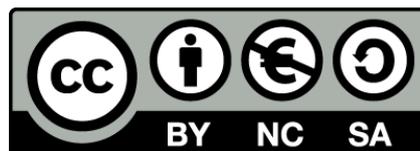




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Evaluación Cuantitativa Clínica y Radiológica en Pacientes PMM2-CDG a través de una Red Nacional de Profesionales

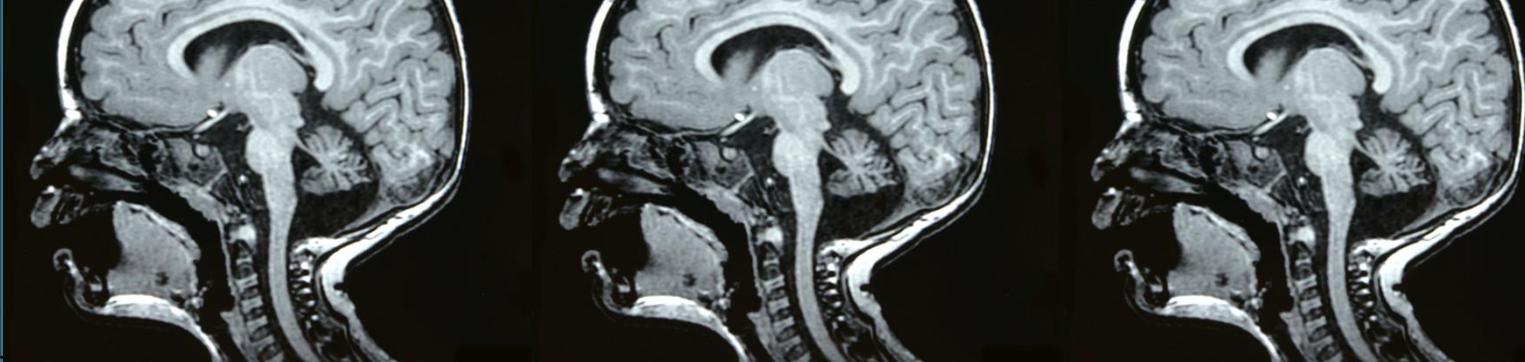
Víctor José De Diego Almarza



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – Compartir Igual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – Compartir Igual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License.**



TESIS DOCTORAL

Evaluación Cuantitativa Clínica y Radiológica en Pacientes PMM2-CDG a Través de una Red Nacional de Profesionales

Víctor José De Diego Almarza

Directora de tesis:
Dra. Mercedes Serrano Gimaré

Co-directora de tesis:
Dra. Belén Pérez Dueñas

Universidad de Barcelona, 2020



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas

Programa de Medicina e Investigación Traslacional, 2014-2020

**EVALUACIÓN CUANTITATIVA CLÍNICA Y RADIOLÓGICA
EN PACIENTES PMM2-CDG A TRAVÉS DE UNA RED
NACIONAL DE PROFESIONALES**

Memoria para optar al título de doctor por la Universidad de Barcelona

Presentada por:

Víctor José De Diego Almarza



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Realizada bajo la dirección de:

Dra. Mercedes Serrano Gimaré

Dra. Belén Pérez Dueñas

Tutor:

Dr. Ricardo Pedro Casaroli Marano

Barcelona, Julio de 2020

Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas

Facultad de Medicina

Universidad de Barcelona

Trabajo realizado en el Hospital Sant Joan de Déu

Esplugues de Llobregat, Barcelona

El interesado,

Víctor José De Diego Almarza

Visto bueno de los directores:

Dra. Mercedes Serrano Gimaré

Dra. Belén Pérez Dueñas

Agradecimientos

A nuestros pacientes y a sus familias, el motivo de todo.

A la Asociación Española de Síndrome CDG (AESCDG), y al Consorcio Español de CDG, por hacer posible esta investigación.

A Mercedes Serrano por sus ideas, paciencia y generosidad infinitas, y a Belén Pérez Dueñas por la oportunidad de trabajar en este proyecto y por sus ánimos incansables.

A mis compañeros del Master de Neuropediatría del H. Sant Joan de Déu, por todos los buenos ratos compartidos, e inolvidables.

A Jaume Campistol, por su impulso para hacernos mejorar a todos.

A Francisco Carratalá, por enseñarme a amar la ciencia y la neuropediatría.

A todos los neuropediatras, por su trabajo diario, difícil en ocasiones, pero tan gratificante en otras.

A mis padres, por enseñarme la importancia de la educación y transmitirme sus valores.

A Alicia, por su cariño sin límite y su apoyo constante, sin los cuales no lo habría conseguido.

Esta tesis ha podido realizarse gracias a las ayudas concedidas por la Sociedad Española de Neuropediatría (Beca SENEP 2014), por el Instituto de Salud Carlos III (Subvenciones para Proyectos de Investigación en Salud, 2013-2016, Expediente PI114/00021), y el Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona, a través del cual dispuse de un contrato de investigación entre junio de 2014 y mayo de 2015. La colaboración de los grupos de investigación CEDEM-UAM (Madrid) e IBC-HC (Barcelona) ha sido igualmente esencial para su desarrollo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	5
RESUMEN.....	9
INTRODUCCIÓN.....	11
1. Importancia de la glicosilación en los procesos biológicos celulares.....	12
1.1 Definición de glicosilación y perspectiva histórica	
1.2 Tipos de glucoconjugados	
1.3 Biología celular de la glicosilación	
1.4 Funciones biológicas de los glucoconjugados	
1.5 Trastornos de la glicosilación	
2. Trastornos congénitos de la glicosilación.....	23
3. Lesión cerebelosa en el cerebro en desarrollo.....	31
3.1 Anatomía, función y disfunción del cerebelo	
3.2 Ataxia de inicio precoz	
4. Escalas para la valoración de la ataxia cerebelosa en niños.....	37
5. Métodos neurorradiológicos para la estimación de las dimensiones del cerebelo.....	41
5.1 Métodos bidimensionales (2-D)	
5.2 Volumetría cerebelosa	
6. Déficit de fosfomanomutasa (PMM2-CDG).....	47
6.1 Introducción	
6.2 Espectro clínico	
6.3 Hallazgos radiológicos	
6.4 Diagnóstico	
6.5 Tratamiento	
JUSTIFICACIÓN DE LA UNIDAD TEMÁTICA E HIPÓTESIS.....	61
1. Justificación de la unidad temática.....	62
2. Hipótesis.....	63
OBJETIVOS.....	65
1. Objetivo principal.....	66
2. Objetivos concretos.....	66

PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS.....	69
1. Diseño.....	70
2. Sujetos de estudio.....	70
Pacientes	
Controles	
3. Evaluaciones y variables.....	72
Variables clínicas	
Estudios neurorradiológicos	
Estudios bioquímicos en sangre	
Estudios genéticos y funcionales	
Protocolos, material docente para familias, y cuestionarios para médicos y pacientes	
Análisis estadístico	
4. Aspectos éticos.....	78
 RESULTADOS.....	 79
1. Características de la población española con PMM2-CDG. Fenotipado clínico y neurológico de precisión.....	80
2. Publicaciones científicas.....	85
2.1 Aplicación de la escala ICARS para la valoración de la ataxia cerebelosa en pacientes con PMM2-CDG, y su correlación con los estudios de neuroimagen y las pruebas cognitivas.	
2.2 Evolución neurorradiológica de la atrofia cerebelosa en la PMM2-CDG cuantificada mediante medidas bidimensionales (MVRD) y volumetría.	
2.3 Evolución del síndrome cerebeloso en niños con PMM2-CDG.	
3. Protocolos de actuación.....	111
3.1 Protocolo diagnóstico en los defectos congénitos de la glicosilación.	
3.2 Manejo de los trastornos de la coagulación en pacientes con PMM2-CDG.	
4. Consolidación de un grupo de trabajo multicéntrico en CDG de ámbito nacional, el Consorcio Español en CDG.....	121
5. Participación en la red de investigación europea en trastornos congénitos de la glicosilación, “Euro-CDG”.....	123
6. Creación de contenidos y soporte <i>on-line</i> en CDG para familias y profesionales sanitarios: “RareCommons”.....	124
7. Comunicaciones a Congresos.....	132

DISCUSIÓN.....	133
CONCLUSIONES.....	155
BIBLIOGRAFÍA.....	157

ABREVIATURAS

2-D	Dos dimensiones
Aa	Aminoácido
AC	Atrofia cerebelosa
ACVs	Accidentes cerebrovasculares
AESCDG	Asociación española en Síndrome CDG
APOC3	Apolipoproteína C3
BARS	Escala breve para la medición de la ataxia
CAM	Molécula de adhesión celular
CD	Cluster de diferenciación
CDDG	Trastorno congénito de la deglicosilación
CDG	Trastorno congénito de la glicosilación
CEDEM	Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares
CGH-Array	Matriz de hibridación genómica comparativa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dol-P	Dolicol-fosfato
ECM	Enfermedad congénita del metabolismo
EOA	Ataxia de inicio precoz
EtNP	Etanolamina fosfato
FA	Fosfatasa alcalina
FARS	Escala para la medición de la Ataxia de Friedrich
FSH	Hormona foliculoestimulante
GAG	Glucosaminoglucano
GalNAc	N-Acetilgalactosamina
GBPs	Proteínas de unión de glucanos
GDNFR-α	Subunidad α del receptor del factor neutrofílico derivado de células gliales
GDP	Guanosín difosfato
GlcNAc	N-Acetilglucosamina
GPI	Glicofosfatidilinositol

GPI-APs	Proteínas ancladas a glicofosfatidilinositol
hCG	Gonadotropina coriónica humana
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HSJDBCN	Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona
ICARS	Escala internacional cooperativa de medición de la ataxia
IEF	Isoelectroenfoque
Ig	Inmunoglobulina
IGFBP	Proteína transportadora del factor de crecimiento insulínico 1
IGFR-1	Receptor del factor de crecimiento insulínico 1
IQ	Cociente intelectual
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LH	Hormona luteinizante
MICARS	Escala internacional cooperativa de medición de la ataxia modificada
MVRD	Diámetro relativo medio-sagital del vermis
N	Nitrógeno
NCAM	Molécula de adhesión celular neuronal
NGS	Secuenciación genética de nueva generación
NPCRS	Escala pediátrica de valoración de los CDG de Nijmegen
OH	Hidroxilo
PC	Perímetro craneal
PEATC	Potenciales evocados auditivos del tronco cerebral
PMM	Fosfomanomutasa
PMM2-CDG	Trastorno congénito de la glicosilación por déficit de fosfomanomutasa 2
PSGL-1	Ligando 1 de la glucoproteína P-selectina
QTOF-MS	Espectrometría de masas de tiempo de vuelo con cuadrupolo
RE	Retículo endoplasmático
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero

SARA	Escala para la valoración y medición de la ataxia
SCA	Ataxia espinocerebelosa
SNC	Sistema nervioso central
TAG	Glicoproteína axonal transitoria
TBG	Globulina transportadora de tiroxina
Tf	Transferrina
TSH	Hormona estimulante del tiroides
UDP-Gal	Uridina difosfato galactosa
VEGFR2	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2
WES	Secuenciación del exoma completo
WGS	Secuenciación del genoma completo

Se han incluido las abreviaturas presentes tanto en el texto, como en las tablas y figuras.

