosfato Sintasa
PGM3	Fosfoglucomutasa 3

3.1.- Epidemiología

Se estima que entre 500 y 600 genes pueden estar involucrados en el proceso de glicosilación (Freeze, Eklund, Ng y Patterson, 2012), esto supondría una alta prevalencia de enfermedades ligadas a este proceso, sin embargo, actualmente se observa una baja prevalencia de estas enfermedades. La deficiencia de fosfomanomutasa 2 (PMM2-DCG) sigue siendo la entidad más común; desde su primera descripción (1980; Lipiński, Bogdańska y Tylki-Szymańska, 2021) con una prevalencia de hasta uno de cada 20.000 individuos (Pajusalu, Vals, Mihkla, Šamarina, Kahre y Õunap, 2021; Matthijs, Schollen, Bjursell, Erlandson, Freeze, Imtiaz y Winchester, 2000). Los DCG son enfermedades panétnicas que afecta a ambos sexos y que además presentan una amplia variabilidad genotípica (Chang, He y Lam, 2018).

La realización de estudios de secuenciación de exoma basados en poblaciones a gran escala y la incorporación en bases de datos de poblaciones hace que los datos de frecuencia de alelos estén disponibles. La prevalencia de la enfermedad se puede estimar cuando estos datos se combinan con bases de datos de clasificación de variantes clínicas (Landrum et al., 2018).

La prevalencia esperada y observada difieren, esto podría deberse a que algunos DCG en homocigosidad o heterocigosidad compuesta de algunas variantes pueden no ser viables, o a la subestimación de la enfermedad debido a los pacientes no diagnosticados por diferentes causas: fenotipos no reconocidos, resultados de detección negativos o acceso limitado a diferentes estudios metabólicos y moleculares.

Tabla 2. Prevalencia de DCG global o por gen PMM2 en distintas poblaciones estudiadas.

Gen	Prevalencia x 10,000	Población	Autores
<i>Global</i>	0.14	Saudí	Alsubhi, S., et al.
<i>Global</i>	10	Estadunidense de origen europeo	Freeze, H., et al.
<i>Global</i>	0.01-0.05	Europea	Péanne, R., et al.
<i>PMM2</i>	1	Holandesa / Flamenca	Schollen, E. et al.
<i>PMM2</i>	1.17	Danesa	Schollen, E. et al.
<i>PMM2</i>	1	Polaca	Schollen, E. et al.
<i>PMM2</i>	0.36	Europea no Finlandesa	Pajusalu, S. et al.
<i>PMM2</i>	0.53	Finlandesa	Pajusalu, S. et al.
<i>PMM2</i>	0.16	Estonia	Pajusalu, S. et al.
<i>PMM2</i>	0.03	Africana/ Afroamericana	Pajusalu, S. et al.
<i>PMM2</i>	0.15	Latina / Americana	Pajusalu, S. et al.
<i>PMM2</i>	0.06	Asiática oriental	Pajusalu, S. et al.
<i>PMM2</i>	0.02	Asiática del sur	Pajusalu, S. et al.
<i>PMM2</i>	0.50	Judía Ashkenazi	Pajusalu, S. et al.

3.2.-Clasificación de los DCG por alteración en la unión de glucanos a proteínas

La clasificación de estos desordenes congénitos de la glicosilación es de acuerdo a la manera en cómo la primera unidad de azúcar (monosacárido) se une a la proteína, a esta se le puede agregar un solo azúcar o una cadena de azúcar preformada.

Todas las vías requieren monosacáridos, que mediante una serie de eventos secuenciales se unan en las ubicaciones correctas del retículo endoplásmico (RE) o del aparato de Golgi para permitir la biosíntesis de glucanos (Freeze, Eklund, E, Ng, B. y Patterson, 2012).

3.3.- La vía de N-glicosilación

Muchas proteínas secretadas y ubicadas en la membrana celular, incluidos los factores de crecimiento y sus receptores, están N-glicosiladas. La glicosilación de proteínas ligadas a N, se encuentra presente en todos los dominios de la vida. El proceso se inicia con un glucano (cadenas ramificadas de residuos de azúcar unidos entre sí por enlaces α - y β -glucosídicos) sintetizado en un lípido encontrado en el RE, el poliprenol dolicol pirofosfato, esto se encuentra mediado por una serie de glucosiltransferasas que están codificadas por los genes *ALG* (glicosilación ligada a asparagina; Aebi, 2013; Stanley, Taniguchi y Aebi, 2017; Reily, Stewart, Renfrow y Novak, 2019).

Este glucano para su formación requiere azúcares activados que se proporcionan en el lado citosólico y luminal del RE en forma de UDP-GlcNAc, GDP-manosa (GDP-man) y UDP-glucosa (UDP-glc) originando así un oligosacárido conformado por tres glucosas, nueve manosas y dos N-acetilglucosamina (Glc3Man9GlcNAc2) la ramificación de este oligosacárido, permite múltiples rutas biosintéticas; sin embargo, se toma principalmente una ruta. Las deficiencias en los últimos pasos del ensamblaje del oligosacárido dan como resultado la acumulación de intermediarios biosintéticos y una hipoglicosilación de proteínas. Es esta hipoglicosilación la causa principal de las deficiencias graves observadas en pacientes con trastorno congénito de la glicosilación (llamado DCG tipo I; Aebi, 2013; Stanley, Taniguchi y Aebi, 2017; Reily, Stewart, Renfro y Novak, 2019).

Posteriormente se realiza transferencia en bloque de este oligosacárido a la asparagina que se encuentra dentro de una secuencia receptora específica (Asn-X-Ser / Thr) de la proteína naciente, de ahí el nombre de N-glucano, por la enzima oligosacariltransferasa (OST), para que en el retículo endoplásmico (RE) por escisión hidrolítica secuencial de los residuos terminales de glucosa por la glucosidasa I y II, este glucano se modifique. Para generar el N-glucano maduro, la glucosidasa I y II, elimina los dos primeros residuos de glucosa del oligosacárido Glc3Man9GlcNAc2 ligado a N. El GlcMan9GlcNAc2 resultante se une a la calreticulina o calnexina y la proteína se pliega (parcialmente), lo que es seguido por

la eliminación del último residuo de glucosa por la glucosidasa II (Stanley, Taniguchi y Aebi, 2017)

Después de esto, el N-glucano (Man₉GlcNAc₂) se reglucosila transitoriamente a GlcMan₉GlcNAc₂ mediante UDP-glucosa; para evitar más recortes de N-glucano, debido a que la glicoproteína aún no ha adoptado su estado de plegamiento adecuado. Una vez que la glucosidasa II ha eliminado el residuo de glucosa recién añadido, el oligosacárido Man₉GlcNAc₂ vuelve a entrar en el ciclo de reglucosilación-plegamiento-recorte hasta que se logra la conformación nativa de la N-glicoproteína. Una vez que la proteína se pliega correctamente, las chaperonas ya no se unen a la proteína y el oligosacárido Man₉GlcNAc₂ es procesado por una serie de manosidasas.

La eliminación de residuos de manosa de Man₉GlcNAc₂ se inicia en el RE. La manosidasa I del RE escinde el residuo terminal alfa_{1,2}-manosa de la rama central en el N-glucano generando un oligosacárido Man₈GlcNAc₂. Se espera que las mutaciones en las enzimas de recorte, en particular la glucosidasa I, II y manosidasa I del RE, den lugar a otro tipo de DCG, llamado DCG tipo II, ya que estas mutaciones afectarán la estructura del N-glucano después del ensamblaje y la transferencia a la proteína. Otras enfermedades de DCG tipo II no están directamente asociadas con mutaciones de las enzimas de recorte (o aún no se han encontrado), sino con proteínas de la maquinaria de transporte intercisternal del Aparato de Golgi.

La manosidasa I del Aparato de Golgi es distinta de la manosidasa I del RE en que escinde 3 residuos $\alpha_{1,2}$ del precursor de Man₈GlcNAc₂ para producir Man₅GlcNAc₂. El oligosacárido GINAcMan₅GlcNAc₂ resultante se alarga mediante la adición de derivados de azúcar como GalNAc o ácido siálico (N-glicanos híbridos), o se somete a la eliminación de 2 residuos de manosa adicionales mediante manosidasa II del Aparato de Golgi, que genera GlcNAcMan₃GINAc₂ ligado a N, siendo este el producto final del proceso de la N-glicosilación (Bieberich, 2014; Arigoni-Affolter, Scibona, Lin, Brühlmann, Souquet, Broly y Aebi, 2019).

3.4.- La vía de O-glicosilación

La biosíntesis de O-glicanos es más simple que la generación de oligosacáridos ligados a N (asparagina) ya que no se requiere un precursor de oligosacáridos ligados a lípidos para la transferencia a la proteína (Brockhausen, I, 2009).

El evento de inicio es la adición del monosacárido GalNAc (UDP-GalNAc) ligado al grupo hidroxilo (el enlace "O") de los residuos de serina o treonina catalizados por GalNAc transferasa (GalNAcT), muchos O-glicanos se extienden en cadenas largas con extremos variables, a menudo estructuras biantenarias. La mayoría de los O-glicanos contienen la estructura del subtipo core 1 formada por la adición de galactosa en un enlace β 1-3 a la GalNAc. La glicosiltransferasa responsable se conoce como Core 1 β 1-3 galactosiltransferasa (Core 1 GalT, Brockhausen, I, 2009).

Los O-glicanos de tipo core 2 se pueden generar mediante la adición de GlcNAc a GalNAc en un enlace β 1-6. La producción de Core 2 O-glicanos requiere la estructura core 1 como sustrato, por lo que la estructura Core 2 también contiene la estructura Core 1.

Los glicanos O-GalNAc core lineal 3 y core ramificado 4 se han encontrado solo en mucinas como bronquios, colon y glándulas salivales. Las estructuras core 5 a 8 tienen una ocurrencia extremadamente restringida. Se han informado mucinas con core 5 en meconio humano y tejido de adenocarcinoma intestinal, mientras que las estructuras core 6 se encuentran en mucina intestinal humana y mucina de quiste ovárico. Se ha informado de core 8 en la mucina respiratoria humana (Brockhausen, I, 2009).

La biosíntesis de O-glicanos se puede modificar y terminar con la adición de residuos de ácido siálico (Reily, Stewart, Renfrow y Novak, 2019).

3.5.- Manifestaciones Clínicas

Los DCG se presentan como enfermedades multisistémicas en los primeros años de vida, excepto en algunos pocos casos que afectan solo a un único órgano o sistema. Aunque los DCG son enfermedades multisistémicas, los síntomas se centran en la afección neurológica. La edad de aparición y la gravedad pueden variar desde letal en el periodo neonatal hasta poco sintomática en la edad adulta (Jaeken, 2013). La constelación de síntomas notificada con mayor frecuencia incluye retraso global en el desarrollo y/o discapacidad intelectual, hipotonía, estado hipercinetico, episodios similares a un accidente cerebrovascular, anomalías neurológicas congénitas y del desarrollo del SNC que se pueden dividir en malformaciones corticales, alteración en estructuras cerebrales de la línea media y anomalías de volumen, trastornos de mielinización y trombosis del seno venoso, por ejemplo, en el tipo más común *PMM2*-CDG se ha reportado que los pacientes presentan retraso psicomotor / discapacidad intelectual (DI) (90-96%), ataxia / síndrome cerebeloso (96%), atrofia cerebelosa (95%), hipotonía con hiporreflexia (92%), encefalopatía epiléptica (11-12%), hallazgos anormales en el electroencefalograma (69%).

No existe una revisión sistemática sobre la historia natural de este grupo de enfermedades a largo plazo, aun cuando muchos pacientes diagnosticados en el periodo pediátrico ya han alcanzado la adultez y además se ha observado que las características del adulto con DCG difieren significativamente del fenotipo pediátrico.

3.5.1.- Signos clínicos observados en pacientes adultos con DCG.