RESUMEN

La PMM2-CDG es una enfermedad genética minoritaria debida a mutaciones el gen *PMM2*. Este gen codifica la enzima fosfomanomutasa (PMM), que juega un papel fundamental en los primeros pasos de la N-glicosilación de proteínas a nivel del retículo endoplasmático celular. Por este motivo, los pacientes con PMM2-CDG muestran alteraciones en numerosas glucoproteínas (desde hormonas hasta factores de la coagulación, pasando por inmunoglobulinas o factores de crecimiento), y manifiestan una disfunción multisistémica con afectación preferente del cerebelo.

Esta lesión multisistémica tiene un mayor impacto durante los primeros meses de vida, mientras que más adelante son fundamentalmente el síndrome cerebeloso y los síntomas neurológicos los que determinan el pronóstico y el grado de discapacidad de los afectados.

A pesar de que existen más de 900 casos en el mundo con diagnóstico genético o enzimático confirmado, varios factores limitan los avances en el conocimiento de esta entidad. Por un lado, poco se sabe sobre su historia natural, especialmente sobre la evolución de la ataxia y de la atrofia cerebelosa. Esto supone un importante obstáculo para valorar la eficacia de futuros tratamientos, algunos de los cuales se encuentran ya en fase experimental. Por otro lado, con frecuencia existe una ausencia de estructuras nacionales de investigación en red en trastornos congénitos de la glicosilación, de herramientas basadas en internet que faciliten dichos estudios, o de protocolos para el manejo clínico de los enfermos en su día a día.

En este trabajo, se validaron métodos cuantitativos para la evaluación clínica (escala ICARS) y neurorradiológica (MVRD y volumetría) del síndrome cerebeloso. Estos métodos se emplearon más adelante para medir la evolución de la ataxia y de la atrofia cerebelosa en una cohorte de pacientes con la enfermedad. Adicionalmente, se recogió información detallada sobre su sintomatología general y neurológica (desarrollo psicomotor, capacidad intelectual, patrón de ataxia, epilepsia, neuropatía, etc.).

Los resultados mostraron que tanto la escala ICARS como el MVRD son métodos fiables en los pacientes con PMM2-CDG, para valorar la ataxia y la atrofia cerebelosa, respectivamente. En cuanto a su historia natural, se apreció un empeoramiento progresivo de la atrofia, más marcado en niños menores de 10 años de edad. Por el

contrario, el síndrome cerebeloso medido con la escala ICARS, mejoró una media de 2,64 puntos por año, indicando una evolución clínica favorable a pesar de la progresión de la atrofia.

A diferencia de lo comúnmente aceptado, algunos pacientes debutaron únicamente con sintomatología digestiva y, por primera vez en esta entidad, se describió un paciente adulto con episodios *stroke-like*. También por vez primera, se estudió el patrón de desarrollo psicomotor de los niños con PMM2-CDG, los cuales mostraron una afectación, de mayor a menor, en las áreas motora gruesa, motora fina y lenguaje expresivo, con esferas social y lenguaje comprensivo preservadas. Las mutaciones p.E93A, p.C241S, p.R162W y p.L32R se relacionaron con un fenotipo leve, mientras las mutaciones p.P113L, p.E139K, p.V129M y p.T237M, lo hicieron con manifestaciones más graves de la enfermedad.

Adicionalmente, se desarrollaron protocolos clínicos, se estableció el Consorcio Español en CDG, y se implementó una plataforma on-line para la investigación colaborativa en red (www.rarecommons.org), con los objetivos de optimizar el manejo, avanzar en el conocimiento, y mejorar la calidad de vida de los pacientes con trastornos congénitos de la glicosilación en nuestro país.

INTRODUCCIÓN

1- Importancia de la glicosilación en los procesos biológicos celulares.

1.1 Definición de glicosilación y perspectiva histórica.

1.2 Tipos de glucoconjugados.

1.3 Biología celular de la glicosilación.

1.4 Funciones biológicas de los glucoconjugados.

1.5 Trastornos de la glicosilación.

2- Trastornos congénitos de la glicosilación.

3- Lesión cerebelosa en el cerebro en desarrollo.

3.1 Anatomía, función y disfunción del cerebelo.

3.2 Ataxia de inicio precoz.

4- Escalas para la valoración de la ataxia cerebelosa en niños.

5- Métodos neurorradiológicos para la estimación de las dimensiones del cerebelo.

5.1 Métodos bidimensionales (2-D).

5.2 Volumetría cerebelosa.

6- Déficit de fosfomanomutasa (PMM2-CDG).

6.1 Introducción.

6.2 Espectro clínico.

6.3 Hallazgos radiológicos.

6.4 Diagnóstico.

6.5 Tratamiento.

1. Importancia de la glicosilación en los procesos biológicos celulares

1.1. Definición de glicosilación y perspectiva histórica

La **glicobiología** es el estudio de la biosíntesis, estructura, biología y evolución de los glúcidos (también llamados hidratos de carbono, carbohidratos, sacáridos, glucanos o azúcares). Los glúcidos representan el tipo más abundante de biomoléculas de nuestro planeta, existentes en número mucho mayor que proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y vitaminas. Además, su diversidad estructural y funcional no tiene parangón con la de las restantes moléculas biológicas. Así, los carbohidratos llevan a cabo múltiples funciones, sirviendo como fuente energética (glucosa, lactosa, glucógeno), como componente estructural (celulosa, quitina, esqueleto de cadenas de DNA y RNA, ácido hialurónico), y como transmisores de información (glucoproteínas de membrana, glucoproteínas transportadoras, etc.).

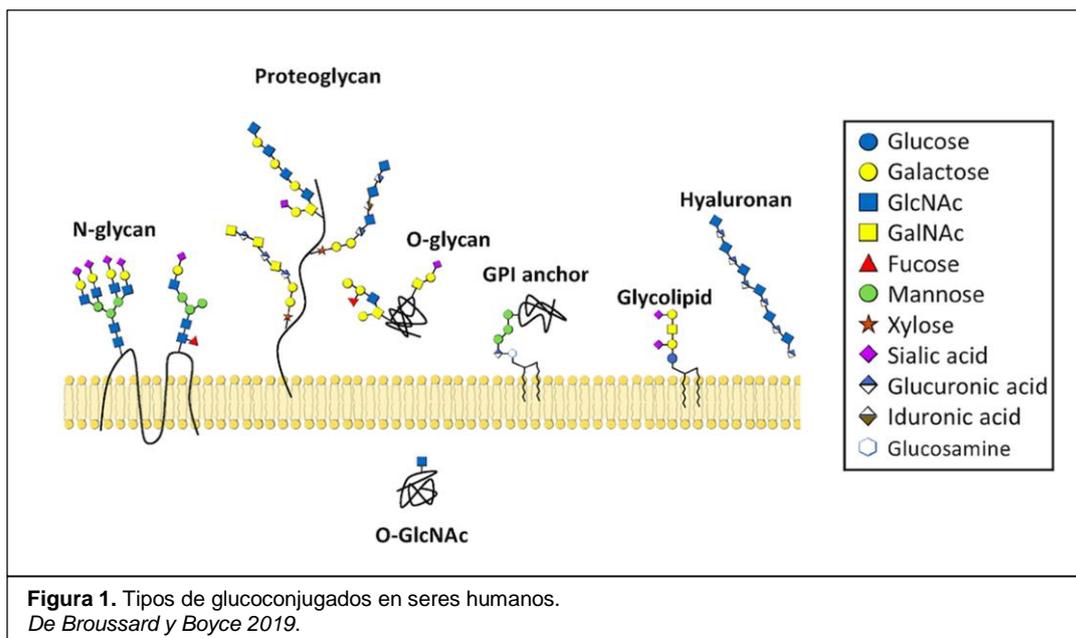
Definimos como **glicosilación** al proceso metabólico dependiente de enzimas, dónde los glúcidos (en forma de monosacáridos, llamados glucones) se unen mediante un enlace covalente a una molécula aceptora, que puede ser una proteína o un lípido (llamada aglucón), dando lugar a glicoproteínas o glicolípidos (Ng y Freeze 2018). Estas moléculas combinadas con una parte glucídica y otra parte de proteína o lipídica, se denominan **glucoconjugados**.

La glicosilación tiene una importancia fundamental en el funcionamiento celular, tisular y de los organismos complejos (como el ser humano). Constituye el proceso más importante y complejo de modificación de proteínas y lípidos, dándose en todas las especies (Bertozzi y Rabuka 2009). Se calcula que en ella están implicados el 1-2% de los genes humanos (Schachter y Freeze 2009) de forma que alrededor de la mitad de las proteínas se encuentran glicosiladas (Apweiler *et al.* 1999).

Durante la mayor parte del siglo XX la glicosilación fue un proceso en gran medida desconocido. Hasta la década de 1990, el conocimiento científico sobre los hidratos de carbono estuvo limitado a su función energética-nutricional (ej. estudio del metabolismo de la glucosa, fructosa y galactosa, gluconeogénesis, glucogenolisis) junto con su papel en algunos roles estructurales (celulosa, quitina, etc.). Incluso durante la revolución de la biología molecular de los años 70 y 80, los estudios sobre glúcidos se mantuvieron atrasados en comparación con los del resto de las principales moléculas. Esto se produjo fundamentalmente por dos motivos: el primero, que su diversidad y complejidad

inherentes dificultaban mucho su estudio (las glucoproteínas y los glucolípidos pueden constituir estructuras intrincadas y muy heterogéneas); el segundo, es que no formaban parte del “dogma central de la biología molecular”, según el cual la información en las células se transmite del DNA al RNA y de éste a las proteínas, de una forma unidireccional y secuencial (siempre de DNA a proteína y siguiendo una determinada secuencia de nucleótidos o aminoácidos) (Crick 1970). Por estos motivos, de alguna manera quedaron relegados fuera del foco de interés de la época.

A pesar de las mencionadas dificultades, a partir de los años 90 y especialmente durante las primeras dos décadas del siglo XXI, gracias a los avances en química de los carbohidratos, bioquímica, espectrometría de masas, biología estructural, sistemas biológicos y genética, han mejorado exponencialmente los conocimientos en glicobiología (Everest-Dass *et al.* 2018). Fundamentales para dilucidar algunas de las funciones de los complejos glucídicos, han sido los estudios sobre las consecuencias de mutaciones inducidas en modelos animales (Aebi y Hennet 2001, Stanley 2016), y los modelos naturales en enfermedades humanas (Péanne *et al.* 2018, Ng y Freeze 2018). En este sentido, puede decirse que gran parte del desarrollo reciente de la glicobiología ha estado vinculado al progreso en trastornos congénitos de la glicosilación.



1.2. Tipos de Glucoconjugados

Existen varias **clases de glucoconjugados**, los cuales se clasifican en función del **tipo de molécula con la que se unen** o aglucón (proteína o lípido), y según el **tipo de enlace** con el que se asocian (enlace N-glucosídico, O-glucosídico, etc.).