<i>Estudio</i>	Convulsiones	Retraso psicomotor	Hipotonía	Alteración hematológica (trombosis o hemorragias)	Factores de coagulación alterados	Movimientos anormales	Alteración ósea	Alteración en órganos de los sentidos	Alteración hepática	Otro	Gen
<i>Morava, E. et al.</i>	+	+	+	Hemorragias	NV	Ataxia	NV	Estrabismo Oftalmoplejía	NV	Microcefalia Neuropatía Periférica e Infecciones bacterianas recurrentes.	<i>ALG1</i>
<i>Cossins, J. et al.</i>	-	2/2	2/2	-	-	NV	NV	NV	-	Debilidad Muscular, Contracturas Articulares proximales y Laxitud articular distal	<i>ALG2</i>
<i>Riess, S. et al</i>	-	+	+	NV	NV	NV	NV	Estrabismo Nistagmo horizontal Atrofia óptica leve	NV	Diarrea Crónica	<i>ALG3</i>
<i>de la Morena et. al</i>	-	-	-	-	Déficit de antitrombina	-	escoliosis	NV	NV	CIA	<i>ALG 12</i>

<i>Cossins, J. et al.</i>	-	-	-	NV	NV	NV	NV	Estrabismo		2/2 Debilidad proximal estrabismo	<i>ALG14</i>
<i>de la Morena et. Al</i>	-	-	NV	Embolia Pulmonar	Déficit de FXI, antitrombina	-	NV	NV	-	Enfermedad de Crohn Fístulas perianales	<i>MPI</i>
<i>Mühlhausen et. al</i>	-	-	-	Trombosis	Déficit de antitrombina (AT), proteínas C, S y factor XI.	Ataxia	-	NV	-	-	<i>MPI</i>
<i>Medrano, C et. al</i>	-	+	-	Anemia hemolítica	Deficiencia de factor VIII	Estereotipias	NV	NV	Hepatomegalia	-	<i>MPI</i>
<i>Noman, K. et al.</i>	-	+	-	Deficiencia antitrombina III y proteína C	Trombosis	NV	NV	NV	Fibrosis hepática, Hepatomegalia	Hipoglucemia, Diarrea y Vómitos	<i>MPI</i>
<i>Liem, Y. S et. al</i>	-	+	-	Déficit de antitrombina	NV	NV	NV	NV	Fibrosis hepática	Diarrea, Várices Esofágicas y Fúndicas	<i>MPI</i>
<i>Schroeder, A. S. et al</i>	+	-	-	NV	Hemorragias gastrointestinal	NV	NV	NV	NV	Vómitos biliosos, Dolor Abdominal	<i>MPI</i>

<i>Krasnewich et al</i>	+	+	NV	EVC	NV	NV	Pectus excavatum, osteopenia	Miopía progresiva y Retinosis Pigmentaria	NV	Neuropatía periférica progresiva	<i>PMM2</i>
<i>Quelhas, D et al</i>	-	+	+	NV	Reducción de la actividad de la proteína C y S	NV	Alt. del sistema esquelético	NV	Transaminasas séricas elevadas	-	<i>PMM2</i>
<i>Miossec-Chauvet et al</i>		+	+	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	<i>PMM2</i>
<i>Briones et al</i>	-	+	-	NV	NV	Ataxia y Distonía	NV	NV	NV	Estrabismo	<i>PMM2</i>
<i>Coman, D et al.</i>	-	3/3	-	2/3 Déficit de Antitrombina III	1/3 Trombosis	3/3 Ataxia	3/3 Osteoporosis	NV	NV	2/3 Estrabismo 2/3 Hipogonadismo Hipergonadotrófico	<i>PMM2</i>
<i>Schoffer, K et al.</i>	-	+	+	Bajos niveles antitrombina III, proteína C, y factor XI	-	Ataxia espinocerebelosa	Osteopenia	Retinopatía	-	Vómitos recurrentes, Hipogonadismo, Reflejos tendinosos profundos disminuidos	<i>PMM2</i>
<i>Dorval, G et al</i>	-	-	-	-	NV	NV	NV	NV	-	Insuficiencia renal y Quistes	<i>PMM2</i>

<i>Dorval, G et al</i>	-	-	-	-	NV	NV	NV	NV	-	Insuficiencia Renal y Quistes	<i>PMM2</i>
<i>Di Rocco, M. et al.</i>	-	4/4	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>PMM2</i>
<i>Peng, T. et al.</i>	-	-	-	NV	NV	NV	NV	NV	NV	IOP	<i>PMM2</i>
<i>García-López, R et al.</i>	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	Infecciones	<i>PMM2</i>
<i>Pavone, L. et. Al</i>	1/3	2/3	3/3	NV	NV	3/3Ataxia	Escoliosis	3/3 Estrabismo	NV	Atrofia muscular generalizada	<i>PMM2</i>
<i>Van Tol et al.</i>	-	-	-	NV	NV	NV	NV	NV	Transaminasas elevadas	1/2 Cardiomiopatía dilatada 2/2 Miopatía, Hipotiroidismo	<i>DPM3</i>
<i>Svahn, J et al</i>	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	Debilidad proximal y Miocardiopatía dilatada	<i>DPM3</i>
<i>Belaya, K. et al.</i>	-	1/3	-	NV	NV	NV	2/3 Escoliosis	NV	NV	Trastornos miasténicos con Debilidad Muscular	<i>GMPPB</i>

<i>Sarkozy, A. et. Al.</i>	-	-	-	NV	NV	NV	NV	NV	NV	7/7 Debilidad Muscular proximal	<i>GMPPB</i>
<i>Cruz, P. M et. Al.</i>	-	+	-	NV	NV	NV	NV	NV	NV	Tolerancia limitada para caminar	<i>GMPPB</i>
<i>Belaya, K et. Al</i>	-	-	-	NV	NV	NV	2/4 Escoliosis	NV	NV	Debilidad Muscular	<i>DPAGT1</i>
<i>Kara, B et al</i>	-	+	-	-	-	Ataxia	NV	Afectación ocular grave, Nistagmo horizontal bilateral	NV	Dermatitis ictiosiforme infantil, Reflejos aumentados	<i>SRD5A3</i>

+; presente, .; ausente, NV; no fue valorado, EVC; evento vascular cerebral.

3.6.- Diagnostico

Se estima que el 94% de las personas con DCG tienen defectos de N-glicosilación, siendo los más frecuentes *ALG6*-DCG y *PMM2*-DCG, ambas enzimas son necesarias para los primeros pasos del ensamblaje de N-glucanos, por lo tanto, el isoelectroenfoque de la transferrina sérica (IEFTf), que es el método de elección para el diagnóstico de los trastornos de la N-glicosilación, es el primer estudio indicado cuando se sospecha de este grupo de enfermedades; el cual tiene como principio separar a las proteínas, en este caso a la transferrina (Tf) según su punto isoeléctrico.

Hasta ahora, varias técnicas de laboratorio se han utilizado para la separación y cuantificación de las isoformas de Tf suero, incluyendo la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), electroforesis capilar de zona (CZE), y espectrometría de masas (MS). Sin embargo, el IEFTf es el más utilizado para el diagnóstico y seguimiento de DCG y, por tanto, se considera el método de referencia.

La transferrina (Tf) es la proteína transportadora de hierro más importante y la glucoproteína unida a N más abundante. Tiene una masa molecular calculada de 79'570 Da y consta de 679 aminoácidos. Contiene el dominio N-terminal (aminoácidos 1-336) y el C-terminal (aminoácidos 337-679) estos dominios son globulares y cada uno incluye un sitio de unión al hierro.

La mayor parte de la transferrina sérica se encuentra en forma de tetrasialotransferrina porque contiene dos cadenas de oligosacáridos biantenarios unidas a N (Asn432 y Asn630), cada una de estas antenas presenta un ácido sálico terminal, algunas de estas cadenas de oligosacáridos pueden ser triantenarias o tetrantenarias, por lo cual pueden presentar más de cuatro ácidos siálicos finales.

Cualquier alteración en la síntesis o el procesamiento de los glucanos resulta en la alteración de las formas de sialotransferrina, que pueden ser detectadas por el

isoelectroenfoque de transferrina, ya que, al cambiar el contenido de ácido siálico final, cambia el punto isoelectrico de la proteína. El punto isoelectrico (pI) de una proteína es aquel pH para el cual la molécula tiene carga neta cero. Cuando las isoformas de la transferrina se encuentran completamente saturadas de hierro, para no alterar el punto isoelectrico, presentan valores pI entre aproximadamente 5,0 y 5,9. La principal isoforma de Tf en humanos consiste en cuatro residuos de ácidos siálico (tetrasiálo-Tf) con un pI de 5,4.

En individuos sanos la forma disialo-Tf representa <2%, la forma trisiálo-Tf aproximadamente el 4%, la isoformas tetrasiálo-Tf alrededor del 80%, la pentasiálo-Tf alrededor del 14% y hexasiálo-Tf alrededor del 1%.

Cuando tenemos algún defecto congénito de la glicosilación podemos encontrar; un patrón de tipo I, que se asocia con un aumento de las isoformas asialo y disialo-Tf, y una disminución de tetrasiálo-Tf, lo que indica un defecto de ensamblaje o transferencia del glucano unido a dolicol. Un patrón de tipo II se asocia con un aumento de las formas asialo-, monosialo-, disialo- y trisiálo-Tf, lo que indica un defecto de procesamiento después de la transferencia de glucanos en el RE o durante la glicosilación en el Aparato de Golgi (Scott, Gadomski, Kozicz, y Morava, 2014; Chang, He y Lam, 2018)

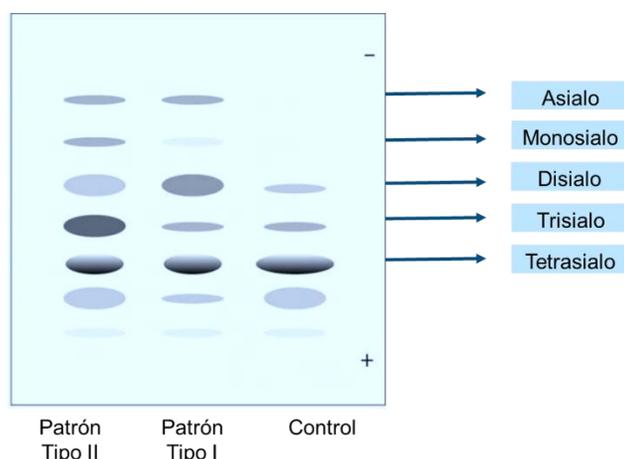


Figura 1. Representación del IEFTf con Patrón tipo I, II y control. En el patrón tipo I se observa un aumento de la intensidad de las bandas que representan las isoformas asialo y disialo-Tf, y una disminución de tetrasiálo-Tf. El Patrón tipo II, se muestra un aumento de intensidad de las bandas que representan las formas asialo-, monosialo-, disialo- y trisiálo-Tf, en referencia al control.

El patrón tipo II, se muestra un aumento de intensidad de las bandas que representan las formas asialo-, monosialo-, disialo- y trisiálo-Tf, en referencia al control.

Es importante señalar que varias condiciones además de DCG se asocian con alteraciones en los resultados de IEFTf, como galactosemia, intolerancia a la fructosa hereditaria, enfermedad hepática, abuso crónico de alcohol, infecciones por microorganismos productores de neuraminidasa, y polimorfismos de transferrina.

Tabla 3. Comparación de las alteraciones en el IEFTf en pacientes con patrones tipo I, II y pacientes con patrones por defectos secundarios de la glicosilación.

	<i>Asialidades</i>	<i>Monosialidades</i>	<i>Disialidades</i>	<i>Trisialidades</i>	<i>Tetrasialidades</i>	<i>Pentasialidades</i>
<i>Normal</i>	-	-	+	+	++++	++
<i>DCG-I</i>	++	-	++	+	+++	+
<i>DCG-II</i>	+	+	++	+++	++	+
<i>Ingestión de alcohol</i>	-	-	++	++	++	+
<i>Galactosemia</i>	++	-	+++	++	++	+
<i>Intolerancia a la fructosa</i>	++	-	++	++	+	++
<i>Cirrosis Biliar Primaria</i>	-	-	+	+	++++	+
<i>Colangitis extra-hepática</i>	-	-	+	+	++++	+
<i>Cirrosis hepática</i>	-	+	+	++++	+	+

Aunque la transferrina es un biomarcador de diagnóstico muy útil para la mayoría de los tipos de DCG con N-glicosilación deficiente, se conocen varios defectos en la vía de N-glicosilación con un perfil de transferrina normal, sin determinar aun este efecto (Van Scherpenzeel, Willems y Lefeber, 2016).

3.7.- Terapéutica.

A pesar de los avances en la identificación, el diagnóstico de los desórdenes congénitos de la glicosilación (DCG), y el aumento en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos de enfermedad en los diferentes sistemas, las opciones de tratamiento siguen siendo limitadas, con muy pocas opciones terapéuticas curativas, y la mayoría de las veces, centradas en las manifestaciones sintomáticas de la enfermedad (Park y Marquardt, 2021).

Existen varios enfoques terapéuticos que han dado resultados en algunos DCG como son la suplementación de monosacáridos externos, suplementación de cofactores esenciales,

ambos grupos de tratamiento se denominan como suplementación dietética, así como también la administración de chaperonas farmacológicas, y trasplante de órganos cuando se requiera.

Actualmente, la suplementación dietética sigue siendo una de las terapias más ampliamente aplicadas para DCG. La suplementación dietética se beneficia de la seguridad relativamente alta, y el bajo costo.

La estrategia terapéutica con la suplementación con un azúcar es proporcionar monosacáridos exógenos para evitar la alteración de la glicosilación mediante el reclutamiento de mecanismos complementarios o la regulación positiva de las vías afectadas (Verheijen, Tahata, Kozicz, Witters y Morava, 2020). La mayoría de las terapias de suplementación de sustrato propuestas se han administrado por vía oral y, por lo tanto, a veces se consideran terapias nutricionales

Sólo en cinco subtipos de DCG, *MPI*-DCG, *PGMI*-DCG, *SLC35C1*-DCG, *SLC35A2*-DCG, *TMEM165*-DCG, se ha aplicado un tratamiento con suplementación dietética que mejora la evolución clínica de los pacientes. (Ng, y Freeze, 2018).

MPI-DCG es causada por una mutación en la enzima citosólica fosfomanosa isomerasa (MPI). La enzima cataliza la conversión de fructosa-6-fosfato en manosa-6-fosfato y, por lo tanto, la enfermedad se caracteriza por una disminución de manosa-6-fosfato. La suplementación con manosa aumenta los niveles de manosa-6-fosfato y mejora las características clínicas en los pacientes, función endocrina y la coagulación y alivia la enteropatía, pero no siempre rescata la afectación hepática progresiva (Van Scherpenzeel, Willems y Lefeber, 2016).

SLC35C1-DCG, es un defecto en el transporte de GDP-fucosa al aparato de Golgi, en algunos casos, puede corregirse rápidamente proporcionando L-fucosa en la dieta, la suplementación con fucosa reduce las tasas de infección, mejora la expresión de los ligandos de selectina E y P y restaura el número de neutrófilos, mejora el desarrollo psicomotor. No todos los casos responden a la terapia con fucosa, lo que sugiere que ciertas mutaciones pueden actuar a través de la incapacidad de unirse directamente a la GDP-fucosa. La terapia

con fucosa debe monitorearse cuidadosamente debido al riesgo de reacciones autoinmunes y hemolíticas (Ng, B, y Freeze, 2018).