TIPOS DE GLUCOCONJUGADOS SEGÚN LA MOLÉCULA ASOCIADA AL GLÚCIDO

(ver **Figura 1**):

(1) GLÚCIDOS CON PROTEÍNAS:

a) **PROTEOGLUCANOS:** Se forman a partir de la unión de una o varias cadenas de glucosaminoglucanos (también llamados mucopolisacáridos), a una proteína núcleo. Los proteoglucanos se diferencian de las glucoproteínas en que en ellos más del 90% del peso molecular corresponde a los glúcidos, mientras que en las glucoproteínas es la proteína la que constituye la mayor parte del peso del glucoconjugado. Existen diferentes tipos de glucosaminoglucanos (condroitín sulfato, dermatán sulfato, heparán sulfato, queratán sulfato), que están formados por largas cadenas de disacáridos repetidos. A su vez, los diferentes tipos de proteoglucanos (versicano, perlecano, neurocano, agrecano), se diferencian entre ellos en el tipo de glucosaminoglucanos y de núcleos protéicos que los componen. En ocasiones, varios proteoglucanos se unen a otras moléculas (como el ac. hialurónico o el colágeno) para formar grandes complejos (complejos de proteoglucanos) que pueden llegar a ser tan grandes como algunas bacterias. Los proteoglucanos constituyen un componente esencial de la matriz extracelular del hueso, cartílago, córnea y otros tejidos. Pueden estar constituidos por enlaces O-glucosídicos (la mayoría) o N-glucosídicos (ej: queratán sulfato I).

b) **GLUCOPROTEÍNAS:** Son moléculas compuestas por uno o varios glucanos (normalmente formando cadenas ramificadas) unidos covalentemente a una proteína. En ellas la zona proteica constituye la mayor parte del peso molecular del glucoconjugado. Las encontramos en la cara externa de la membrana plasmática celular como parte del glucocálix, en la matriz extracelular, en la sangre, en el citosol, o incluso en el núcleo celular. Se consideran el tipo más importante de glucoconjugados por la gran variedad de funciones que desempeñan: como inmunoglobulinas, hormonas (FSH, LH), proteínas de membrana (ej. glicoforina), factores de la coagulación, proteínas transportadoras (ej. transferrina), enzimas, etc. Las glucoproteínas pueden formarse por enlaces N- u O-glucosídicos, así como por enlaces C-manosídicos.

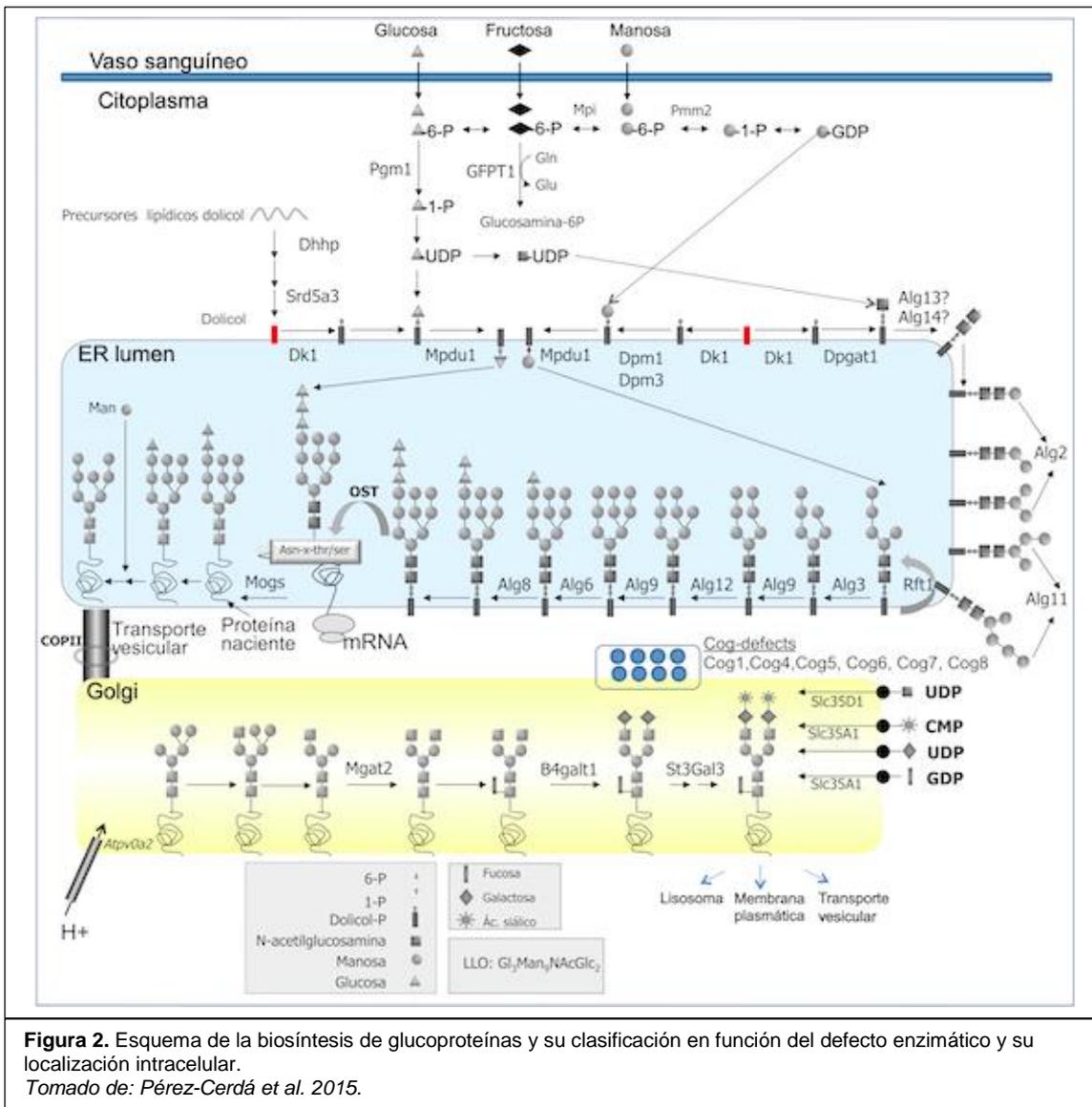


Figura 2. Esquema de la biosíntesis de glucoproteínas y su clasificación en función del defecto enzimático y su localización intracelular.

Tomado de: Pérez-Cerdá et al. 2015.

(2) GLÚCIDOS CON LÍPIDOS:

a) GLUCOLÍPIDOS:

a.1) Anclaje Glicofosfatidilinositol (GPI): El anclaje GPI es una molécula compuesta por 3 elementos: una molécula de fosfatidilinositol, una fosfoetanolamina, y un oligosacárido. En esencia se trata de una estructura que permite el enlace entre un lípido de membrana (el fosfatidilinositol) y una proteína, facultando que proteínas que por su estructura no pueden quedar embebidas en la membrana, se mantengan unidas a ella. Las proteínas ancladas a GPI (GPI-APs) cumplen múltiples roles en la membrana celular, dónde actúan como enzimas hidrolíticas, moléculas de adhesión, receptores de membrana, reguladores del sistema del complemento, etc.

a.2) Glucoesfingolípidos: Se distinguen 2 clases de lípidos de membrana (o esfingolípidos): los fosfolípidos, también llamados esfingomielinas (ceramida + fósforo) y los glucoesfingolípidos (ceramida + glúcido). Así mismo, existen 3 tipos de glucoesfingolípidos: cerebrósidos, globósidos y gangliósidos. Los tres constituyen componentes esenciales de las membranas plasmáticas, especialmente en el sistema nervioso, donde actúan como componentes estructurales (ej. vainas de mielina), o como receptores. Ejemplos de enfermedades originadas por defectos en la biosíntesis de glucoesfingolípidos son ST3GAL5-CDG y B4GALNT1-CDG. Ejemplos de enfermedades causadas por defectos en la degradación de glucoesfingolípidos, son las esfingolipidosis, un grupo de enfermedades lisosomales que en ocasiones son enmarcadas dentro de los trastornos de la glicosilación (Freeze *et al.* 2017).

TIPOS DE GLUCOCONJUGADOS SEGÚN SUS ENLACES QUÍMICOS:

(1) GLÚCIDOS CON PROTEÍNAS:

Los glucanos se unen a las proteínas mediante diferentes tipos de enlaces:

- ENLACES N-GLUCOSÍDICOS: Consisten en la unión de un carbohidrato (habitualmente una cadena de glúcidos) con un átomo de nitrógeno (N) de un aminoácido (habitualmente asparagina) el cual se encuentra a su vez formando parte de una cadena polipeptídica. Al proceso de formación de glucoproteínas y proteoglucanos con este tipo de uniones se le denomina N-Glicosilación. En células eucariotas, el glúcido que se une a la asparagina suele ser GlcNAc. Ejemplos de glucoconjugados con enlaces N-glucosídicos son las glucoproteínas N-glucosiladas (como TSH, FSH, LH, transferrina, ceruloplasmina, inmunoglobulinas, α -1-antitripsina, antitrombina, factor V, factor VIII), así como algunos proteoglucanos.

- ENLACES O-GLUCOSÍDICOS: Se producen cuando un carbohidrato (habitualmente una cadena de glúcidos) se une al grupo hidroxilo (OH) de un aminoácido (normalmente serina o treonina) de una cadena polipeptídica. Al proceso de formación de glucoproteínas y proteoglucanos con este tipo de uniones se le denomina O-Glicosilación. Ejemplos de proteínas O-glucosiladas son la mayoría de proteoglucanos y múltiples glucoproteínas (hCG, uroquinasa, mucinas, APOC3, colágeno, α -dístroglicano, antígenos ABO, etc.).

- ENLACES C-MANOSÍDICOS: Aparecen a partir de la unión de un átomo de carbono del monosacárido manosa, con otro átomo de carbono del aminoácido triptófano. Glucoproteínas con este tipo de glicosilación son la RNasa 2, la trombospondina 1 (proteína antiangiogénica) o la properdina (reguladora del sistema del complemento).

(2) GLÚCIDOS CON LÍPIDOS:

Los enlaces entre glúcidos y lípidos son en general más complejos y están peor caracterizados que los de glucoproteínas y proteoglucanos.

- **ENLACES CON EL ANCLAJE GPI:** En el anclaje GPI, el glúcido (una cadena de manosas y una N-glucosamina), está unido por un lado a una molécula lipídica y por otro lado a una molécula de etanolamina fosfato (EtNP). En el lado lipídico la unión se produce a través de un enlace α 1-6 con el grupo D-myo-inositol de una molécula de fosfatidilinositol. En el lado proteico, el enlace se produce entre un grupo OH de una manosa y la molécula de etanolamina, la cual a su vez se unirá a un aminoácido de la cadena polipeptídica correspondiente.

- **ENLACES EN GLUCOESFINGOLÍPIDOS:** En los glucoesfingolípidos, la unión entre la molécula de ceramida y el glúcido (normalmente galactosa o glucosa) se produce mediante un enlace de tipo β entre uno de los grupos OH de la ceramida y un grupo OH del monosacárido adyacente.

1.3. Biología celular de la glicosilación

Algunas de las enfermedades congénitas del metabolismo (ECM), se clasifican tradicionalmente según el tipo de organela celular en la que actúa la enzima o sistema metabólico alterado. Así podemos encontrar, enfermedades mitocondriales, lisosomales o peroxisomales (Saudubray *et al.* 2016). Siguiendo este esquema, los trastornos congénitos de la glicosilación (CDG) podrían encuadrarse como enfermedades del Retículo Endoplasmático (RE) y del Aparato de Golgi, es decir de la vía metabólica RE-Golgi. Una de las principales funciones de esta vía, es la glicosilación de proteínas y lípidos, dónde a dichas moléculas se les añaden diferentes cadenas de monosacáridos de forma secuencial mientras transitan por los diferentes compartimentos de estas dos organelas, de forma similar a lo que ocurre en una cadena de montaje (**figura 2**). La mayoría de estas reacciones son catalizadas por 2 tipos de enzimas, glucosidasas y glucosiltransferasas (Moremen *et al.* 2012, Varki 2017).

Como el resto de los componentes celulares, los glucanos se renuevan constantemente. Si los glucoconjugados se encuentran unidos a la membrana externa o junto a la superficie celular son absorbidos por endocitosis para ser transportados después a los lisosomas. Si se encuentran en el citoplasma o en el núcleo, son trasladados directamente a los lisosomas. En cualquier caso, una vez en los lisosomas, son degradados de forma progresiva por una serie de hidrolasas que los separan de su

aglucon (endoglicosidasas) para después degradar las cadenas de glúcidos (exoglicosidasas) (Winchester 2005). Finalmente, los monosacáridos resultantes son exportados al citoplasma para que puedan ser reutilizados.

1.4. Funciones Biológicas de los glucoconjugados

Tabla 1. *Funciones biológicas de los glucoconjugados (adaptado de Varki 2017)*

Funciones estructurales y moduladoras
<ul style="list-style-type: none"> - Estructura física - Protección - Solubilidad de macromoléculas - Expulsión física de patógenos - Plegamiento de glucoproteínas - Estructuración de la membrana - Acción anti-adhesiva - Estructuración de la matriz extracelular - Protección frente al reconocimiento inmune - Función de “interruptor” molecular - Modificación epigenética de histonas
Funciones de reconocimiento molecular
<ul style="list-style-type: none"> - Plegamiento y degradación intracelular de glucoproteínas - Tráfico intracelular de glucoproteínas - Inicio de endocitosis y fagocitosis - Señalización intercelular - Adhesión intercelular - Interacción célula-matriz extracelular - Reproducción y fertilización - Aclaramiento de glucoconjugados dañados - Epítomos antigénicos.

Las fuerzas biológicas que gobiernan la formación de la amplia variedad de glucoconjugados que podemos observar, probablemente reflejan una estrategia que han desarrollado múltiples organismos para generar diversidad a partir de un número limitado de proteínas y lípidos (Broussard y Boyce 2019). De esta manera, igual que de un género biológico (ej. género canis) derivan varias especies (ej. perro, lobo, chacal) de un género proteico o lipídico pueden derivar varias glicofomas o “especies proteicas o lipídicas” (ej. diferentes glicofomas de IgG1 o de alfa-1-antitripsina) (Rosenlöcher *et al* 2016), cada una de ellas ejerciendo funciones distintas y expresándose en diferente cantidad según el tipo de célula y tejido del que se trate.

Las funciones biológicas de los glucoconjugados se dividen en 2 grandes categorías: 1) Función estructural y moduladora; 2) Función de reconocimiento específico por otras moléculas (fundamentalmente por proteínas de unión a glucanos, GBPs en inglés) (Varki 2017) (**Tabla 1**).

Como consecuencia de su ubicuidad y variedad de funciones biológicas, los glucoconjugados cumplen también diversos cometidos en la fisiología de los órganos y sistemas de los vertebrados. En la **tabla 2**, se describen algunos ejemplos.

Tabla 2. *Algunas funciones fisiológicas de los glucoconjugados (Ohtsubo et al. 2011, Hansson et al. 2012, Live et al. 2013, Macauley et al. 2014, Mi et al. 2014, Whitsett et al. 2015).*

ÓRGANO/ SISTEMA	FUNCIONES (ejemplos)
REPRODUCCIÓN	<ul style="list-style-type: none"> - Interacción esperma - mucosa trompas de Falopio. - Adhesión embrión-endometrio. - Glucoconjugados específicos en leche materna.
HEMATOLOGÍA	<ul style="list-style-type: none"> - Grupos sanguíneos (proteínas O-glucosiladas). - Adhesión endotelial y migración de leucocitos hacia tejidos. - Estabilización de mayoría de glucoproteínas plasmáticas (ej: factores coagulación)
INMUNOLOGÍA	<ul style="list-style-type: none"> - Diferenciación, adhesión y supervivencia de linfocitos y monocitos. - Glucanos como componentes clave de epítopos antigénicos de proteínas. - Modificación del dominio Fc de IgG, alterando sus funciones efectoras.
SISTEMA CARDIOVASCULAR	<ul style="list-style-type: none"> - Desarrollo cardíaco y angiogénesis, por parte de GAGs. - Función e integridad estructural de miocardio y pared vascular.
SISTEMA RESPIRATORIO	<ul style="list-style-type: none"> - Barrera e hidratación de superficies de mucosas (mucinas). - Mantenimiento estructural de pared alveolar.
ENDOCRINOLOGÍA	<ul style="list-style-type: none"> - Regulación de la acción de insulina por O-GlcNAc. - Función de hormonas tiroideas (hormonas glucosiladas). - Aclaramiento de hormonas glucosiladas en hígado.
GASTROENTEROLOGÍA	<ul style="list-style-type: none"> - Barrera física de mucina del intestino. - Interacción con microorganismos saprófitos y patógenos del tracto gastrointestinal. - Función de barrera permeable del heparán sulfato en membrana basal del intestino.
HEPATOLOGÍA	<ul style="list-style-type: none"> - Secreción de proteínas N-glucosiladas a plasma. - Aclaramiento de lipoproteínas mediante proteoglucanos.
NEFROLOGÍA	<ul style="list-style-type: none"> - Función filtrado en membrana basal glomerular. - Barrera física de mucina en uréteres y vejiga.
PIEL	<ul style="list-style-type: none"> - Mantenimiento de la función de barrera, elasticidad y capacidad de cicatrización de la piel.
SISTEMA MUSCULOESQUELÉTICO	<ul style="list-style-type: none"> - Unión sarcolema a matriz extracelular (laminina). - Componentes de placa motora. - Componentes esenciales de cartílago y hueso.
SISTEMA NERVIOSO	<ul style="list-style-type: none"> - Papel crítico de N-glucanos y Proteoglucanos en desarrollo, organización y plasticidad del sistema nervioso, especialmente durante la embriogénesis. - Formando vainas de mielina (cerebrósidos) y terminaciones nerviosas (gangliósidos). - Regeneración neuronal tras lesión.

1.5. Trastornos de la Glicosilación

En sentido amplio, los trastornos congénitos de la glicosilación (CDG) son únicamente un grupo dentro del conjunto de los trastornos de la glicosilación. Estos últimos engloban tanto defectos con hipoglicosilación (CDG, galactosemia) como con hiperglicosilación

(algunas enfermedades lisosomales), y pueden ser genéticos (CDG, intolerancia hereditaria a la fructosa) o adquiridos (hemoglobinuria paroxística nocturna, alcoholismo) (Jaeken y Péanne 2017). En la **tabla 3**, se muestra su clasificación de forma esquemática.

Tabla 3. Clasificación general de los trastornos de la glicosilación (adaptado de Jaeken y Péanne 2017).

TRASTORNOS CON HIPOGLICOSILACIÓN		
GENÉTICOS	Primarios	- CDGs.
	Secundarios	- Galactosemia. - Intolerancia hereditaria a la fructosa
ADQUIRIDOS	Causas Internas	- Hemoglobinuria paroxística nocturna. - Cáncer.
	Causas Externas	- Alcoholismo. - Infecciones.
TRASTORNOS CON HIPERGLICOSILACIÓN		
GENÉTICOS	Mutaciones con Aumento de Glicosilación	- Micobacteriosis atípica en pacientes con mutaciones en <i>IFNGR2</i> . - Déficit de Antitrombina por mutaciones en <i>SERPINC1</i> .
	Mutaciones con Defecto de Deglicosilación	- Déficit de N-glicanasa 1 (NGLY1-CDDG). - Varias enfermedades lisosomales (mucopolisacaridosis, oligosacaridosis y esfingolipidosis).

Los trastornos genéticos con hipoglicosilación están divididos en primarios o secundarios. En los trastornos primarios, existe una alteración genética (normalmente mutaciones con herencia autosómica recesiva) que afecta a un gen directamente relacionado con la síntesis de glucoproteínas o glucolípidos. Estos trastornos genéticos y primarios con hipoglicosilación, son los CDG (Jaeken 2013). Existen también unos trastornos genéticos secundarios con hipoglicosilación, en los cuales las mutaciones afectan a genes no directamente implicados en la síntesis de glucoconjugados, pero cuya alteración produce de forma colateral defectos en la unión de glúcidos a proteínas y lípidos. Este es el caso de la galactosemia por déficit de GALT, en la cual se produce carencia de uridina difosfato galactosa (UDP-Gal), la cual es necesaria para la formación de glucanos galactosilados. Esto conlleva la hipogalactosilación de múltiples glicoproteínas y glicolípidos en algunos pacientes con esta enfermedad (Ng *et al.* 1989, Lai *et al.* 2003). Algo similar ocurre en la intolerancia hereditaria a la fructosa, en la que se acumula el sustrato fructosa-1 fosfato, la cual inhibe una enzima fundamental en los

primeros pasos del proceso de N-glicosilación de proteínas, la manosa-6-fosfato isomerasa (MPI) dando lugar a hipoglicosilación de la transferrina, entre otras (Jaeken *et al.* 1996).

Tabla 4. Alteraciones de la glicosilación en células cancerosas.

- Incremento de la ramificación de β 1-6GlcNAc N-glucanos.
- Cambios en la cantidad, enlaces y acetilación de los ác. siálicos.
- Acortamiento de O-glucanos.
- Expresión de ácido siálico de origen no humano (proveniente de la dieta).
- Expresión de estructuras Lewis y selectinas sializadas.
- Expresión alterada e incremento de la degradación de glucoesfingolípidos.
- Aumento de la expresión de galectinas y poli-N-acetilactosaminas.
- Alteración de la expresión de estructuras relacionadas con los grupos sanguíneos ABO.
- Alteración de la sulfatación de glucosaminoglucanos.
- Aumento de la expresión de ác. hialurónico.
- Aumento de la expresión de la enzima que une los anclajes GPI a las proteínas.
- Incremento de la O-N-acetilglucosaminación de proteínas.

Un grupo de patologías de gran importancia por su prevalencia, en las que encontramos hipoglicosilación de causas adquiridas e internas (de base genética), son las neoplasias malignas. En todos los tipos de cáncer, las células muestran alteraciones de los glucoconjugados, aunque algunos cambios son especialmente frecuentes (**tabla 4**). Varias de estas modificaciones se han mostrado relevantes desde el punto de vista fisiopatológico, y algunas se están investigando como dianas diagnósticas y terapéuticas (Fuster y Esko 2005, Pinho y Reis 2015).

La hipoglicosilación también puede aparecer exclusivamente por causas adquiridas sin componente genético (externas). Esto es lo que ocurre en el alcoholismo (Gravel *et al.* 1996; Casey *et al.* 2016) o algunas infecciones, como la gripe (Huang *et al.* 2008).

Por otro lado, existen también un grupo de trastornos genéticos en los que se produce hiperglicosilación. Dentro de estas enfermedades, se han descrito diversas mutaciones que alteran la secuencia de la proteína de la que se trate, de tal manera que crean un nuevo sitio para la unión de glicanos. Así, cadenas de glúcidos que no deberían estar en esa zona, se asocian a la proteína, dando N-glucanos patogénicos que alteran la función del polipéptido. Ejemplo de esto son ciertas mutaciones en el gen *IFNGR2* que codifica para la cadena γ R2 del receptor del INF- γ , en las que se asocia un N-glucano patogénico que impide que dicho receptor responda a INF- γ , apareciendo un tipo de

inmunodeficiencia con predisposición a infecciones graves por micobacterias (Vogt *et al.* 2007).