Se ha informado que tres de estos trastornos (*PGMI*-DCG, *SLC35A2*-DCG y *TMEM165*-DCG) muestran un beneficio clínico simplemente proporcionando el monosacárido, D-galactosa (Ng, B, y Freeze, 2018).

Dentro del grupo de suplementación dietética se encuentran también la suplementación con cofactores esenciales para las enzimas involucradas, como un medio para mejorar la glicosilación, la adición de cofactor tiene como objetivo mejorar la función de la proteína mediante la optimización de las condiciones de reacción.

SLC39A8-CDG está causado por mutaciones en el gen que codifica el canal catiónico divalente del mismo nombre, que actúa como el principal transportador celular de captación de manganeso, las mutaciones en *SLC39A8*, dan como resultado una depleción de manganeso intracelular que causan defectos de glicosilación con un patrón en el IEFTf de tipo II (Park, 2021).

Aunque no existen informes de efectos adversos de la sustitución del manganeso, parece prudente realizar una monitorización cuidadosa de los niveles de manganeso en sangre y estudios de resonancia magnética repetidos para evaluar posibles depósitos de manganeso en el cerebro (Park y Marquardt, 2021).

Las chaperonas farmacológicas son pequeñas moléculas que mejoran la conformación de proteínas mediante el secuestro de proteínas hacia los compartimentos RE y Aparato de Golgi para un correcto plegamiento y glicosilación de proteínas. Las chaperonas farmacológicas son eficaces en el rescate de la función enzimática en proteínas que albergan variantes patógenas de sentido erróneo que interrumpen el plegamiento causando una actividad enzimática reducida.

Además de los tratamientos que tienen como objetivo corregir o mejorar la función de la proteína afectada y, por lo tanto, llevar a una glicosilación normalizada, otros tratamientos tienen como objetivo corregir los síntomas o manifestaciones secundarias de la enfermedad (Park y Marquardt, 2021). Dentro de este grupo de tratamientos se encuentra el trasplante hepático utilizado para algunos DCG como *MPI*-DCG, así como *CCDC115*-DCG

y *ATP6API*-DCG, el trasplante de corazón utilizado como tratamiento en pacientes con *DOLK*-DCG, entre otros. (Verheijen, Tahata, Kozicz, Witters y Morava,2020). Actualmente no existe terapia de reemplazo enzimático (Park, y Marquardt, 2021; Verheijen, Tahata, Kozicz, Witters y Morava,2020).

Aunque la terapia con enzimas no lisosomales es teóricamente posible existen varias dificultades para la aplicación del reemplazo enzimático como un tratamiento en DCG. De estos, el direccionamiento del compartimento celular, los niveles bajos de enzima reemplazada, la captación celular de la enzima suplementada y el suministro a través de la barrera hematoencefálica siguen siendo los más problemáticos.

Se espera que la terapia enzimática y la terapia génica estén disponibles en los próximos años y amplíen nuestro enfoque terapéutico en los trastornos que involucran la glicosilación ligada a N.

4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La glicosilación ocurre en las células de todos los organismos, siendo esencial en los procesos de desarrollo, y crecimiento, es por eso que los pacientes con defectos en la glicosilación muestran presentaciones clínicas muy diversas, dada la amplia etiología clínica y genética de los DCG, el diagnóstico clínico se basa en un alto índice de sospecha de enfermedad multisistémica donde se involucre principalmente el sistema nervioso central.

A pesar de que estas enfermedades son poco frecuentes muchos de estos casos se encuentran subdiagnosticados, y siendo menos frecuente el diagnóstico en la adolescencia y en la edad adulta, debido a que los cuadros clínicos que se encuentran en el adulto son diferentes a los descritos en la edad pediátrica, así como el acceso a pruebas diagnósticas se encuentran limitados. La falta de criterios diagnósticos para realizar la búsqueda intencionada, los ha dejado como entidades de exclusión de otras enfermedades multisistémica.

En una búsqueda intencionada no encontramos reportes en la literatura de cohortes de pacientes adultos con desórdenes congénitos de la glicosilación con involucro multisistémico, esto se debe probablemente a la falta de criterios clínicos diagnósticos que hagan sospechar alguna de estas entidades. El realizar una búsqueda intencionada de casos con involucro del SNC y multisistémico aumentaría el número de casos observados y con esto mejorar la comprensión de la historia natural de este grupo de enfermedades, posibilitando la creación de criterios diagnósticos y ayudar a los médicos a su identificación.

5.- JUSTIFICACIÓN

Después de que en 1980 se describiera el primer defecto de la N-glicosilación, se han caracterizado más genes involucrados, es así, que para el año 2020 se identificaron más de 60 genes que tienen involucro directa o indirectamente en la vía de N-glicosilación.

Se estima conservadoramente que aproximadamente el 2% de todos los genes en el genoma humano codifican proteínas involucradas en varios aspectos de la glicosilación y que más de la mitad de todas las proteínas celulares están directamente glucosiladas de alguna forma.

Los DCG ahora están siendo reconocidos y estudiados en adultos, tanto de niños que han sobrevivido a las manifestaciones de la infancia y han pasado a la edad adulta, como en adultos con problemas cognitivos o discapacidad que no han sido previamente diagnosticados, por lo que realizar una búsqueda intencional de estos desordenes en pacientes con enfermedad multisistémica e involucro del Sistema Nervioso Central para su identificación, nos proporcionara datos clínicos indispensables para su caracterización y la identificación de nuevos genes involucrados en esta vía, además de proporcionar a los pacientes diagnosticados, en algunos casos, la posibilidad de tratamiento.

6.-HIPÓTESIS

El porcentaje de detección de desórdenes de la N-glicosilación por isoelectroenfoque de transferrina en pacientes con manifestaciones en Sistema Nerviosos Central (SNC) y extraneurológicas será del 4% al 6%, similar a lo reportado en la literatura en pacientes pediátricos.

7.-OBJETIVOS

7.1. Objetivo Principal:

Identificar en pacientes adultos con alteraciones del SNC de etiología desconocida que además presenten alteraciones de otros órganos y/o sistemas, perfiles de glicosilación tipo I y II, mediante isoelectroenfoque de transferrina, concordantes con desórdenes congénitos de la N- glicosilación.

7.2. Objetivos secundarios:

Describir las manifestaciones clínicas de pacientes con desordenes congénitos de la N- glicosilación.

Incluir al estudio familiares de primer grado en riesgo, en caso de un resultado positivo por Isoelectroenfoque de Transferrina.

Proponer abordaje diagnóstico en pacientes adultos con sospecha de Desordenes Congénitos de la Glicosilación.

8.- METODOLOGÍA

Diseño y tipo de estudio: se trata de un estudio transversal, ambispectivo, observacional.

Tiempo de ejecución: 10 meses a partir de su aprobación por el Comité de Ética Institucional.

Criterios de inclusión: Pacientes de cualquier sexo entre 18 y 75 años de edad vistos en la consulta de genética en el periodo comprendido de enero 2015 a diciembre 2020 que de acuerdo a la revisión del expediente clínico presentaron uno o más de los siguientes trastornos neurológicos sin un origen etiológico conocido:

- Hipotonía axial y/o retraso global del desarrollo.
- Anomalías congénitas y del desarrollo del SNC: malformaciones corticales (liscencefalia, polimicrogiria, paquigiria, displasia cortical, heterotopía neuronal) alteraciones en las estructuras cerebrales de la línea media (anomalías del cuerpo caloso, hipoplasia pontocerebelosa), anomalías de volumen (atrofia cerebral y/o cerebelosa, y/o ventriculomegalia y /o hidrocefalia) trastornos de la mielinización y trombosis del seno venoso.
- Convulsiones (ejemplo crisis tónico-clónicas, focales, de ausencia, migratorias, gelásticas, miotónicas, espasmos epilépticos) con o sin antecedente de crisis febriles de inicio.

Pacientes que además presentaron una o más de las siguientes manifestaciones extraneurológicas:

- Neuromusculares (distrofia muscular, polineuropatía, debilidad muscular)
- Endocrinológicas (diabetes mellitus tipo I y II, distiroidismo, ovarios poliquísticos, dislipidemia, hipogonadismo, hipoglicemia recurrente, lipodistrofias)
- Hematológicas (hemorragias o trombosis recurrentes, así como en casos donde se encuentren reportadas alteraciones en los factores de coagulación, tiempo parcial de tromboplastina y tiempo de protrombina, y conteo plaquetas)

- Inmunológicas (infecciones recurrentes, inmunodeficiencias, alteraciones del complemento).
- Gastrointestinales (fibrosis hepática, diarreas crónicas, gastroparesias, transaminasas elevadas sin origen conocido, hepatomegalia).
- Óseas (alteración en la densidad mineral ósea, artrogriposis, escoliosis, exostosis).
- Renal (quistes renales, alteración estructural renal).
- Malformaciones congénitas (cardíacas, acalasia, alacrimia, estrabismo, coloboma).

Pacientes que, cumpliendo estos criterios, aceptaron la toma de muestra de sangre periférica para la realización de estudio de isoelectroenfoque de transferrina y firmaron el consentimiento informado.

8.1.- Criterios de exclusión

Debido a que el método de medición de la glicosilación mediante el isoelectroenfoque de transferrina puede modificarse en individuos con procesos neoplásicos e ingesta de sustancias como el alcohol, se excluirán

- Pacientes que presenten cáncer sólido o hematológico al momento del estudio.
- Pacientes que consuman alcohol en un periodo de 14 días antes de la toma de muestra para la realización de isoelectroenfoque de transferrina.

8.2.- Selección de la muestra

Es un estudio exploratorio diagnóstico en el que se realizó un muestreo por conveniencia. Para la selección de la muestra se realizó revisión de expedientes de 2, 376 pacientes vistos en la consulta de genética en el periodo de enero 2015 a diciembre 2020, en la primera fase de selección, se incluyó a los pacientes que presentaban una edad de 18 a 75 años, de sexo indistinto y además que presentaran afección del SNC (incluidos en los criterios de inclusión), cumplieron este criterio 208 pacientes, como segunda fase de selección, se incluyeron a aquellos pacientes que además presentaron afección en otro sistema como, muscular, endocrinológico, hematológico, inmunológico, gastrointestinal, óseo, renal y

malformaciones congénitas seleccionándose 87 pacientes, de los cuales solo se contactaron y aceptaron el estudio 40 pacientes de estos 36 fueron no relacionados.

8.3.- Descripción operacional de las variables

<i>Variables</i>	<i>Escala de medición</i>	<i>Tipo de variable</i>
<i>Sociodemográficas</i>		
<i>Edad</i>	Años cumplidos	Dimensional
<i>Genero</i>	F o M	Dicotómica
<i>Lugar de Residencia</i>	Especificar lugar	Nominal
<i>Lugar de Nacimiento</i>	Especificar lugar	Nominal
<i>Escolaridad</i>	Número de años estudiados	Dimensional
<i>Ocupación</i>	Categorías	Nominal
<i>Asociadas a la clínica</i>		
<i>Dismorfias faciales</i>	Presente o ausente	Dicotómica
<i>Talla baja (de acuerdo a talla blanco familiar)</i>	< 6.5 cm o >6.5 cm	Dicotómica
<i>Peso</i>	Kilogramos	Dimensional
<i>Desarrollo psicomotor</i>	Alteración en 2 o más esferas se asignará como retraso del desarrollo global sino se designará como normal	Dicotómica
<i>Hipotonía</i>	Presente o ausente	Dicotómica
<i>Exploración clínica de SNC</i>	Alteración en SNC o no	Dicotómica
<i>Crisis convulsivas</i>	Presente o ausente	Dicotómica
<i>Antecedente de crisis convulsivas febriles</i>	Si o no	Dicotómica
<i>Dermatológico</i>	Escala de principales alteraciones	Ordinal
<i>Alteraciones oculares</i>	Escala de principales alteraciones	Ordinal
<i>Alteraciones auditivas</i>	Escala de valor dependiendo si es unilateral o bilateral	Ordinal
<i>Eventos trombóticos</i>	Presencia o ausencia	Dicotómica
<i>Hemorragias frecuentes</i>	Presencia o ausencia	Dicotómica
<i>Infecciones recurrentes</i>	Presencia o ausencia	Dicotómica
<i>Hepatomegalia</i>	Presente o ausente	Dicotómica
<i>Esplenomegalia</i>	Presente o ausente	Dicotómica
<i>Predominantemente evacuaciones diarreicas</i>	Presente o ausente	Dicotómica
<i>Antecedente de abortos en la madre del probando</i>	Si o No	Dicotómica
<i>Estado hipercinetico</i>	Presente o Ausente	Dicotómica
<i>Estudios de gabinete y laboratorio</i>		

<i>DMO</i>	No evaluado, Normal, osteopenia, osteoporosis en al menos 1 segmento evaluado.	Ordinal
<i>Radiografía ósea</i>	Alteraciones esqueléticas, escala de valor.	Ordinal
<i>Eco o electrocardiograma</i>	No evaluado, sin alteración o con alteración.	Dicotómica
<i>Endocrinopatía</i>	Escala de principales alteraciones.	Ordinal
<i>Alteración por imagen en órganos de aparato digestivo</i>	Presente o ausente.	Dicotómica
<i>Alteración por imagen del SNC.</i>	Escala de las principales alteraciones	Ordinal
<i>Cariotipo</i>	Normal o anormal.	Dicotómica
<i>Estudios adicionales</i>	Presente o ausente (especificar qué estudio se realizó).	Dicotómica

8.4.- Procedimientos y técnicas de laboratorio

Previa autorización del Comité Institucional de Investigación y Ética en Investigación en Salud, se realizó revisión del expediente físico y electrónico de pacientes seleccionados de la consulta de genética médica, de enero del 2015 a diciembre del 2020, que cumplieron con los criterios de inclusión.