Finalmente, también puede existir hiperglicosilación de causa genética por mutaciones que afectan a los sistemas celulares de degradación y eliminación de las cadenas de glucanos de los glucoconjugados. En 2016 se publicó el primer defecto congénito de la deglicosilación (CDDG), el déficit de N-glicanasa 1 (NGLY1-CDDG) (Lam *et al.* 2016). Finalmente, algunos autores también incluyen a ciertas enfermedades lisosomales (varias mucopolisacaridosis, oligosacaridosis y esfingolipidosis) como trastornos con hiperglicosilación de origen genético por defectos en la deglicosilación (Freeze *et al.* 2017). Esto se debe a que, aunque ciertas enfermedades lisosomales se originan por alteraciones en las enzimas que degradan proteínas (proteasas) o lípidos (lipasas), otras muchas tienen su causa en defectos en las exoglucosidasas o endoglucosidasas (Winchester 2005), enzimas encargadas de separar y degradar las cadenas de glúcidos de los glucosaminoglucanos, glucoproteínas y glucolípidos (ej. mucopolisacaridosis I a IX, manosidosis, sialidosis, gangliosidosis GM1/GM2, Fabry, Gaucher, Krabbe, etc.).

2. Trastornos congénitos de la glicosilación

Los trastornos congénitos de la glicosilación (CDG) constituyen un grupo de enfermedades genéticas, congénitas y primarias caracterizadas por la hipoglicosilación de diversas proteínas y lípidos (ver **tabla 3**). Se deben a alteraciones en genes que codifican glicosiltransferasas, glicosidasas, transportadores de monosacáridos, moléculas implicadas en el tráfico vesicular, o moléculas relacionadas con el mantenimiento de la homeostasis del pH o del manganeso en las organelas celulares implicadas en la glicosilación (Péanne *et al.* 2018). Como se ha comentado en el apartado anterior, estas organelas o compartimentos celulares donde actúan las enzimas y transportadores afectados, son fundamentalmente tres: el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi y el citosol (Pérez-Cerdá *et al.* 2017). No se conocen todos los tipos de glucoproteínas y glucolípidos que existen, todas sus funciones, ni todos los genes implicados en la glicosilación. En la **tabla 5** se exponen algunos ejemplos de glucoconjugados en seres humanos.

La mayoría de los CDG presentan un patrón de herencia autosómico recesivo, en el que el paciente ha heredado una mutación de cada progenitor. Sin embargo, también se han descrito trastornos congénitos de la glicosilación de herencia autosómica dominante (EXT1-CDG, EXT2-CDG, GANAB-CDG, POFUT1-CDG, POGLUT1-CDG, PRKCSH-CDG, SEC63-CDG, síndrome de Saul-Wilson) o ligada a X (ALG13-CDG, ATP6AP1-CDG, ATP6AP2-CDG, OGT-CDG, PIGA-CDG, SLC9A7-CDG, SLC35A2-CDG, SSR4-CDG y VMA21-CDG) (Francisco *et al.* 2018). Las mutaciones recesivas pueden ser heredadas (lo habitual) o *de novo*. En cambio, la mayor parte de las mutaciones dominantes y ligadas a X suelen ser *de novo* (Chang *et al.* 2018).

La clasificación más utilizada y aceptada, divide los CDG en cuatro categorías: defectos genéticos (1) de la N-glicosilación de proteínas, (2) de la O-glicosilación de proteínas, (3) de la glicosilación de lípidos o del anclaje GPI, (4) combinados de varias rutas de la glicosilación (Jaeken 2011). También se han propuesto otras clasificaciones, quizá más complejas, en las que se divide a los trastornos de la O-glicosilación en varios subgrupos (O-fucosilación/O-glucosilación, O-N-acetilgalactosilación/O-N-acetilglucosilación, distroglicanopatías, defectos de la síntesis de GAGs) y que no contemplan los defectos combinados como un grupo individual (Ng y Freeze 2018).

Desde que en 1980 se describiese la CDG-Ia (más tarde conocida como PMM2-CDG), como el primer trastorno congénito de la glicosilación (Jaeken *et al.* 1980, Jaeken *et al.*

Tabla 5. Principales tipos de glucoconjugados, enlaces de unión glúcido-aglucón, y ejemplos de moléculas representativas en seres humanos.

GLUCOCONJUGADO	ENLACES	EJEMPLOS
PROTEOGLUCANOS	<ul style="list-style-type: none"> • O-glucosídicos (la mayoría) • N-glucosídicos 	<ul style="list-style-type: none"> - Versicán (núcleo proteico + GAGs: condroitín sulfato/dermatán sulfato). - Perlecán (núcleo proteico + GAGs: heparán sulfato/condroitín sulfato). - Neurocán/ Agrecán/ Brevicán (núcleo proteico + GAG condroitín sulfato). - Fibromodulina/ Lomicán (núcleo proteico + GAG queratán sulfato).
GLUCOPROTEÍNAS N-GLUCOSILADAS	<ul style="list-style-type: none"> • N-glucosídicos 	<ul style="list-style-type: none"> - Glicoforina, VEGFR2, CD71, CD29, CD 221, CD98, receptores Notch. - TSH, FSH, LH, IGFR-1, IGFBP. - Transferrina, ceruloplasmina, haptoglobina. - IgG, IgM, IgA, IgE, IgD. - α-1-antitripsina. - Antitrombina, fibrinógeno, factor V, factor VIII.
GLUCOPROTEÍNAS O-GLUCOSILADAS	<ul style="list-style-type: none"> • O-glucosídicos 	<ul style="list-style-type: none"> - hCG, adiponectina. - Uroquinasa, factor VII, factor IX, factor XII, proteína Z. - Mucinas, ciertas proteínas del surfactante, APOC3. - Colágeno. - α-dístroglicano, receptor LDL, PSGL-1, antígenos sanguíneos ABO. - Proteínas O-GlcNAc glucosiladas (epigenética).
ANCLAJE GPI	<ul style="list-style-type: none"> • Con lípido: enlace α1-6 con αD-myo-inositol. • Con proteína: enlace manosa—etanolamina—aa. 	<p>Proteínas ancladas a GPI:</p> <ul style="list-style-type: none"> - CD14, CD58, CD59, fosfatasa alcalina, 5'-Nucleotidasa, NCAM120, CAM TAG-1, GDNFR-α, dipeptidasa renal, glipicanos.
GLUCOESFINGOLÍPIDOS	<ul style="list-style-type: none"> • Enlace β entre OH de ceramida y OH de monosacárido. 	<ul style="list-style-type: none"> - Cerebrósidos. - Globósidos. - Gangliósidos.
<p>Abreviaturas. GAG: Glucosaminoglucanos; VEGFR2: receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2; CD: cluster de diferenciación; TSH: hormona estimulante del tiroides; FSH: hormona foliculoestimulante; LH: hormona luteinizante; IGFR-1: receptor del factor de crecimiento insulínico 1; IGFBP: proteína transportadora del factor de crecimiento insulínico 1; Ig: inmunoglobulina; hCG: gonadotropina coriónica humana; APOC3: apolipoproteína C3; LDL: lipoproteína de baja densidad; PSGL-1: ligando 1 de la glucoproteína P-selectina; GlcNAc: N-acetilglucosamina; GPI: glicofosfatidilinositol; aa: aminoácido; NCAM: molécula de adhesión celular neuronal; CAM: molécula de adhesión celular; TAG: glicoproteína axonal transitoria; GDNFR-α: subunidad α del receptor del factor neutrofílico derivado de células gliales; OH: grupo hidroxilo.</p>		

1984), la nomenclatura de los CDG ha sufrido varios cambios. Inicialmente, la PMM2-CDG fue denominada “síndrome de glicoproteínas deficientes en carbohidratos” (carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome), debido a las múltiples alteraciones observadas en las cadenas de azúcares de la transferrina de los pacientes con la enfermedad. Sin embargo, el descubrimiento de otros perfiles en el isoelectroenfoque (IEF) de la transferrina (Tf) que apuntaban hacia la existencia de otros CDG (Jaeken *et al.* 1994, Powell *et al.* 1994, Tan *et al.* 1996), así como el hecho de que estas patologías aparecieran fundamentalmente en niños, llevó a sustituir el nombre por el actual de trastornos congénitos de la glicosilación (CDG o *congenital glycosylation disorders*). Durante los primeros años, los CDG se clasificaron según el patrón de IEF de la transferrina, en CDG-I (patrón de tipo I, con aumento de isoformas asialo-Tf y disialoTf) y CDG-II (patrón de tipo II con cualquier otra distribución anormal de isoformas de la Tf), y según se descubrían nuevos defectos, estos se iban denominando por orden alfabético (CDG-Ia, CDG-Ib, CDG-IIa, CDG-IIb, etc.). En 2008, tras la generalización del diagnóstico genético molecular y dado que no todos los CDG presentaban patrones alterados de isoformas de la Tf, se modificó la nomenclatura de manera que los CDG fueran nombrados por el gen afectado seguido de “-CDG” (ej: PMM2-CDG, MPI-CDG) (Jaeken *et al.* 2009).

No se sabe con exactitud cuál es la prevalencia ni la incidencia de los CDG en conjunto, ni las frecuencias individuales de la mayoría de tipos de CDG, aunque estas enfermedades se han identificado pacientes de todos los orígenes étnicos y de ambos sexos (Chang *et al.* 2018). En base a la frecuencia de portadores de variantes patogénicas conocidas en 53 genes relacionados con CDG, se ha estimado que la prevalencia total sería de alrededor de 1/10.000 en poblaciones de origen europeo y afroamericano (Matthijs *et al.* 2000, Jaeken y Matthijs 2001, Jaeken y Matthijs 2007, Haeuptle y Hennet 2009). En un estudio multinacional de 1350 pacientes con patrón alterado en el IEF de Tf y CDG confirmada posteriormente por estudio genético en la mayoría de casos (37 CDG diferentes), se determinó que el 94% fueron CDG-I y el 6% CDG-II. Como se esperaba, la PMM2-CDG fue la entidad más frecuente (62% del total de CDG), seguida de ALG6-CDG (8%), SRD5A3-CDG (3,1%), ALG1-CDG (3%), y MPI-CDG (2,6%). De entre las CDG-II, COG7-CDG (0,7%) fue la más prevalente. Por otro lado, esta investigación puso de manifiesto que con alta probabilidad los CDG se encuentran infradiagnosticados, así como que existe la necesidad de un registro internacional de pacientes (Péanne *et al.* 2018). En la actualidad se conocen más de 130 tipos diferentes de CDG, la mayoría de las cuales cuentan con menos de 100 casos publicados (Freeze *et al.* 2014, Jaeken y Péanne 2017).