Se obtuvo información sociodemográfica (lugar de residencia, lugar de origen, ocupación, nivel socioeconómico, género, escolaridad y ocupación) y las características clínicas, de laboratorio y gabinete de cada uno de ellos en una base de datos. Se contactó al paciente o al familiar responsable por teléfono o en forma personal en caso de que acudiera al Instituto para alguna cita. Se le invitó y explicó de su participación en el estudio, en caso de que aceptar se le solicitó firmar el consentimiento informado y se le dio cita para extracción de sangre periférica en la toma de muestras del Instituto. Una vez que se obtuvo la muestra, se envió al laboratorio de Biología Molecular en el departamento de genética para centrifugarla y separar el suero en alícuotas identificándolas y congelándolas a -70 grados Celsius hasta su envío al Centro de Investigación en Dinámica Celular de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM). Al paciente se le realizó una consulta presencial, para verificar los datos obtenidos del expediente y actualizar su información clínica. El

resultado del estudio se comentará con el paciente y/o el familiar responsable en una cita posterior y se anexará al expediente.

En el Centro de Investigación de Biología Molecular de la UAEM se realizó isoelectroenfoque de transferrina en los pacientes seleccionados por los criterios de inclusión con la siguiente técnica: el suero del paciente (100 μ L) se saturó con hierro a temperatura ambiente durante 1h con 5 μ L de 0.5 M NaHCO₃ y 5 μ L de 20 mM FeCl₃. Se aplicó un microlitro de suero diluido 10 veces, sobre geles de poliacrilamida (T = 5%, C = 3%) que contenían 5,7% de anfolitos (pH 5-7). Después de la electroforesis, el gel se cubrió con 100 μ L de suero antitransferrina de conejo (elaborado en casa) durante 30 min a 4 ° C. El gel se lavó durante la noche con solución salina fisiológica, se fijó, se tiñó con Coomassie Brilliant Blue R-250, se destiñó, secó y se fotografió. El patrón isoeléctrico determinó si presenta una alteración de la glicosilación y el perfil a que corresponde.

8.5.-Análisis estadístico

Se empleó estadística descriptiva, las variables categóricas se describieron en tablas de frecuencias y porcentajes absolutos y las variables de tipo numérico se resumieron en medidas de tendencia central y dispersión.

9.- CONDICIONES DE BIOSEGURIDAD

El estudio será realizado de acuerdo con los requerimientos legales y regulatorios, así como también de acuerdo con los principios generales establecidos por las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos (Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas, 2002), los lineamientos para la Buena Práctica Clínica (Conferencia Internacional sobre Armonización 1996) y la Declaración de Helsinki (Asociación Médica Mundial 2008). Investigación con riesgo mínimo, según lo descrito en el artículo 17 del Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud.

9.1- Aspectos éticos

De acuerdo con los Artículos 16, 17 y 22 del CAPÍTULO I, TÍTULO SEGUNDO: De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos, del REGLAMENTO de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.

Los investigadores confirmamos que la revisión de los antecedentes científicos del proyecto justifican su realización, que contamos con la capacidad para llevarlo a buen término, nos comprometemos a mantener un estándar científico elevado que permita obtener información útil para la sociedad, a salvaguardar la confidencialidad de los datos personales de los participantes en el estudio, pondremos el bienestar y la seguridad de los pacientes sujetos de investigación por encima de cualquier otro objetivo, y nos conduciremos de acuerdo a los estándares éticos aceptados nacional e internacionalmente según lo establecido por la Ley General de Salud, Las Pautas Éticas Internacionales Para la Investigación y Experimentación Biomédica en Seres Humanos de la OMS, así como la Declaración de Helsinki.

10.- RECURSOS

10.1.- Recursos Humanos.

- El médico residente de la especialidad en genética médica se encargó de seleccionar la muestra, tomar muestra de sangre periférica en pacientes seleccionados para posteriormente separar el suero y ser almacenado a -70°C , transportar las muestras en condiciones óptimas al Centro de Investigación en Dinámica Celular de la UAEM y recolectar la información en una base de datos, así como realizar ajustes metodológicos.
- El investigador responsable se encargó de la supervisión tanto del protocolo de investigación, así como de la recolección de datos de los pacientes seleccionados, y la dirección del proyecto.
- El investigador asociado se encargó de la realización de la técnica de isoelectroenfoque de transferrina en el Centro de Investigación de Dinámica Celular de la UAEM, así como de la revisión del protocolo de investigación.

10.2.- Recursos Materiales.

- Expediente clínico físico y electrónico.
- Equipo de cómputo: para elaboración de protocolo, análisis estadístico, captura de datos clínicos en una base de datos.
- Centrifugadora
- Almacén a -70 grados Celsius
- Para cada muestra $5\ \mu\text{L}$ de $0.5\ \text{M}\ \text{NaHCO}_3$ y $5\ \mu\text{L}$ de $20\ \text{mM}\ \text{FeCl}_3$.
- anfolitos (pH 5-7)
- Suero antitransferrina de conejo
- Solución salina fisiológica
- Coomassie Brilliant Blue R-250
- Geles de poliacrilamida
- Una mini-cámara modelo 111 de isoelectroenfoque (Biorad) con fuente de poder.

10.3.- Recursos Financieros

No se requiere erogación de recursos financieros institucionales ya que las evaluaciones realizadas forman parte de la evaluación del paciente en consulta externa de este Instituto.

La realización de isoelectroenfoque de transferrina se realizará en laboratorio externo sin costos para la Institución ni el paciente.

11.-RESULTADOS

Se incluyeron 36 pacientes no relacionados y 4 más familiares. La mediana de edad al momento del estudio fue de 30 años (rango: 18 a 67 años) representando el 67.5% a mujeres (n=27) y el 32.5% a hombres (n=13) (tabla 4).

Todos los pacientes presentaron alteración en SNC, correspondiendo en el 62.5% a hipotonía, el 45% a retraso en el desarrollo psicomotor, en el 35% a anomalías congénitas y del desarrollo del SNC y el 22.5% a convulsiones. La combinación de retraso en el desarrollo psicomotor e hipotonía represento el 22.5% (n=9), la combinación con hipotonía más anomalías congénitas y del desarrollo del SNC el 17.5% (n=7), la combinación de convulsiones más retraso en el desarrollo psicomotor del 15% (n=15), la combinación de retraso en el desarrollo psicomotor y anomalías congénitas y del desarrollo del SNC en el 10.0%(n=4), solo un paciente presento convulsiones, retraso en el desarrollo psicomotor y anomalías congénitas y del desarrollo del SNC.

Tabla 5. Porcentaje de pacientes por tipo de alteración del SNC

Alteración en el SNC	Pacientes (porcentaje)
Hipotonía	25/40 (62.5)
Retraso en el desarrollo psicomotor	18/40 (45)
Anomalías congénitas y del desarrollo del SNC	14/40 (35)
Convulsiones	9/40 (22.5)

Los pacientes además de tener alteración en el SNC tenían afección de otro sistema, la combinación con el sistema endocrinológico fue del 50% (n=20), la combinación con alteración muscular represento el 35% (n=14), la combinación con alteración hematológica 17.5% (n=7), con la combinación inmunológica 10% (n=4), con la alteración gastrointestinal 17.5% (n=7), con la alteración ósea represento el 20% (n=8) si bien la alteración ósea más la afección en SNC era suficiente para ingresarlos al protocolo, todos los pacientes con alteración ósea presentaron algún otro sistema involucrado. La combinación con alteración renal fue del 22.5% (n=9), la combinación con malformaciones congénitas (en un paciente

cataratas, queratocono, atresia anal, en tres acalasia y alacrimia y malformaciones cardiacas) se presentó en el 22.5% (n=9).

Tabla 6. Porcentaje de pacientes con involucro de SNC y otro sistema.

SNC mas Otro sistema involucrado	Pacientes (Porcentaje)
Endocrinológico	20/40 (50)
Muscular	14/40 (35)
Malformaciones Congénitas	12/40 (30)
Renal	9/40 (22.5)
Óseo	8/40 (20)
Hematológico	7/40 (17.5)
Gastrointestinal	7/40 (17.5)
Inmunológico	4/40 (10)

Se encontró alteración en el IEFTf en la paciente 8 y 9, ambas con un patrón sugestivo tipo II, la paciente 9 debido a sintomatología parecida con hermanos, se realizó estudio de extensión a cuatro hermanos los cuales también resultaron con alteración en el IEFTf, los hermanos en los que se hizo extensión presentan ataxia, debilidad muscular, e hipotonía, una de las hermanas tenía como antecedente Aorta Bivalva, y su hermano presento debilidad muscular que incapacita sus actividades diarias.

Tabla4. Listado de manifestaciones clínicas de pacientes seleccionados.

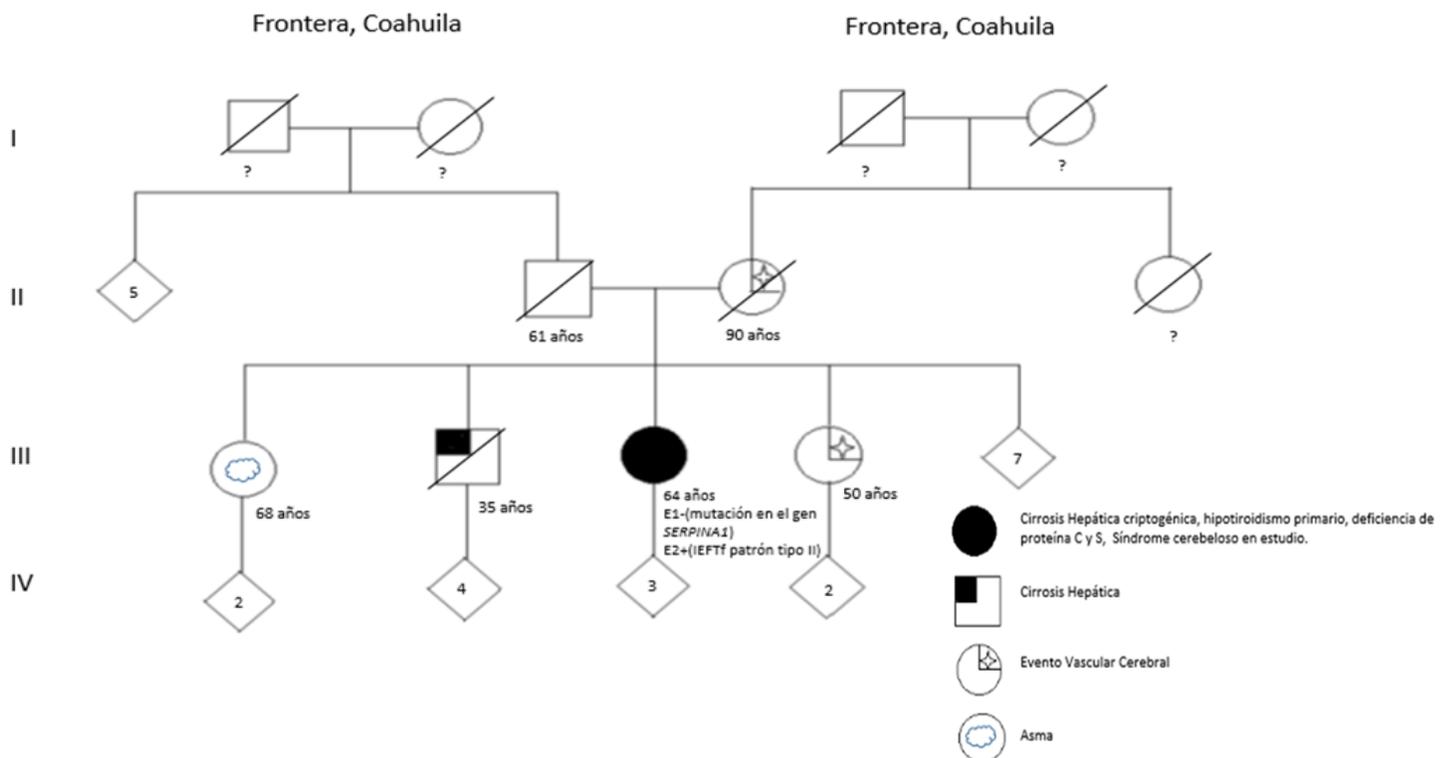
No. Pacientes	Edad (años)	Genero	Alt. del SNC	Alt. musculares	Alt. endocrinológicas	Evento de trombosis	Evento de hemorragia	Alt. hematológicas	Alt. inmunológicas	Alt. gastrointestinales	Alt. óseas	Alt. renales	Malformaciones congénitas	Patrón de IEFTf
1	36	F	SI	NO	Hipotiroidismo	NO	NO	NO	NO	NO	Osteopenia	NO	NO	Normal
2	23	M	SI	NO	Hipoparatiroidismo, Dislipidemia	NO	NO	NO	NO	NO	NO	Nefropatía por reflujo / Proteinuria en estudio	Catarata Bilateral	Normal
3	23	M	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	Quistes renales	NO	Normal
4	22	F	SI	NO	Hipotiroidismo	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	Normal
5	30	F	SI	Debilidad Muscular	Hipotiroidismo	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	Acalasia y alacrimia	Normal
6	25	F	SI	NO	Dislipidemia	NO	SI	NO	SI	Cirrosis Hepática	NO	NO	NO	Normal
7	27	F	SI	NO	Hipoglucemias	NO	NO	NO	NO	NO	Osteopenia	NO	NO	Normal
8	64	F	SI	NO	NO	SI	SI	NO	NO	Cirrosis Hepática	Osteoporosis	NO	NO	Patrón tipo II
9	62	F	SI	NO	NO	NO	NO	NO	Infecciones Recurrentes	Fibrosis Hepática	NO	NO	NO	Patrón tipo II
10	29	F	SI	NO	Dislipidemia, Hipotiroidismo	SI	NO	Plaquetopenia	NO	NO	NO	NO	NO	Normal
11	21	M	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO	Gastroparesia	NO	NO	NO	Normal
12	32	F	SI	NO	Hipotiroidismo	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	Normal
13	62	F	SI	NO	NO	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO	Atresia Anal/Fistula Rectovaginal	Normal
14	23	F	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	Doble Sistema Colector Renal, Nefromegalia Derecha	Queratocono	Normal
15	43	F	SI	NO	Hipotiroidismo	NO	SI	NO	NO	NO	NO	Enfermedad Renal Crónica	NO	Normal
16	22	M	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	Síndrome Nefrótico	NO	Normal
17	38	F	SI	Debilidad Muscular	NO	NO	NO	NO	NO	NO	Osteopenia	NO	NO	Normal
18	30	M	SI	NO	Hipotiroidismo Diabetes Mellitus	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	CIV	Normal
19	24	F	SI	NO	Hipogonadismo	NO	SI	NO	NO	NO	Osteoporosis	Reflujo Vesicoureteral	PCA	Normal
20	51	F	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	Osteopenia	NO	Acalasia y alacrimia	Normal