Clínicamente los CDG se caracterizan por ser en su mayoría, enfermedades congénitas, estáticas o muy lentamente progresivas, y multisistémicas con afectación preferente cerebral, ocular y esquelética (Francisco *et al.* 2018). Así, encontramos como síntomas frecuentes: retraso psicomotor/ discapacidad intelectual, hipotonía, trastornos del movimiento, fallo de medro, hipoglucemia, estrabismo, retinopatía, escoliosis, coxa valga, malformaciones de dedos, dificultades de alimentación, hipertransaminasemia, lipodistrofia, *cutis laxa*, ictiosis, inmunodepresión, tendencia a hemorragias y/o trombosis, entre otras (Jaeken y Péanne 2017, Péanne *et al.* 2018, Pérez-Cerdá *et al.* 2017, Francisco *et al.* 2019). Aunque la mayor parte de los CDG son patologías multisistémicas, algunos son específicos de ciertos órganos o sistemas: retina en DHDDS-CDG; placa motora en ALG2-CDG, ALG14-CDG y CFPT1-CDG; encéfalo en ST3GAL3-CDG y TUSC3-CDG; piel o músculo esquelético en POGLUT1-CDG y POFUT1-CDG; cartílago en EXT1/EXT2-CDG; hígado en TMEM199-CDG; eritrocitos en SEC23B-CDG (Jaeken y Péanne 2017). Además, sorprendentemente, ciertas CDG pueden presentar un fenotipo completamente distinto dependiendo de qué mutación presenten dentro del mismo gen: PMM2-CDG (el síndrome dismórfico-atáxico-multisistémico más conocido, enfermedad con poliquistosis renal e hipoglucemia hiperinsulínica, o tendencia aislada a la trombosis), ALG9-CDG (síndrome dismórfico-neuro-hepato-renal, o fenotipo esquelético con muerte fetal), EXT2-CDG (exóstosis, o síndrome con epilepsia, escoliosis y macrocefalia), PIGA-CDG (discapacidad intelectual y epilepsia, síndrome ferro-cerebro-cutáneo, síndrome de Simpson-Golabi-Behmel tipo 2, encefalopatía epiléptica precoz con hipotonía severa, o anomalías congénitas múltiples y muerte precoz), POGLUT1-CDG (enfermedad cutánea, o distrofia muscular) (Péanne *et al.* 2018). Finalmente, dentro del mismo fenotipo, el grado de severidad puede ser amplísimo, abarcando desde muerte prenatal hasta adultos asintomáticos (Vuillaumier-Barrot *et al.* 2012).

En el momento actual, puede considerarse que existen dos métodos diagnósticos para las CDG (**figuras 3.1 y 3.2**): (1) por un lado tendríamos el método “clásico”, en el que a partir de una sospecha clínica (fenotipo) de CDG, se realiza un estudio de isoformas de la transferrina y según el patrón obtenido (tipo I, tipo II, o normal/ inespecífico) completaríamos el estudio con otras pruebas bioquímicas (isoformas APOC3, análisis de dolicoles, manosa en sangre y orina, estudio del *pool* de monosacáridos dadores, tests de coagulación, etc.) y/o con pruebas genéticas (secuenciación Sanger, panel genético, exoma clínico, exoma completo por tríos, etc.); (2) por otro lado, cada vez se recurre más a un método alternativo que podríamos llamar “genético”, en el que no se sospecha clínicamente un CDG, si no que se parte de una probable enfermedad

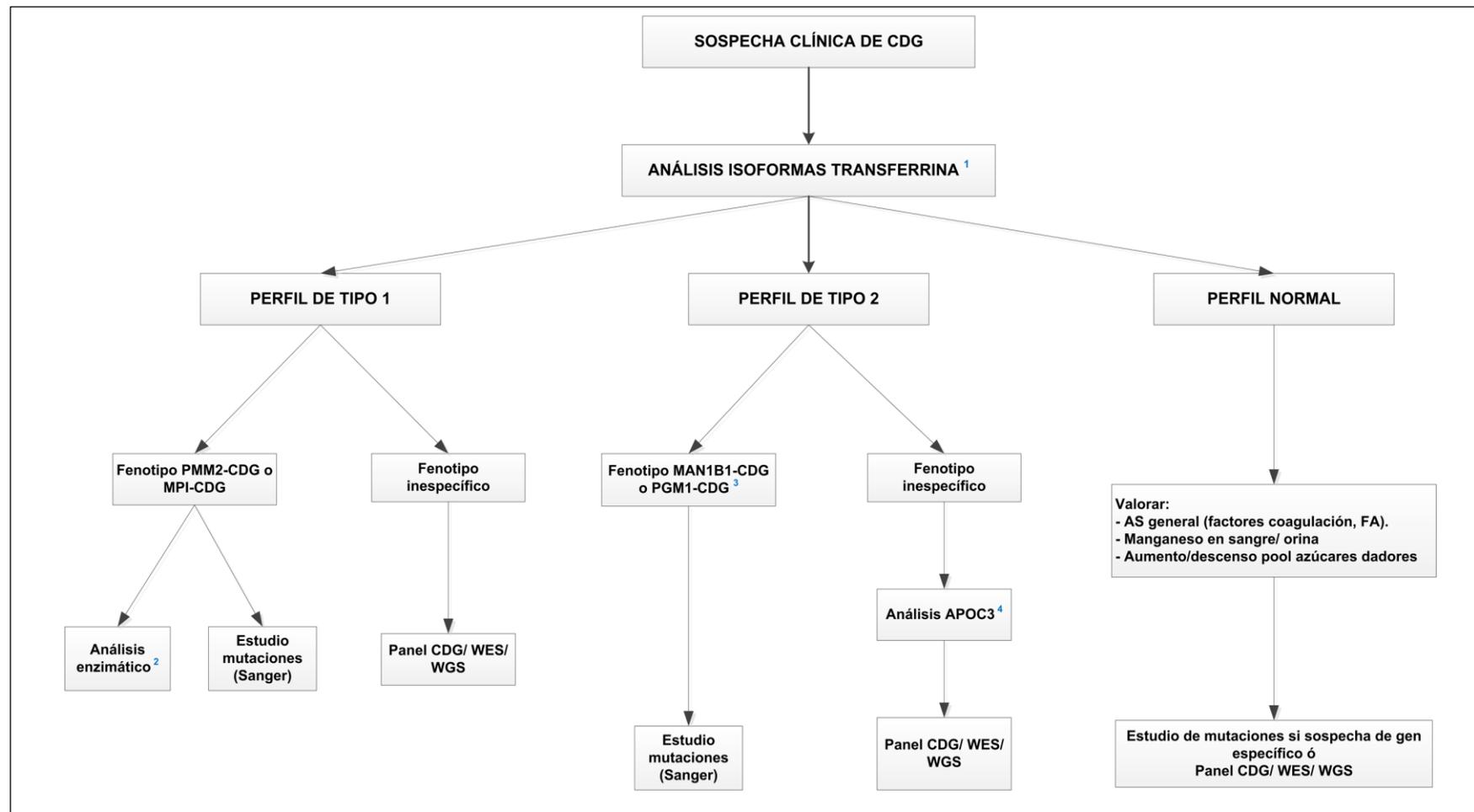


Figura 3.1. Método clásico de diagnóstico de los CDG.

1. Por isoelectrofoque (IEF), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), o preferiblemente por espectrometría de masas de tiempo de vuelo con cuadrupolo (QTOF-MS).

2. El análisis enzimático puede ser normal en la PMM2-CDG.

3. MAN1B1-CDG por ser la CDG con patrón de tipo 2 más frecuente. PGM1-CDG por presentar adecuada respuesta a galactosa vo.

4. Por isoelectrofoque (IEF).

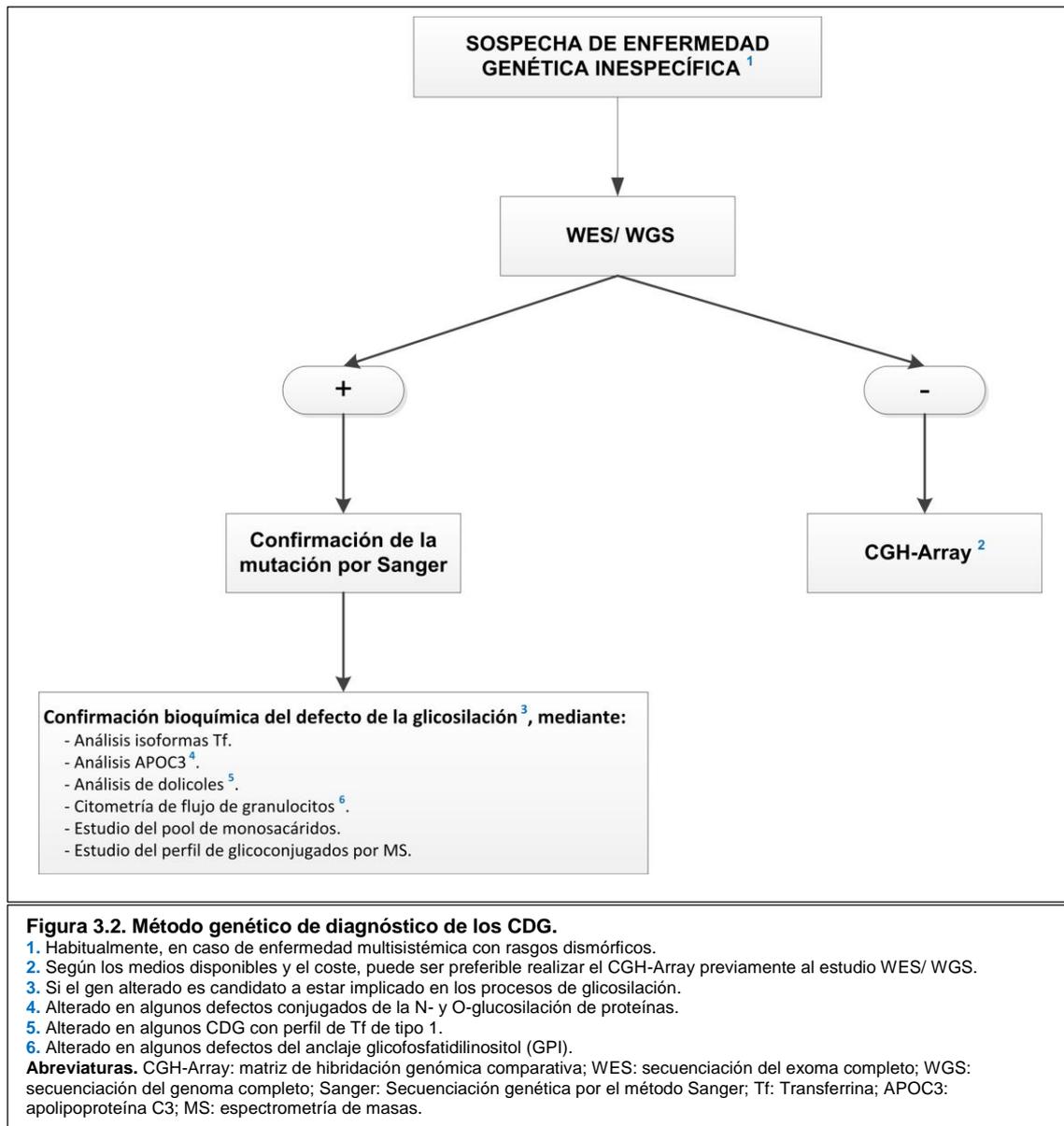
Abreviaturas. Sanger: Secuenciación genética por el método Sanger; WES: secuenciación del exoma completo; WGS: secuenciación del genoma completo; APOC3: apolipoproteína C3; AS: análisis de sangre; FA: fosfatasa alcalina.

monogénica inespecífica (normalmente pacientes con afectación neurológica-multisistémica y rasgos dismórficos), solicitándose de inicio estudios genéticos de cribado, (habitualmente de forma secuencial: CGH-Array, panel genético, exoma clínico, exoma completo por tríos, genoma completo) y en caso de detectar alteraciones de significado incierto en genes conocidos o candidatos a estar implicados en las vías de la glicosilación, se comprueba si esto es así mediante estudios bioquímicos específicos (isoformas transferrina, estudio del pool de monosacáridos dadores, perfil de glucoproteínas por espectrometría de masas) (Abu Bakar *et al.* 2018, Chen *et al.* 2019, Gilfix 2019).

El método de diagnóstico “clásico” tiene las ventajas de ser más coste-efectivo (especialmente si se trata de un PMM2-CDG o un MPI-CDG), y de que no suele ser necesario demostrar una alteración de la glicosilación con otras pruebas si el estudio de isoformas de la transferrina se encuentra alterado desde el inicio. Por el contrario, este método tiene dificultades para diagnosticar fenotipos inespecíficos, formas extremas (muy leves o severas) de fenotipos clásicos, y nuevos tipos de CDG (Lefeber *et al.* 2011, Pérez-Cerdá *et al.* 2015, Francisco *et al.* 2019).

El método “genético” presenta las ventajas de no precisar de una sospecha clínica especialmente dirigida, ser más coste-efectivo (no tanto para los pacientes con CDG, sino para el conjunto de pacientes con sospecha de enfermedad genética inespecífica), y ser con frecuencia más rápido (Vissers *et al.* 2017, Tan *et al.* 2017, Gilfix 2019, Chag *et al.* 2019). Sin embargo, muestra el inconveniente de la dificultad en la interpretación de las anomalías genéticas encontradas, pudiéndonos encontrar casos de enfermos con alteraciones en genes relacionados con la glicosilación pero con estudios bioquímicos que muestran un perfil de glucoconjugados normal (Ng *et al.* 2019).

Es muy probable que el método “genético” desempeñe un papel cada vez más relevante en el diagnóstico de los CDG. Un factor que contribuirá sin duda a ello, será el abaratamiento progresivo de las técnicas de NGS. También jugarán a su favor las limitaciones del estudio de isoformas de la transferrina como prueba de cribado de CDG, ya que: (a) aproximadamente el 50% de los tipos de CDG presentan un patrón de glicosilación de Tf normal (los defectos de la O-glicosilación no asociados a un defecto de la N-glicosilación, los defectos del anclaje del GPI, los déficits de la síntesis de glucoesfingolípidos y aquellos defectos de la N-glicosilación que no muestran deficiencia de ác. siálico) (Péanne *et al.* 2018); (b) puede mostrar falsos positivos (galactosemia, déficit hereditario de fructosa, alcoholismo, hepatopatía, sepsis); (c) o falsos negativos



(se han descrito pacientes con PMM2-CDG, ALG13-CDG, RFT1-CDG, SRD5A3-CDG, SLC35A2-CDG con perfil de Tf tanto normal como alterado) (Fletcher *et al.* 2000, Francisco *et al.* 2019).

El tratamiento para la mayoría de las formas de CDG se basa en terapias de soporte orientadas a mejorar los síntomas y la calidad de vida de los pacientes y sus familias (Brasil *et al.* 2018). Sin embargo, existen varias excepciones a esta regla: (1) MPI-CDG: el CDG con el tratamiento más efectivo. En él la suplementación con manosa vía oral inicialmente a 1g/kg/día cada 4-6h, es capaz de mejorar rápidamente el perfil de Tf y la mayoría de síntomas (aunque no siempre corrige la hepatopatía, que puede continuar evolucionando) (de Lonlay y Seta 2009, Mention *et al.* 2008); (2) PMM2-CDG: Su

Tabla 6. Principales terapias dirigidas disponibles en los trastornos congénitos de la glicosilación.

CDG	TRATAMIENTOS	
	SUPLEMENTOS NUTRICIONALES	OTROS
MPI-CDG	- Manosa vo	- Trasplante hepático
PMM2-CDG	- Manosa-1-P (experimental)	- Acetazolamida
SLC35C1-CDG	- Fucosa vo	-----
PGM1-CDG	- Galactosa vo	- Trasplante cardiaco
SLC35A2-CDG	- Galactosa vo	-----
TMEM165-CDG	- Galactosa vo	-----
SLC39A8-CDG	- Galactosa vo - Sulfato de manganeso vo	-----
CAD-CDG	- Butirato de sodio (epilepsia)	-----
PIGM-CDG	- Butirato de sodio (epilepsia)	-----
PIGA-CDG	- Dieta cetogénica (epilepsia)	-----
PIGO-CDG	- Piridoxina (Vit B6, epilepsia)	-----
CCDC115-CDG	-----	- Trasplante hepático
ATP6VAP1-CDG	-----	- Trasplante hepático
DOLK-CDG	-----	- Trasplante cardiaco
PGM3-CDG	-----	- Trasplante de progenitores hematopoyéticos

tratamiento continúa siendo principalmente de sostén, sin embargo, recientemente el tratamiento con

acetazolamida ha demostrado mejorar los síntomas neurológicos (Martínez-Monseny, Bolasell *et al.* 2019) y se han realizado estudios con manosa-1-fosfato como terapia de reemplazo de sustrato, aunque por el momento con problemas de absorción (Rutschow *et al.* 2002, Eklund *et al.* 2005, Hardré *et al.* 2007). En este sentido, recientes líneas de trabajo buscan incluir la molécula en liposomas para salvar esta limitación y mejorar su biodisponibilidad y entrada a la célula. Otros CDG con tratamientos parcialmente eficaces son: SLC35C1-CDG, PGM1-CDG, SLC35A2-CDG, TMEM165-CDG, SLC39A8-CDG, CAD-CDG, PIGM-CDG, PIGA-CDG, PIGO-CDG (Etzioni y Tonetti 2000, Almeida *et al.* 2009, Wong *et al.* 2017, Morelle *et al.* 2017, Park *et al.* 2018, Almeida *et al.* 2007, Joshi *et al.* 2016, Kuki *et al.* 2015). Se ha realizado con éxito trasplante hepático en MPI-CDG, CCDC115-CDG, ATP6VAP1-CDG (Jansen *et al.* 2014, Jansen *et al.* 2016), trasplante cardiaco en PGM1-CDG y DOLK-CDG (Tegtmeyer *et al.* 2014, Klcovansky *et al.* 2016), y trasplante de progenitores hematopoyéticos en PGM3-CDG (Stray-Pedersen *et al.* 2014) (ver **tabla 6**).

3. Lesión cerebelosa en el cerebro en desarrollo

3.1. Anatomía, función y disfunción del cerebelo

Anatómicamente, el cerebelo puede estudiarse según su estructura externa o interna. Externamente podemos dividirlo de dos formas diferentes, aunque complementarias: según un eje mediolateral o un eje anteroposterior. En el eje mediolateral encontramos el vermis en posición central, y los hemisferios cerebelosos a ambos lados. Siguiendo el eje anteroposterior encontramos 10 lóbulos (del I al X) separados por surcos poco profundos denominados fisuras. Estos 10 lóbulos se agrupan a su vez en 3 lóbulos de mayor tamaño: el lóbulo anterior (lóbulos I-V), el lóbulo posterior (lóbulos VI-IX) y el lóbulo floculonodular (X). Cada uno de estos 10 lóbulos consta de una parte que corresponde al vermis y otra que pertenece a los hemisferios cerebelosos (Larsell 1951).

En la estructura interna del cerebelo, distinguimos la sustancia gris (constituida por la corteza y los núcleos cerebelosos) y la sustancia blanca. La corteza está formada por 3 capas, que de más externa a más interna son: (1) la capa molecular: denominada así ya que está formada principalmente por axones y dendritas y escasos somas celulares; (2) la capa de células de Purkinje: constituida por los somas de las células de Purkinje que se disponen formando una lámina monocelular; y (3) la capa granular: es la capa más profunda, limitando en su parte interna con la sustancia blanca. Está formada fundamentalmente por células granulosas (Llinás y Sotelo 1992).

Asimismo, existen principalmente 5 tipos de células en el cerebelo: (a) las células de Purkinje: uno de los tipos celulares de mayor tamaño y con mayor consumo energético del sistema nervioso central (McCormick *et al.* 2018), que representa además la única célula eferente del cerebelo. Se localizan en la capa de células de Purkinje; (b) las células granulosas: son las células más numerosas del sistema nervioso central (su número es casi el mismo que el de todo el resto de tipos celulares del SNC combinados). Se localizan en la capa granular. Emiten largos axones que se disponen en una orientación mediolateral en la capa molecular y conectan cada uno con 1000-2000 células de Purkinje (fibras paralelas). Son las únicas neuronas excitatorias de la corteza cerebelosa (Smolyaninov 1971); (c) las células de Golgi de tipo II: se localizan en la capa granular. Tienen una función inhibitoria sobre las células granulosas; (d) las células en cesta y (e) las células estrelladas: ambas se encuentran en la capa molecular, reciben estímulos excitatorios desde las fibras paralelas e inhiben a las células de Purkinje (ver **figura 4**).

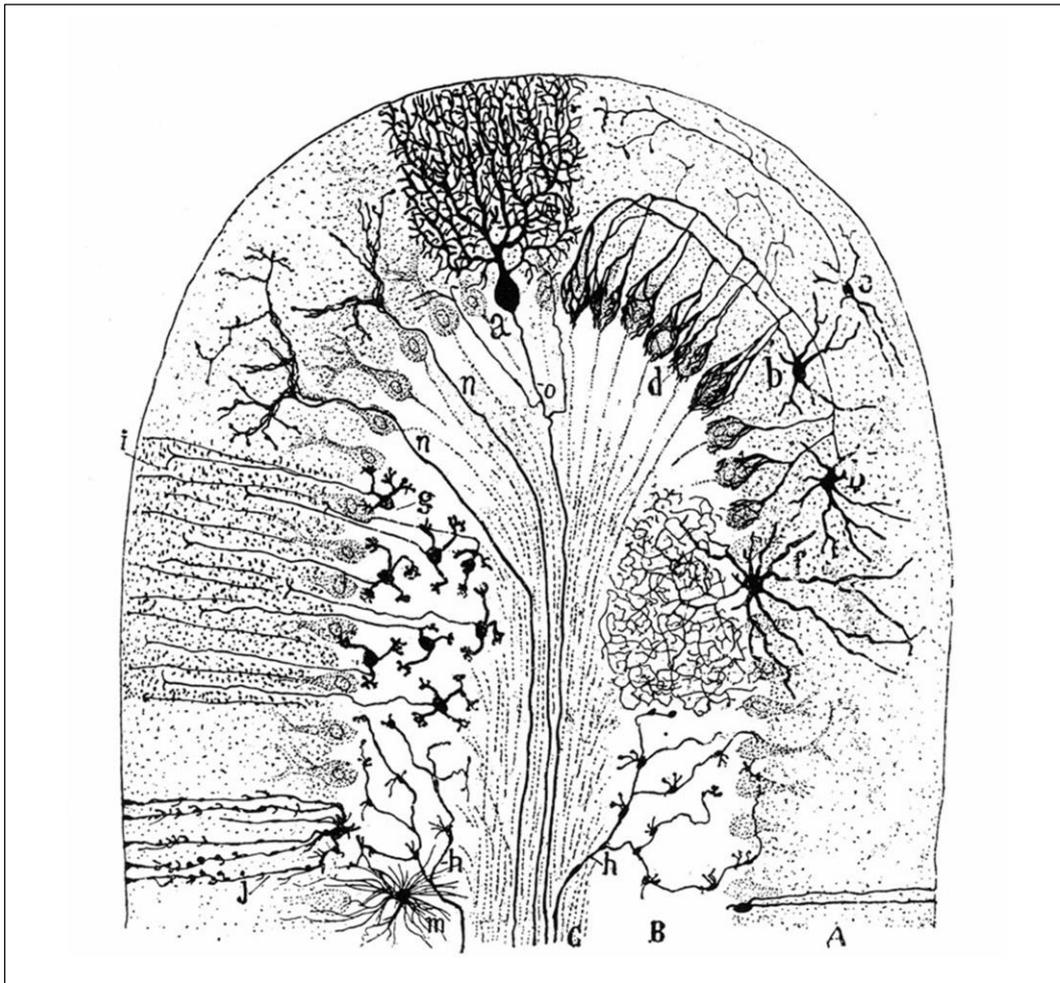


Figura 4. Corte transversal semiesquemático de una circunvolución cerebelosa de mamífero. A, zona molecular; B, zona de los granos; C, zona de la sustancia blanca; a, célula de Purkinje vista de plano; b, células estrelladas pequeñas de la zona molecular; d, arborizaciones finales descendentes que rodean las células de Purkinje; e, células estrelladas superficiales; g, granos con sus cilindros-ejes ascendentes bifurcados en i; h, fibras musgosas; j, célula neuróglica de penacho; n, fibras trepadoras; m, célula neuróglica de la zona de los granos; f, células estrelladas grandes de la zona de los granos.