21	32	F	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	Osteopenia	NO	Acalasia y alacrimia	Normal
22	22	M	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	Quiste renal	NO	Normal
23	30	M	SI	NO	Hipogonadismo, Obesidad	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	Normal
24	34	F	SI	NO	Hipotiroidismo	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	Normal
25	43	F	SI	Debilidad Muscular	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	Normal
26	27	F	SI	Debilidad Muscular	Enfermedad de Cushing	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	Normal
27	32	M	SI	NO	Hiperaldosteronismo, Obesidad	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	Normal
28	20	F	SI	NO	Resistencia a la Insulina, Obesidad	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	Normal
29	27	F	SI	Debilidad Muscular	Hipoglucemia	NO	SI	Trombocitopenia	Infecciones Recurrentes	NO	NO	NO	NO	Normal
30	22	M	SI	NO	Sobrepeso	NO	NO	NO	NO	Diarrea Crónica	NO	Ectasia Pielocalicial Derecha	NO	Normal
31	24	M	SI	Miopatía	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	Normal
32	36	F	SI	Debilidad Muscular	NO	SI	SI	Trombocitopenia	NO	NO	NO	NO	NO	Normal
33	19	F	SI	Polineuropatía Simétrica Mixta	NO	NO	NO	NO	Infecciones Recurrentes	NO	Osteopenia	NO	NO	Normal
34	67	F	SI	Polineuropatía Axonal	Hipotiroidismo	NO	NO	NO	NO	NO	NO	Enfermedad Renal Crónica Terminal	NO	Normal
35	66	M	SI	NO	Dislipidemia	NO	NO	NO	NO	Gastropatía Atrófica	NO	NO	NO	Normal
36*	59	F	SI	Debilidad Muscular	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	Aorta Bivalva	Patrón tipo II
37*	62	M	SI	Debilidad Muscular	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	Patrón tipo II
38*	67	F	SI	Debilidad Muscular	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	Patrón tipo II
39*	55	F	SI	Debilidad Muscular	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	Patrón tipo II
40	18	M	SI	Debilidad Muscular	Hipotiroidismo	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	Normal

La paciente 8 es una paciente de 64 años con diagnósticos de cirrosis hepática criptogénica con hipertensión portal no hemorrágica, hipotiroidismo primario, deficiencia de proteína C y S, y atrofia cerebelar. Como antecedentes heredofamiliares de importancia presenta hermano muerto a los 35 años por cirrosis hepática, lo que sugiere herencia Autosómica Recesiva para cirrosis hepática.

Inició con síntomas a la edad de 42 años con hepatalgia de moderada intensidad, acompañado de náuseas e ictericia. A esto se le agregó, episodios de sangrado de tubo digestivo secundario a varices esofágicas, a partir de los 52 años presenta temblor de las extremidades superiores acompañado de lenguaje escandido, desorientación en tiempo y espacio, posteriormente a los 53 años presento lateropulsión e inestabilidad de la marcha, en la Resonancia Magnética Cerebral se evidencio discreta atrofia cerebelosa. Los laboratorios para descartar déficit nutricionales y metabólicos del cobre resultaron normales. Como estudio molecular se realizó búsqueda de variantes patogénicas en el gen *SERPINA1*, el cual resultó normal. Por motivo de cuadro neurológico más afección multisistémica se ingresó al protocolo resultando el IEFTf con patrón tipo II.

Genealogía. Paciente número 8.



La paciente 9 es una paciente de 63 años con diagnóstico de síndrome cerebeloso, hepatopatía en estudio, síndrome de Sjögren primario, cataratas bilaterales, infecciones de vías urinarias de repetición, hipertensión arterial sistémica y antecedentes de pérdidas gestacionales recurrentes. Como antecedentes heredofamiliares de importancia presenta hermana de 67 años de edad con diagnósticos de depresión, debilidad muscular proximal, disartria y disdiadococinesias, marcha con base de sustentación amplia, sin capacidad para realizar tándem, hermana de 62 años de edad con antecedente de evento vascular cerebral, hermano de 61 años con diagnóstico de diabetes mellitus, hipertensión, debilidad muscular proximal de evolución progresiva que actualmente es incapacitante, camina con apoyo (más rápida progresión después de infección por COVID-19 en el año 2020), disartria y disdiadococinesias. Hermano finado a la edad de 6 meses por patología cardíaca. Hermana de 59 años de edad con diagnósticos de hipertensión, aorta bivalva, disdiadococinesias y debilidad muscular de predominio proximal, y hermana de 55 años de edad con antecedente de cáncer de tiroides, debilidad muscular de predominio proximal y disdiadococinesias. Por lo anterior se sugiere un modo de herencia Autosómica Recesiva para síndrome cerebeloso con debilidad muscular.

El cuadro clínico inicio desde la infancia presentando dificultad para articular palabras, y disfonía intermitente. A la edad de 25 años nota que a esta dificultad para articular palabras se le suma incoordinación (“torpeza”) progresiva. Para posteriormente a los 53 años notar hipoacusia derecha progresiva. Al momento de la valoración por nuestro instituto a los 58 años, se reconoce la afección hepática, sin llegar a un diagnóstico definitivo. Se realizaron laboratorios para descartar déficit nutricionales y metabólicas del cobre resultando como normales. Además, se descartó un síndrome paraneoplásico por medio de tomografía por emisión de positrones. Como estudios adicionales se realizó PCR multiplex para SCA 1,2,3,6, y 7, el cual resultado negativo, se cuenta con una RMN en 2014 con datos de atrofia. Por motivo de cuadro neurológico más afección multisistémica se ingresó al protocolo resultando el IEFTf con patrón tipo II.

Genealogía. Paciente número 9.

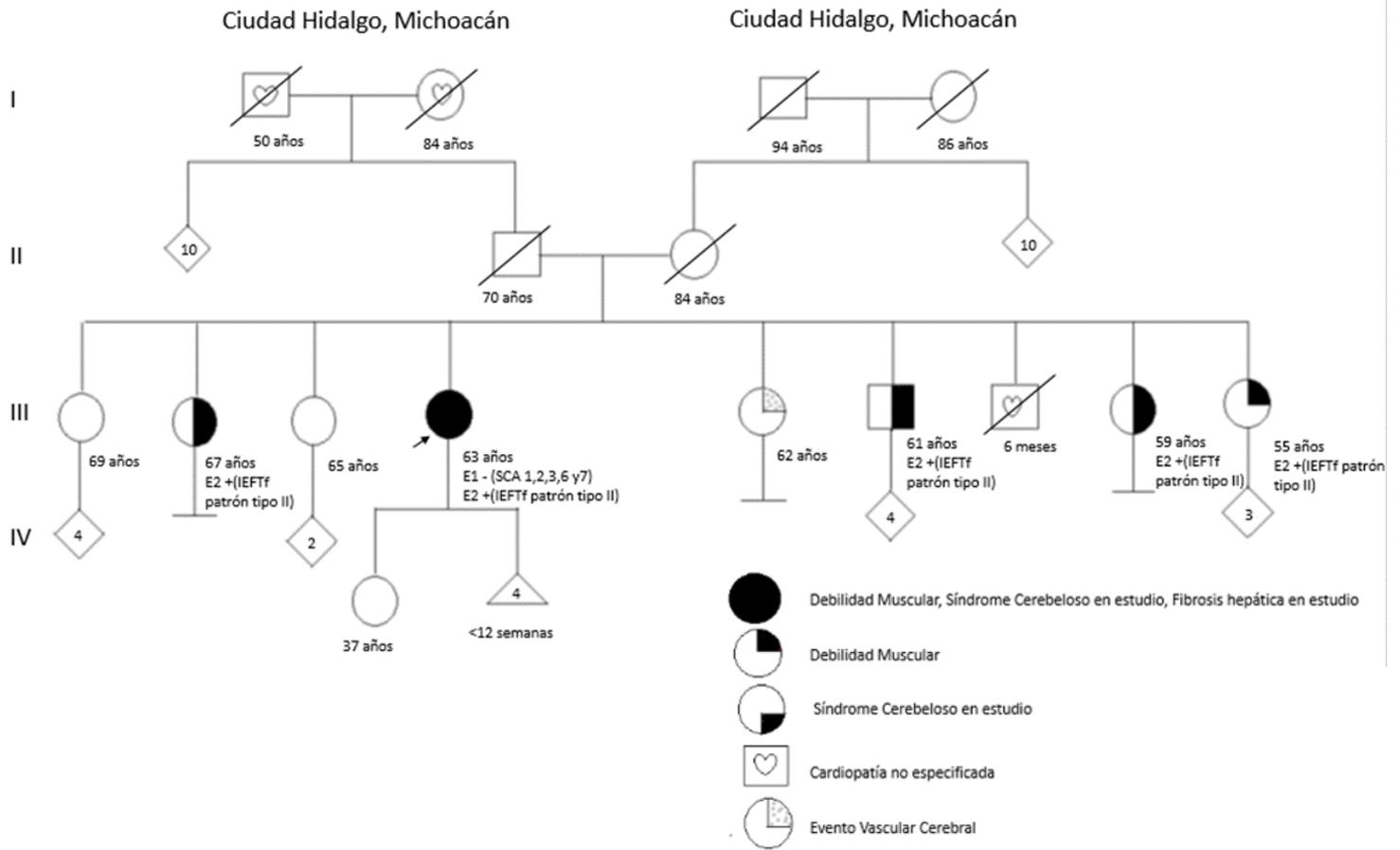
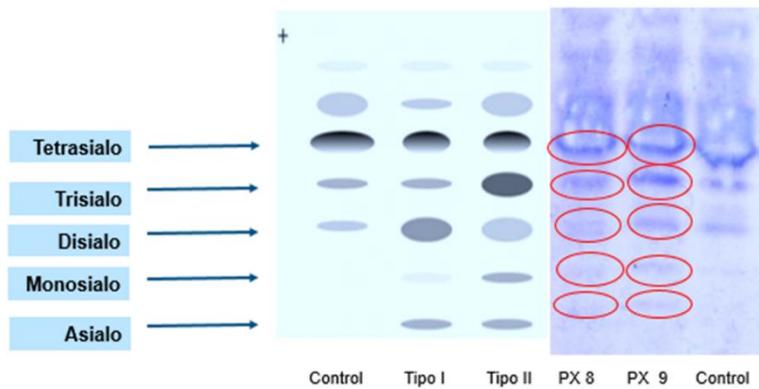


Figura 2. Isoelectroenfoque de transferrina de los pacientes 8 y 9 con patrón tipo II.



12.-DISCUSIÓN

La glicosilación es un proceso que sucede en todas las células del organismo y resulta esencial para el funcionamiento de gran parte de las proteínas, favoreciendo el tráfico de señalización intracelular o su interacción con otras células. Defectos en este proceso tienen repercusiones variables de modo que algunas proteínas pueden resultar completamente afectadas en su funcionamiento mientras que otras pueden no verse alteradas en absoluto. Por lo tanto, la glicosilación defectuosa de proteínas puede alterar las funciones de muchos órganos y tejidos, generando sintomatología clínica compleja y heterogénea.

Se tamizaron pacientes adultos con afección multisistémica, que incluían alteración en SNC, y otro sistema involucrado, sin diagnóstico genético integrado. La afección neurológica se ha encontrado en más del 80% de los pacientes reportados con DCG, en donde se ha propuesto que la glicosilación alterada en el desarrollo neuronal puede ser relevantes para el desarrollo y mantenimiento de las funciones cognitivas normales, es por eso que se tomó como característica clínica principal en este estudio, sin embargo, los criterios de inclusión fueron amplios (Paprocka, Jezela-Stanek, Tylki-Szymańska y Grunewald, 2021).

El 50% de nuestra muestra presentó una asociación de alteraciones en el SNC con el sistema endocrinológico, si bien la mayoría presentaban afección tiroidea (9; 39.1%), el metabolismo de la glucosa (4;17.3%) y el desarrollo sexual (2;8.6%), patologías que se encuentran reguladas por hormonas glicoproteicas, también se incluyeron dentro de las alteraciones endocrinológicas a las dislipidemias (8;35%), esto por el papel de algunas glucosiltransferasa en la modificación de proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos (Van den Boogert, et. al., 2019; Starosta, et. al., 2021).

Las hormonas glucoproteicas como la hormona estimulante de tiroides (TSH), la hormona luteinizante (LH), la hormona estimulante del folículo (FSH), existen como heterodímeros que constan de una subunidad α común y una subunidad β única que confiere especificidad al receptor (Ząbczyńska, Kozłowska y Pocheć, 2018).

La TSH, estimula a las células tiroideas para que sintetizen hormonas tiroideas a través de receptor de TSH (TSHR). La TSH humana es una glucoproteína de 28 a 30 kDa; la

parte de glicanos representa del 15 al 25% de su peso molecular. La secuencia de aminoácidos de la hormona TSH contiene tres N sitios potenciales de glicosilación. Dos de ellos están en la subunidad α (Asn52, Asn78) y uno en la subunidad β (Asn23). La N -glicosilación de la subunidad α afecta la transducción de señales después de la activación de TSH, en cambio la glicosilación de la subunidad β es importante para la estabilidad y secreción de TSH (Ząbczyńska, Kozłowska y Pocheć, 2018).

Además de la TSH también el receptor de tirotropina (TSHR), es un receptor de dominio transmembrana acoplado a proteína G, de 84 kDa compuesto por dos subunidades: una α extracelular, que forma la región de unión al ligando; y una β , que abarca las partes transmembrana y citosólica del receptor y es responsable de su señalización. Se sugieren tres regiones distintas de unión a TSH (aa 246-260, 277-296, 381-385). El dominio extracelular del receptor humano está fuertemente glicosilado en seis sitios de N -glicosilación (Asn77, Asn99, Asn113, Asn177, Asn198, Asn302), la eliminación de Asn77 o Asn113 da como resultado la interrupción de la unión de TSH (Ząbczyńska, Kozłowska y Pocheć, 2018).

La molécula de Tiroglobulina (Tg) está O - y N - glicosilada, y alrededor del 10% de su masa molecular está relacionada con oligosacáridos. La cadena polipeptídica de la Tg humana (hTg) contiene 20 sitios de N -glicosilación. Los glicanos son necesarios para el transporte intracelular y extracelular de Tg, la síntesis de hormonas, y el correcto funcionamiento y la inmunorreactividad de la Tg. (Ząbczyńska, Kozłowska y Pocheć, 2018).

Todas las proteínas tiroideas humanas mencionadas anteriormente están N-glicosiladas y contienen diferentes números de sitios de glicosilación, se han descrito pruebas de función tiroidea anormales en pacientes con trastornos congénitos de la glicosilación. Por lo tanto, los oligosacáridos están críticamente involucrados en el control del funcionamiento de la tiroides (Ząbczyńska, Kozłowska y Pocheć, 2018).

Debemos tener en cuenta la prevalencia de estas enfermedades en la población general; por ejemplo el hipotiroidismo clínico / subclínico en personas adultas se sitúa entre el 3 y el 10%, según estudios epidemiológicos que se han realizado en EE. UU., así que realizar esta asociación como criterios de inclusión podría dejar a nuestros criterios de inclusión laxos, sin embargo en el presente estudio únicamente se incluyeron a dos pacientes

con la alteración en el SNC e hipotiroidismo representando el 5% de la muestra (Ząbczyńska, Kozłowska y Pocheć, 2018; Lage, Espaillat, Vora y Hepp, 2020).

Las anomalías en la glicosilación de las gonadotropinas o sus receptores de la superficie celular provocan una reducción de la bioactividad y / o biodisponibilidad y esto parece ser responsable de la maduración sexual retrasada o ausente en algunos pacientes con DCG.

Las subunidades de FSH poseen dos sitios potenciales de N-glicosilación en cada subunidad, teniendo un total de cuatro sitios de N-glicosilación (Davis, Kumar, May y Bousfield, 2014). El receptor de FSH (FSHR) tiene más sitios de glicosilación que el receptor de LH, es probable que la función de FSHR se vea más afectada por la glicosilación alterada. Además, la alteración de la glicosilación de la enzima aromatasa pueden dar lugar a fenotipos variables que incluyen rangos variables de niveles de estrógeno, testosterona y gonadotropina (Miller, Freeze, Hoffmann y Sarafoglou, 2011).

La aromatasa es una enzima del citocromo P450 involucrada en la biosíntesis de estrógenos a partir de andrógenos en muchos tejidos que responden al estrógeno (ovarios, tejido adiposo, piel, cerebro, huesos y placenta) siendo el folículo ovárico el sitio principal. La aromatasa contiene tres sitios de N-glicosilación y se ha demostrado que las formas no glicosiladas de la enzima aromatasa tienen una eficacia catalítica reducida

Solo se encontró hipogonadismo hipergonadotrófico en dos pacientes, uno presentó de forma adicional malformación cardiaca, y reflujo vesicoureteral, sin embargo, ambos resultados fueron normales para IEFTf.

Dentro de este grupo de pacientes se incluyeron a dos pacientes que ya tenían resultado molecular de mutación del gen *GMPPA*, ellas presentaron la triada característica, sin embargo el estudio por IEFTf presento un resultado normal, por lo que la paciente número 5 que presenta acalasia, alacrimia, hipotonía y debilidad muscular sin datos actualmente de insuficiencia suprarrenal podría corresponder a mutaciones en *GMPPA* que, como se reporta en la literatura las mutaciones en el gen *GMPPA* causan como cuadro clínico alacrima, acalasia y discapacidad intelectual, que también implica debilidad muscular, la paciente aparenta una discapacidad intelectual leve, pero no contamos con el estudio de evaluación

correspondiente. Dentro de los genes que pueden resultar en un estudio de IEFTf normal se encuentra este gen, por lo que se necesitan realizar estudios adicionales (Benítez et al., Franzka et al. 2021)

La presentación inicial de DCG a menudo implica disfunción hepática o gastrointestinal (GI); como alteraciones gastrointestinales principales se encuentra el reflujo gastroesofágico, diarreas y vómitos, estos síntomas son muy comunes en la mayoría de los DCG, desconociendo el origen de estos. Como afección hepática se pueden tener dos presentaciones: con afectación hepática predominante/aislada (*MPI*-CDG, *CCDC115*-CDG, *TMEM199*-CDG, *ATP6AP1*-CDG) y la asociada con otros sistemas (*PMM2*-CDG, *ALG1* -CDG, *ALG3*-CDG, *ALG8*-CDG, *ALG9*-CDG, *PGM1*-CDG). En el caso de un fenotipo asociada a otros sistemas específicamente con SNC, se observa una afectación hepática grave (hepatomegalia, cirrosis, fibrosis hepática, esteatosis) como parte de la insuficiencia orgánica múltiple. Hasta el momento no hay un patrón histológico típico de enfermedad hepática en DCG, por lo que la biopsia no arroja datos adicionales (Johnsen y Edmondson, 2021).

La enfermedad hepática es altamente penetrante en los DCG, y todos los pacientes requieren detección de daño hepático mediante examen físico, investigaciones de laboratorio e imágenes del hígado. La ecografía hepática a menudo muestra una ecotextura tosca del hígado que sugiere fibrosis o hasta cirrosis. Sin embargo, la disfunción hepática de cualquier etiología puede producir anomalías en la glicosilación de la transferrina, lo que exige precaución al interpretar un resultado anormal y requiere confirmación diagnóstica con pruebas genéticas.

Se debe considerar que un resultado anormal puede deberse al papel del hígado en la glicosilación en el cuerpo, el cual produce la mayoría de las proteínas séricas glicosiladas, donde una alteración en su funcionamiento originara alteración en el proceso de glicosilación o bien ser resultado de DCG, el cual puede afectar su desarrollo, estructura y función presentando, al igual que en la primera situación una alteración en la glicosilación de proteínas. Entender cómo y en qué medida el hígado se ve afectado en DCG, permitirá que los médicos puedan reconocer a este grupo de enfermedades para su diagnóstico.

En el presente estudio se seleccionaron a tres pacientes con alteración hepática, encontrándose un resultado alterado en dos de ellos, en estos pacientes se identificó un patrón

de DCG tipo II. Si bien el patrón tipo II se traduce en una afección principalmente a nivel de compartimiento intermedio entre el RE y el aparato de Golgi (ERGIC) además del propio aparato de Golgi, los genes involucrados en estas regiones han presentado enfermedad hepática con gravedad variable, por lo que no es posible poder definir un gen candidato para búsqueda de mutación.

Se encontró una alteración en el IEFTf inicialmente en dos pacientes de los 36 estudiados hasta ese momento (representando el 5.5%), ambos con afección hepática. Después del interrogatorio al paciente número 9, se decidió integrar en el protocolo a los hermanos de la probando, teniendo un porcentaje de detección de alteraciones de IETf por los criterios de inclusión de 16.6% que es mayor a lo reportado en la literatura de estudios de tamizaje en pacientes pediátricos.

Si bien el IEFTf es el estudio más utilizado para el diagnóstico y seguimiento de DCG, hay una serie de DCG que presentan un IEFTf normal y para los cuales no se sabe si este patrón normal puede alterarse en el transcurso de la historia natural de la enfermedad, por lo tanto, se necesitan realizar estudios seriados de IEFTf en aquellos pacientes que se tenga una sospecha alta de un DCG. Actualmente se recomienda realizar IEFTf en suero para un tamizaje inicial.

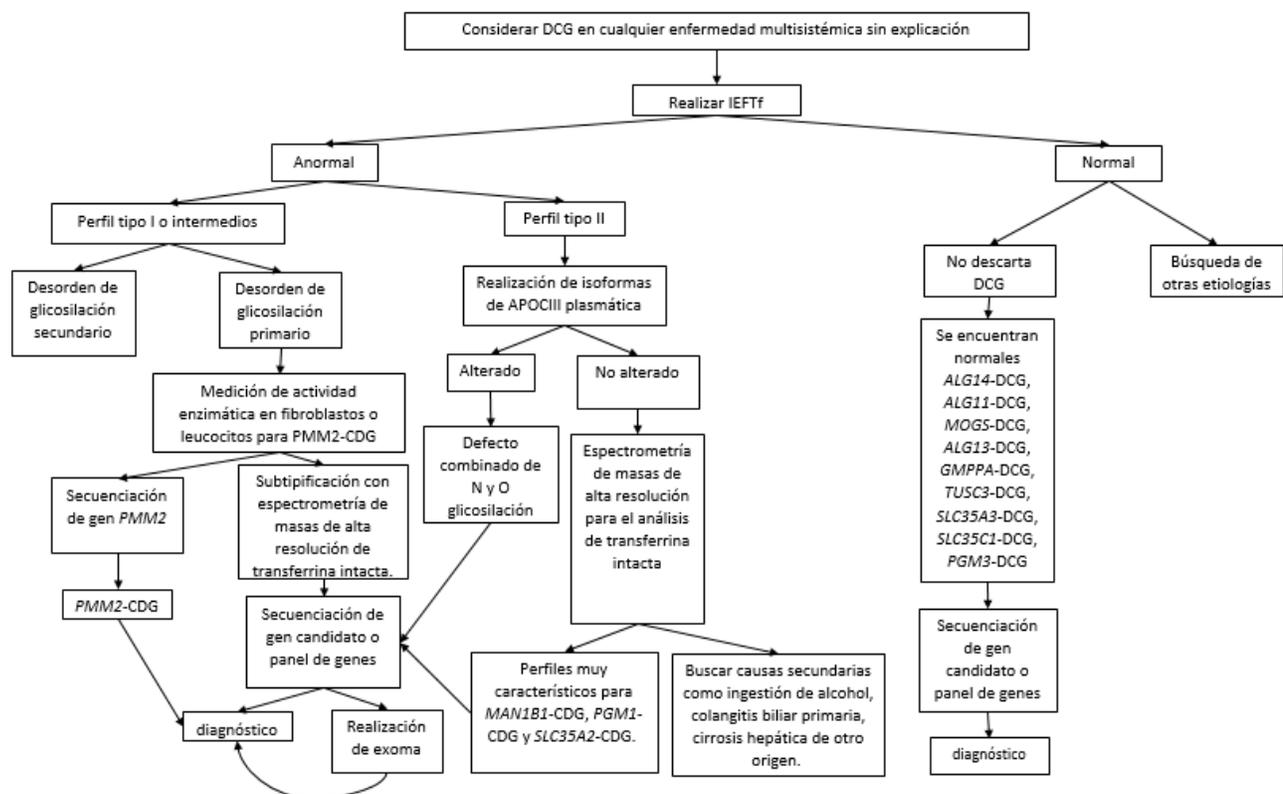
Cada vez está más claro que el espectro clínico puede involucrar sistemas de órganos individuales o múltiples, al igual que en otros errores innatos del metabolismo, dependiendo de la gravedad de la enfermedad (edad de inicio de los síntomas), se pueden observar fenotipos de leves a graves. Por lo tanto, un análisis clínico detallado, que incluya un examen físico (es decir, dismorfias craneofaciales, talla, peso y circunferencia de la cabeza), así como antecedentes familiares, personales y prenatales son esenciales para reconocer el espectro clínico de este grupo de enfermedades.

Se sugiere que ante un resultado normal, si bien este puede resultar de una no afección en esta vía, también se puede deber a que los patrones de glicosilación de transferrina pueden normalizarse esporádicamente, esto se ha documentado en diversos estudios, por tal motivo se recomienda realizar pruebas repetidas, las cuales están indicadas en pacientes con alto índice de sospecha, una de las razones de esto, podría ser porque los defectos de glicosilación de los pacientes con DCG que sobreviven hasta la edad adulta pueden volverse más leves o

incluso normalizarse con el tiempo. La normalización espontánea del perfil de glicosilación aún no se ha investigado para DCG (Jansen, et. al., 2020).

Basándonos en esta revisión, creamos un algoritmo de diagnóstico para DCG

Algoritmo diagnóstico:



Si bien como se explica en nuestro abordaje propuesto, encontrar un resultado alterado en el IEFTf solo nos lleva a estudios adicionales para poder identificar el gen causal, también un resultado normal no descarta como entidad a los DCG, por lo que la historia clínica completa sigue siendo el método clínico que más nos orienta junto con los reportes de casos de pacientes con afección en alguno de estos genes en poder en un futuro delimitar el cuadro clínico y buscar manifestaciones clínicas más dirigidamente.

Proponer un abordaje y un seguimiento en estos pacientes es un reto, muchos de los pacientes que se diagnosticaron en la infancia ya alcanzaron la edad adulta sin embargo no existen artículos de la evolución de estos pacientes para poder, en la edad adulta generar pautas para darles una atención médica completa.

13.-CONCLUSIÓN

Los DCG son un grupo de defectos en el metabolismo con herencia autosómica recesiva que ha presentado una rápida expansión en los últimos años debido a la identificación de genes afectados indispensables para el proceso de glicosilación. Estos genes afectados se encuentran en diversas vías biológicas, que van desde las enzimas ubicadas en el citoplasma, el retículo endoplásmico (RE) hasta la alteración del tráfico y la homeostasis del aparato de Golgi.

Los DCG están asociados con un amplio espectro de características clínicas y gravedad, que generalmente involucran al sistema nervioso central y uno o más sistemas en donde, el sistema endocrinológico, inmunológico, muscular y gástrico son los más frecuentes relacionados. Como vemos en el presente estudio los dos pacientes iniciales que resultaron con un patrón de glicosilación alterado debido al estudio de IEFTf presentaban afección hepática, si bien esta alteración por si sola puede resultar en una hipoglicosilación proteica debido al papel del hígado en la glicosilación en el cuerpo, saber si la afección estructural inicial desembocó en el patrón alterado de glicosilación o si la alteración en la glicosilación provocó la alteración hepática, es difícil de establecer en el adulto, los cuales llegan ya con consecuencias finales como fibrosis y cirrosis, por lo anterior la búsqueda posterior de un gen candidato o de paneles genéticos o si es posible exoma, nos ayudaría a poder resolver esta incógnita.

El estudio inicial de tamizaje se realiza con el IEFTf, pero obtener un resultado normal tampoco excluye el diagnóstico debido a que alteraciones en genes involucrados en esta vía producen un patrón normal, como vemos dentro de nuestro abordaje diagnóstico, estos genes son *ALG14-DCG*, *ALG11-DCG*, *MOGS-DCG*, *ALG13-DCG*, *GMPPA-DCG*, *TUSC3-DCG*, *SLC35A3-DCG*, *SLC35C1-DCG*, *PGM3-DCG*. Sin embargo, si encontramos un patrón tipo I o II podemos saber de manera general en que parte del proceso ocurrió el defecto e ir dirigidamente a buscar esos grupos de genes.

Es fundamental enfatizar en la importancia de repetir (después de algunas semanas) el análisis de IEFTf en pacientes con patrón sugestivo tipo II, porque este podría ser debido a alteraciones en las técnicas del laboratorio, es por eso que para la realización de este estudio

las muestras de la probando 9 se analizaron en dos ocasiones con un promedio de tiempo entre la primera y la segunda muestra de un mes (Francisco, et. al., 2019).

Actualmente, a nuestro conocimiento no existen trabajos previos de búsqueda dirigida de DCG en pacientes adultos con afección de SNC con uno o más sistemas involucrados, en quienes no se ha podido integrar un diagnóstico genético, para lo cual realizamos una propuesta de abordaje diagnóstica.

También es adecuado realizar estudios multicéntricos con el fin de establecer una prevalencia a nivel nacional, debido a que con las características que describimos como criterios de inclusión solo cumplieron muy pocos pacientes vistos en la consulta de genética.

Sugerimos ofrecer la detección de DCG a todo aquel paciente con afección en SNC (hipotonía, convulsiones, Retraso psicomotor y Anomalías congénitas y del desarrollo del SNC) que involucren además de otro sistema afectado que no cuenten con un diagnóstico etiológico. Es fundamental sensibilizar a los médicos pediatras, internistas y médicos de primer contacto debido a la prevalencia presente en nuestro grupo estudiado.

14.-REFERENCIAS

- Aebi, M. (2013). N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833(11), 2430-2437.
- Arigoni-Affolter, I., Scibona, E., Lin, C. W., Brühlmann, D., Souquet, J., Broly, H., & Aebi, M. (2019). Mechanistic reconstruction of glycoprotein secretion through monitoring of intracellular N-glycan processing. *Science advances*, 5(11), eaax8930.
- Barone, R., Sturiale, L., Sofia, V., Ignoto, A., Fiumara, A., Sorge, G., ... & Zappia, M. (2008). Clinical phenotype correlates to glycoprotein phenotype in a sib pair with CDG-Ia. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 146(16), 2103-2108.
- Basiri, K., Belaya, K., Liu, W. W., Maxwell, S., Sedghi, M., & Beeson, D. (2013). Clinical features in a large Iranian family with a limb-girdle congenital myasthenic syndrome due to a mutation in DPAGT1. *Neuromuscular Disorders*, 23(6), 469-472.
- Belaya, K., Finlayson, S., Slater, C. R., Cossins, J., Liu, W. W., Maxwell, S., ... & Beeson, D. (2012). Mutations in DPAGT1 cause a limb-girdle congenital myasthenic syndrome with tubular aggregates. *The American Journal of Human Genetics*, 91(1), 193-201.
- Belaya, K., Rodríguez Cruz, P. M., Liu, W. W., Maxwell, S., McGowan, S., Farrugia, M. E., ... & Beeson, D. (2015). Mutations in GMPPB cause congenital myasthenic syndrome and bridge myasthenic disorders with dystroglycanopathies. *Brain*, 138(9), 2493-2504.
- Benítez, E. O., Morales, J. J., Muñoz, L. A., Hübner, C. A., & Mutchinick, O. M. (2018). A novel GMPPA mutation in two adult sisters with achalasia, alacrima, short stature, dysmorphism, and intellectual disability. *Molecular syndromology*, 9(2), 110-114.
- Bieberich, E. (2014). Synthesis, processing, and function of N-glycans in N-glycoproteins. In *Glycobiology of the nervous system* (pp. 47-70). Springer, New York, NY.
- Blommaert, E., Péanne, R., Cherepanova, N. A., Rymen, D., Staels, F., Jaeken, J., ... & Matthijs, G. (2019). Mutations in MAGT1 lead to a glycosylation disorder with a variable phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(20), 9865-9870
- Brockhausen, I., Schachter, H., & Stanley, P. (2009). O-GalNAc glycans. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition.
- Chang, I. J., He, M., & Lam, C. T. (2018). Congenital disorders of glycosylation. *Annals of translational medicine*, 6(24).
- Coman, D., McGill, J., MacDonald, R., Morris, D., Klingberg, S., Jaeken, J., & Appleton, D. (2007). Congenital disorder of glycosylation type 1a: three siblings with a mild neurological phenotype. *Journal of clinical neuroscience*, 14(7), 668-672.
- Cooper, N., Li, Y. T., Möller, A., Schulz-Weidner, N., Sachs, U. J., Wagner, F., ... & Marquardt, T. (2020). Incidental diagnosis of leukocyte adhesion deficiency type II following ABO typing. *Clinical Immunology*, 221, 108599.

- Cossins, J., Belaya, K., Hicks, D., Salih, M. A., Finlayson, S., Carboni, N., ... & Beeson, D. (2013). Congenital myasthenic syndromes due to mutations in ALG2 and ALG14. *Brain*, 136(3), 944-956.
- Cruz, P. M. R., Belaya, K., Basiri, K., Sedghi, M., Farrugia, M. E., Holton, J. L., ... & Beeson, D. (2016). Clinical features of the myasthenic syndrome arising from mutations in GMPPB. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 87(8), 802-809.
- Davis, J. S., Kumar, T. R., May, J. V., & Bousfield, G. R. (2014). Naturally occurring follicle-stimulating hormone glycosylation variants. *Journal of glycomics & lipidomics*, 4(1), e117.
- de la Morena-Barrio, M. E., Sabater, M., de la Morena-Barrio, B., Ruhaak, R. L., Miñano, A., Padilla, J., ... & Corral, J. (2020). ALG12-CDG: An unusual patient without intellectual disability and facial dysmorphism, and with a novel variant. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 8(8), e1304.
- de la Morena-Barrio, M. E., Wypasek, E., Owczarek, D., Miñano, A., Vicente, V., Corral, J., & Undas, A. (2019). MPI-CDG with transient hypoglycosylation and antithrombin deficiency. *haematologica*, 104(2), e79.
- Di Rocco, M., Barone, R., Adami, A., & Burlina, A. (2000). Carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes: The Italian experience. *Journal of inherited metabolic disease*, 23(4), 391.
- Dorval, G., Jeanpierre, C., Morinière, V., Tournant, C., Bessières, B., Attié-Bittach, T., ... & Heidet, L. (2021). Cystic kidney diseases associated with mutations in phosphomannomutase 2 promotor: a large spectrum of phenotypes. *Pediatric Nephrology*, 1-9.
- 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.
- Francisco, R., Pascoal, C., Marques-da-Silva, D., Brasil, S., Pimentel-Santos, F. M., Altassan, R., ... & Videira, P. A. (2020). New insights into immunological involvement in congenital disorders of glycosylation (CDG) from a people-centric approach. *Journal of clinical medicine*, 9(7), 2092.
- Freeze, H. H., Eklund, E. A., Ng, B. G., & Patterson, M. C. (2012). Neurology of inherited glycosylation disorders. *The Lancet Neurology*, 11(5), 453-466.
- Freeze, H. H., Eklund, E. A., Ng, B. G., & Patterson, M. C. (2012). Neurology of inherited glycosylation disorders. *The Lancet Neurology*, 11(5), 453-466.
- García-López, R., de la Morena-Barrio, M. E., Alsina, L., Pérez-Dueñas, B., Jaeken, J., Serrano, M., ... & Hernández-Caselles, T. (2016). Natural killer cell receptors and cytotoxic activity in phosphomannomutase 2 deficiency (PMM2-CDG). *PloS one*, 11(7), e0158863.
- Ghosh, A., Urquhart, J., Daly, S., Ferguson, A., Scotcher, D., Morris, A. A., & Clayton-Smith, J. (2017). Phenotypic heterogeneity in a congenital disorder of glycosylation caused by mutations in STT3A. *Journal of child neurology*, 32(6), 560-565
- Haanpää, M. K., Ng, B. G., Gallant, N. M., Singh, K. E., Brown, C., Kimonis, V., ... & Muller, E. A. (2019). ALG11-CDG syndrome: Expanding the phenotype. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 179(3), 498-502.

- Iqbal, Z., Shahzad, M., Vissers, L. E., Van Scherpenzeel, M., Gilissen, C., Razzaq, A., ... & Riazuddin, S. (2013). A compound heterozygous mutation in DPAGT1 results in a congenital disorder of glycosylation with a relatively mild phenotype. *European Journal of Human Genetics*, 21(8), 844-849.
- Jaeken, J. (2013). Congenital disorders of glycosylation. *Handbook of clinical neurology*, 113, 1737-1743.
- Jansen, J. C., van Hoek, B., Metselaar, H. J., van den Berg, A. P., Zijlstra, F., Huijben, K., ... & Lefeber, D. J. (2020). Screening for abnormal glycosylation in a cohort of adult liver disease patients. *Journal of inherited metabolic disease*, 43(6), 1310-1320.
- Jensen, B. S., Willer, T., Saade, D. N., Cox, M. O., Mozaffar, T., Scavina, M., ... & Mathews, K. D. (2015). GMPPB-associated dystroglycanopathy: emerging common variants with phenotype correlation. *Human mutation*, 36(12), 1159-1163.
- Johnsen, C., & Edmondson, A. C. (2021). Manifestations and Management of Hepatic Dysfunction in Congenital Disorders of Glycosylation. *Clinical Liver Disease*, 18(2), 54.
- Kara, B., Ayhan, Ö., Gökçay, G., Başboğaoğlu, N., & Tolun, A. (2014). Adult phenotype and further phenotypic variability in SRD5A3-CDG. *BMC medical genetics*, 15(1), 1-6.
- Krasnewich, D., O'Brien, K., & Sparks, S. (2007, August). Clinical features in adults with congenital disorders of glycosylation type Ia (CDG-Ia). In *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* (Vol. 145, No. 3, pp. 302-306). Hoboken: Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company.
- Lage, M. J., Espaillet, R., Vora, J., & Hepp, Z. (2020). Hypothyroidism Treatment Among Older Adults: Evidence from a Claims Database. *Advances in therapy*, 37(5), 2275-2287.
- Lefrère, B., Stepanian, A., Charles, P., Foulon-Pinto, G., Béranger, N., Alhenc-Gelas, M., ... & Siguret, V. (2019). Multifactorial hypercoagulable state associated with a thrombotic phenotype in phosphomannomutase-2 congenital disorder of glycosylation (PMM2-CDG): Case report and brief review of the literature. *Thrombosis research*, 178, 75-78.
- Liem, Y. S., Bode, L., Freeze, H. H., Leebeek, F. W., Zandbergen, A. A., & Wilson, J. P. (2008). Using heparin therapy to reverse protein-losing enteropathy in a patient with CDG-Ib. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology*, 5(4), 220-224.
- Lindahl, U., Couchman, J., Kimata, K., & Esko, J. D. (2017). Proteoglycans and sulfated glycosaminoglycans.
- Lipiński, P., & Tylki-Szymańska, A. (2021). Congenital Disorders of Glycosylation: What Clinicians Need to Know?. *Frontiers in Pediatrics*, 9.
- Lipiński, P., Bogdańska, A., & Tylki-Szymańska, A. (2021). Congenital disorders of glycosylation: Prevalence, incidence and mutational spectrum in the Polish population. *Molecular genetics and metabolism reports*, 27, 100726.
- Losfeld, M. E., Ng, B. G., Kircher, M., Buckingham, K. J., Turner, E. H., Eroshkin, A., ... & Freeze, H. H. (2014). A new congenital disorder of glycosylation caused by a mutation in SSR4, the signal sequence receptor 4 protein of the TRAP complex. *Human molecular genetics*, 23(6), 1602-1605.

- 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.
- Medrano, C., Vega, A., Navarrete, R., Ecay, M. J., Calvo, R., Pascual, S. I., ... & Pérez-Cerdá, C. (2019). Clinical and molecular diagnosis of non-phosphomannomutase 2 N-linked congenital disorders of glycosylation in Spain. *Clinical genetics*, 95(5), 615-626.
- Miller, B. S., Freeze, H. H., Hoffmann, G. F., & Sarafoglou, K. (2011). Pubertal development in ALG6 deficiency (congenital disorder of glycosylation type Ic). *Molecular genetics and metabolism*, 103(1), 101-103.
- Miller, B. S., Freeze, H. H., Hoffmann, G. F., & Sarafoglou, K. (2011). Pubertal development in ALG6 deficiency (congenital disorder of glycosylation type Ic). *Molecular genetics and metabolism*, 103(1), 101-103.
- Miossec-Chauvet, E., Mikaeloff, Y., Heron, D., Merzoug, V., Cormier-Daire, V., De Lonlay, P., ... & Seta, N. (2003). Neurological presentation in pediatric patients with congenital disorders of glycosylation type Ia. *Neuropediatrics*, 34(01), 1-6.
- Monin, M. L., Mignot, C., De Lonlay, P., Héron, B., Masurel, A., Mathieu-Dramard, M., ... & Héron, D. (2014). 29 French adult patients with PMM2-congenital disorder of glycosylation: outcome of the classical pediatric phenotype and depiction of a late-onset phenotype. *Orphanet journal of rare diseases*, 9(1), 1-9.
- Morava, E., Vodopiutz, J., Lefeber, D. J., Janecke, A. R., Schmidt, W. M., Lechner, S., ... & Wevers, R. A. (2012). Defining the phenotype in congenital disorder of glycosylation due to ALG1 mutations. *Pediatrics*, 130(4), e1034-e1039.
- Mühlhausen, C., Henneke, L., Schlotawa, L., Behme, D., Grüneberg, M., Gärtner, J., & Marquardt, T. (2020). Mannose phosphate isomerase deficiency-congenital disorder of glycosylation (MPI-CDG) with cerebral venous sinus thrombosis as first and only presenting symptom: A rare but treatable cause of thrombophilia. *JIMD reports*, 55(1), 38-43.
- Ng, B. G., & Freeze, H. H. (2018). Perspectives on glycosylation and its congenital disorders. *Trends in Genetics*, 34(6), 466-476.
- Noman, K., Hendriksz, C. J., Radcliffe, G., Roncaroli, F., Moreea, S., Hussain, A., & Stepien, K. M. (2020). Clinical outcomes in an adult patient with mannose phosphate isomerase-congenital disorder of glycosylation who discontinued mannose therapy. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, 25, 100646.
- Pajusalu, S., Vals, M. A., Mihkla, L., Šamarina, U., Kahre, T., & Õunap, K. (2021). The Estimated Prevalence of N-Linked Congenital Disorders of Glycosylation Across Various Populations Based on Allele Frequencies in General Population Databases. *Frontiers in genetics*, 12.
- Paprocka, J., Jezela-Stanek, A., Tylki-Szymańska, A., & Grunewald, S. (2021). Congenital Disorders of Glycosylation from a Neurological Perspective. *Brain Sciences*, 11(1), 88.
- Park, J. H., & Marquardt, T. (2021). Treatment Options in Congenital Disorders of Glycosylation. *Frontiers in Genetics*, 12.

- Park, J. H., & Marquardt, T. (2021). Treatment Options in Congenital Disorders of Glycosylation. *Frontiers in Genetics*, 12.
- Park, J. H., Mealer, R. G., Elias, A. F., Hoffmann, S., Grüneberg, M., Biskup, S., ... & Marquardt, T. (2020). N-glycome analysis detects dysglycosylation missed by conventional methods in SLC39A8 deficiency. *Journal of inherited metabolic disease*, 43(6), 1370-1381.
- Paul, A., & Padler-Karavani, V. (2018). Evolution of sialic acids: implications in xenotransplant biology. *Xenotransplantation*, 25(6), e12424.
- Pavone, L., Fiumara, A., Barone, R., Rizzo, R., Buttitta, P., Dobyns, W. B., & Jaeken, J. (1996). Olivopontocerebellar atrophy leading to recognition of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *Journal of neurology*, 243(10), 700-705.
- Peng, T., Lv, C., Tan, H., Huang, J., He, H., Wang, Y., ... & 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.
- Quelhas, D., Jaeken, J., Fortuna, A., Azevedo, L., Bandeira, A., Matthijs, G., & Martins, E. (2018). RFT1-CDG: absence of epilepsy and deafness in two patients with novel pathogenic variants. In *JIMD Reports, Volume 43* (pp. 111-116). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Quelhas, D., Martins, E., Azevedo, L., Bandeira, A., Diogo, L., Garcia, P., ... & Jaeken, J. (2021). Congenital Disorders of Glycosylation in Portugal—Two Decades of Experience. *The Journal of Pediatrics*, 231, 148-156.
- Radenkovic, S., Fitzpatrick-Schmidt, T., Byeon, S. K., Madugundu, A. K., Saraswat, M., Lichty, A., ... & Morava, E. (2021). Expanding the clinical and metabolic phenotype of DPM2 deficient congenital disorders of glycosylation. *Molecular genetics and metabolism*, 132(1), 27-37.
- Reily, C., Stewart, T. J., Renfrow, M. B., & Novak, J. (2019). Glycosylation in health and disease. *Nature Reviews Nephrology*, 15(6), 346-366.
- Reily, C., Stewart, T. J., Renfrow, M. B., & Novak, J. (2019). Glycosylation in health and disease. *Nature Reviews Nephrology*, 15(6), 346-366.
- Reily, C., Stewart, T. J., Renfrow, M. B., & Novak, J. (2019). Glycosylation in health and disease. *Nature Reviews Nephrology*, 15(6), 346-366.
- Riess, S., Reddiough, D. S., Howell, K. B., Dagia, C., Jaeken, J., Matthijs, G., & Yapfite-Lee, J. (2013). ALG3-CDG (CDG-Id): clinical, biochemical and molecular findings in two siblings. *Molecular genetics and metabolism*, 110(1-2), 170-175.
- Sarkozy, A., Torelli, S., Mein, R., Henderson, M., Phadke, R., Feng, L., ... & Muntoni, F. (2018). Mobility shift of beta-dystroglycan as a marker of GMPPB gene-related muscular dystrophy. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 89(7), 762-768
- Schoffer, K. L., O'Sullivan, J. D., & McGill, J. (2006). Congenital disorder of glycosylation type Ia presenting as early-onset cerebellar ataxia in an adult. *Movement disorders*, 21(6), 869-872.
- Schroeder, A. S., Kappler, M., Bonfert, M., Borggraefe, I., Schoen, C., & Reiter, K. (2010). Seizures and stupor during intravenous mannose therapy in a patient with CDG syndrome type 1b

- (MPI-CDG). *Journal of Inherited Metabolic Disease: Official Journal of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism*, 33, 497-502.
- 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.
- Seeberger, P. H. (2017). Monosaccharide diversity.
- Stanley, P., Taniguchi, N., & Aebi, M. (2017). N-glycans. *Essentials of Glycobiology [Internet]*. 3rd edition.
- Starosta, R. T., Boyer, S., Tahata, S., Raymond, K., Lee, H. E., Wolfe, L. A., ... & Morava, E. (2021). Liver manifestations in a cohort of 39 patients with congenital disorders of glycosylation: pin-pointing the characteristics of liver injury and proposing recommendations for follow-up. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 16(1), 1-12.
- Sun, L., Eklund, E. A., Van Hove, J. L., Freeze, H. H., & Thomas, J. A. (2005). Clinical and molecular characterization of the first adult congenital disorder of glycosylation (CDG) type Ic patient. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 137(1), 22-26.
- Sun, L., Shen, D., Xiong, T., Zhou, Z., Lu, X., & Cui, F. (2020). Limb-girdle muscular dystrophy due to GMPPB mutations: A case report and comprehensive literature review. *Bosnian journal of basic medical sciences*, 20(2), 275.
- Svahn, J., Laforêt, P., Vial, C., Streichenberger, N., Romero, N., Bouchet-Séraphin, C., ... & Stojkovic, T. (2019). Dilated cardiomyopathy and limb-girdle muscular dystrophy-dystroglycanopathy due to novel pathogenic variants in the DPM3 gene. *Neuromuscular Disorders*, 29(7), 497-502.
- Tahata, S., Gunderson, L., Lanpher, B., & Morava, E. (2019). Complex phenotypes in ALG12-congenital disorder of glycosylation (ALG12-CDG): Case series and review of the literature. *Molecular genetics and metabolism*, 128(4), 409-414.
- Tian, W. T., Luan, X. H., Zhou, H. Y., Zhang, C., Huang, X. J., Liu, X. L., ... & Cao, L. (2019). Congenital disorder of glycosylation type 1T with a novel truncated homozygous mutation in PGM1 gene and literature review. *Neuromuscular Disorders*, 29(4), 282-289
- Vals, M. A., Ashikov, A., Ilves, P., Loorits, D., Zeng, Q., Barone, R., ... & Öunap, K. (2019). Clinical, neuroradiological, and biochemical features of SLC35A2-CDG patients. *Journal of inherited metabolic disease*, 42(3), 553-564.
- Van den Boogert, M. A., Larsen, L. E., Ali, L., Kuil, S. D., Chong, P. L., Loregger, A., ... & Holleboom, A. G. (2019). N-glycosylation defects in humans lower low-density lipoprotein cholesterol through increased low-density lipoprotein receptor expression. *Circulation*, 140(4), 280-292.
- Van Scherpenzeel, M., Timal, S., Rymen, D., Hoischen, A., Wuhrer, M., Hipgrave-Ederveen, A., ... & Lefeber, D. J. (2014). Diagnostic serum glycosylation profile in patients with intellectual disability as a result of MAN1B1 deficiency. *Brain*, 137(4), 1030-1038.
- Van Scherpenzeel, M., Willems, E., & Lefeber, D. J. (2016). Clinical diagnostics and therapy monitoring in the congenital disorders of glycosylation. *Glycoconjugate journal*, 33(3), 345-358.

- van Tol, W., Michelakakis, H., Georgiadou, E., Van den Bergh, P., Moraitou, M., Papadimas, G. K., ... & Lefeber, D. J. (2019). Toward understanding tissue-specific symptoms in dolichol-phosphate-mannose synthesis disorders; insight from DPM3-CDG. *Journal of inherited metabolic disease*, 42(5), 984-992.
- Varki, A. (2011). Evolutionary forces shaping the Golgi glycosylation machinery: why cell surface glycans are universal to living cells. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(6), a005462.
- Varki, A. (2017). Biological roles of glycans. *Glycobiology*, 27(1), 3-49.
- Varki, A., & Gagneux, P. (2017). Biological functions of glycans.
- Varki, A., & Sharon, N. (2009). Chapter 1 Historical Background and Overview. *Essentials of Glycobiology*.
- 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*, 22(2), 268-279.
- 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*, 22(2), 268-279.
- Wheeler, P. G., Ng, B. G., Sanford, L., Sutton, V. R., Bartholomew, D. W., Pastore, M. T., ... & Freeze, H. H. (2016). SRD5A3-CDG: Expanding the phenotype of a congenital disorder of glycosylation with emphasis on adult onset features. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 170(12), 3165-3171
- Ząbczyńska, M., Kozłowska, K., & Pocheć, E. (2018). Glycosylation in the thyroid gland: vital aspects of glycoprotein function in thyrocyte physiology and thyroid disorders. *International journal of molecular sciences*, 19(9), 2792.
- Zhou, J. Y., Oswald, D. M., Oliva, K. D., Kreisman, L. S., & Cobb, B. A. (2018). The glycoscience of immunity. *Trends in immunology*, 39(7), 523-535.