Santiago Ramón y Cajal, *Academia de Ciencias Médicas de Cataluña*, 1894.

Tomado de: S. Ramón y Cajal. *Recuerdos de mi vida*. Madrid, 1917. Disponible en: www.gutenberg.org.

Las otras estructuras formadas por sustancia gris, además de la corteza, son los núcleos del cerebelo. Son cuatro a cada lado de la línea media, de medial a lateral: núcleo del fastigio (o del techo), núcleo globoso, núcleo emboliforme y núcleo dentado. Están compuestos por grandes neuronas multipolares con dendritas con ramificaciones simples (Korneliussen 1969). El núcleo del fastigio recibe aferentes desde las células de Purkinje situadas en el vermis. Los núcleos globoso y emboliforme se agrupan funcionalmente en un único núcleo, el núcleo interpuesto, el cual recibe aferentes desde las células de Purkinje adyacentes al vermis. El núcleo dentado, el más grande en primates, recibe estímulos aferentes desde las células de Purkinje de los hemisferios cerebelosos. Además de los estímulos aferentes inhibitorios de las células de Purkinje de la corteza cerebelosa, los núcleos del cerebelo también reciben estímulos aferentes

excitatorios de las fibras musgosas (desde médula espinal y tronco del encéfalo) y de las fibras trepadoras (desde el núcleo olivar inferior en el bulbo raquídeo) (Haines *et al.* 1982). A excepción de algunos axones de las células de Purkinje de la corteza cerebelosa que alcanzan directamente los núcleos vestibulares del bulbo raquídeo, todos los restantes estímulos eferentes del cerebelo se transmiten a otras estructuras del SNC a través desde los núcleos cerebelosos.

Por debajo de la corteza y rodeando a los núcleos cerebelosos, se ubica la sustancia blanca. Esta se encuentra constituida por una zona central o cuerpo medular, una zona periférica formada por las ramificaciones de sustancia blanca que parten del cuerpo medular y se dirigen hacia las circunvoluciones (denominadas láminas blancas), y por los pedúnculos cerebelosos, también compuestos por sustancia blanca. A nivel microscópico en la sustancia blanca encontramos los axones de las fibras intrínsecas (fibras de interconexión entre neuronas del cerebelo) y extrínsecas (aférentes y eferentes que recibe y emite el cerebelo), así como por astrocitos y oligodendrocitos (estos últimos productores de mielina).

Finalmente, el cerebelo se conecta con el resto del neuroeje a través de tres estructuras nerviosas, los pedúnculos cerebelosos inferior, medio y superior. El pedúnculo inferior contiene fibras aférentes musgosas de la médula espinal y el bulbo raquídeo, fibras aférentes trepadoras desde el complejo olivar inferior del bulbo y fibras eferentes de los tractos cerebelovestibular y cerebeloreticular. El pedúnculo medio es el más grande y contiene fibras aférentes procedentes de la protuberancia. El pedúnculo superior es fundamentalmente una vía eferente que conecta el cerebelo con el mesencéfalo a través de las vías dento-rúbrica, dento-talámica, fastigio-vestibular y fastigio-reticular. Sin embargo, también contiene fibras aférentes desde los tractos espino-cerebeloso, tecto-cerebeloso, trigémino-cerebeloso y cerulo-cerebeloso (Armengol 1998).

Funcionalmente, el cerebelo se encarga del control y coordinación de los movimientos complejos de la musculatura esquelética, jugando también un papel importante en algunos procesos cognitivos superiores como la atención, la memoria y el lenguaje. Estas funciones se reparten de forma genérica, entre 3 zonas anatómicas: (1) el arquicerebelo, que coincide aproximadamente con el lóbulo floculonodular, y se encarga del control de los movimientos reflejos de la cabeza así como de los movimientos oculares; (2) el paleocerebelo, integrado por el vermis y sus regiones adyacentes de los hemisferios cerebelosos, y por los núcleos fastigio e interpuesto, el cual interviene en la regulación del movimiento y postura de los miembros; (3) el neocerebelo, conformado

por los hemisferios laterales y el núcleo dentado, que se ocupa de la planificación de los movimientos, así como del aprendizaje motor. Cabe puntualizar a este respecto, que en niños, especialmente cuando la lesión se produce en edades tempranas, la correlación entre la localización de la lesión y la función o funciones alteradas puede ser escasa.

Por otro lado, varias investigaciones han mostrado que el cerebelo también está involucrado en tareas no motrices. Estas incluyen: discriminación sensitiva, atención, memoria de trabajo, asociación semántica, aprendizaje y memoria verbal, y resolución de problemas complejos (Allen *et al.* 1997, Leiner *et al.* 1991, Middleton y Strick 1994). La mayoría de estos procesos involucran a los hemisferios cerebelosos y al núcleo dentado (neocerebelo).

Cuando lesión o malformación cerebelosa afecta a las funciones fundamentales del cerebelo, suele expresarse clínicamente en forma de 3 síntomas principales: hipotonía, ataxia y/o manifestaciones cognitivas-afectivas.

La hipotonía se define como un descenso de la resistencia muscular pasiva al estiramiento en reposo (Peredo y Hannibal 2009). Al menos en adultos, puede verse típicamente en lesiones cerebelosas hemisféricas acompañada habitualmente de hiporreflexia. Se cree que se debe a un descenso de la actividad de las neuronas fusimotoras del huso neuromuscular, lo que da lugar a una disminución de la contracción muscular en reposo (Gilman 1975).

Se denomina ataxia a un defecto en la fluidez de los movimientos voluntarios (Mumenthaler y Mattle 2006), dando lugar a la afectación “inconsciente” de las decisiones que tomamos sobre el equilibrio, velocidad, fuerza y dirección de los movimientos que hemos planificado (Forssberg y Nasher 1982, Ghez y Thach 2000). En realidad, el término ataxia engloba múltiples síntomas que describimos a continuación:

- (1) Ataxia de la estática: movimientos de oscilación, titubeo o balanceo de la cabeza o del tronco, especialmente en sedestación.
- (2) Ataxia de la marcha o abasia: incapacidad para caminar debido a la interferencia de movimientos de tambaleo y disimetría.
- (3) Ataxia de la coordinación o asinergia: dificultad para la coordinación de diferentes músculos o zonas corporales que habitualmente actúan al unísono.

(4) Ataxia de la medición de distancias o disimetría: falta de precisión para medir distancias o proporciones, lo que da lugar a fallar el objetivo al mover una extremidad (ej. coger un objeto).

(5) Ataxia de los movimientos alternos o disdiadococinesia: manifestando dificultad para ejecutar movimientos alternantes rápidos como prono-supinación de las manos o enroscar una bombilla.

(6) Ataxia del habla o disartria cerebelosa: se expresa como un defecto en la articulación (“arrastre” de las palabras e imprecisión en el rango, fuerza y tiempo de la pronunciación), fonación (calidad vocal irregular), resonancia (voz nasal) y prosodia (mismo énfasis en todas las sílabas).

(7) Temblor intencional: temblor que se manifiesta cuando el paciente intenta hacer un movimiento dirigido.

(8) Ataxia oculomotora: Se expresa fundamentalmente como nistagmus y disimetría de las sacadas (cuando el paciente intenta mirar hacia un objeto, sus ojos fallan el objetivo por exceso o defecto del movimiento).

En general, se considera que las lesiones del vermis tienen como consecuencia ataxia de la estática, mientras que las lesiones hemisféricas dan lugar a ataxia de los miembros (ataxia de la marcha, disimetría, temblor intencional, etc.). Sin embargo, como se ha comentado antes esta relación es más difícil de encontrar en niños.

También se han descrito manifestaciones no motoras de la enfermedad cerebelosa, englobadas bajo el término “síndrome cognitivo-afectivo cerebeloso”. En este síndrome, que se ha encontrado en pacientes con lesión cerebelosa de diferente etiología, pueden apreciarse alteraciones en las funciones ejecutivas (planificación, razonamiento abstracto, fluencia verbal, memoria de trabajo y flexibilidad cognitiva), orientación espacial, cambios de personalidad (desde indiferencia afectiva hasta conductas desinhibidas), y déficits del lenguaje más allá de la propia disartria (aprosodia, agramatismo y anomia). Con frecuencia se suman, enlentecimiento en la velocidad de procesamiento de la información y problemas de memoria. Esta sintomatología se cree que estaría causada por una alteración de los circuitos neuronales que unen la corteza prefrontal, parietal posterior, temporal superior y circuitos límbicos, con el cerebelo (Schmahmann y Sherman 1998, Schmahmann 2019, Lindberg Bonne *et al.* 2016).

3.2. Ataxia de inicio precoz

El concepto de ataxia de inicio precoz (EOA o *early onset ataxia*) se utiliza para definir aquellos cuadros clínicos con aparición de ataxia cerebelosa antes de los 25 años de

edad (Harding 1983, Chio *et al.* 1993). Su prevalencia se ha estimado en 14,6 por cada 100.000 personas (Musselman *et al.* 2014). El término engloba a un gran número de entidades clínicas distintas, que en general se expresan como ataxia crónica y que son de etiología congénita y/o genética (incluyendo errores congénitos del metabolismo) (Brandsma *et al.* 2019).

En las EOA, la ataxia puede ser un síntoma principal o secundario (Lawerman *et al.* 2016, Delgado y Albright 2003), es decir, constituir la manifestación primaria, o ir asociada a otros síntomas neurológicos (en algunos casos a otros trastornos del movimiento) o sistémicos. También dificulta su diagnóstico, el hecho de que las EOA puedan manifestarse con un curso clínico variable (de estable a rápidamente progresivo) o que el trastorno del movimiento predominante pueda cambiar con el tiempo (van Egmond *et al.* 2014). En niños, otro factor que añade complejidad diagnóstica, es la superposición entre ataxia e inmadurez fisiológica del sistema nervioso (Sival y Brunt 2009, Brandsma *et al.* 2014). Esto da lugar a que, por ejemplo, en un cuadro estático con ataxia de inicio precoz, si el paciente se encuentra en tratamiento (ej. fisioterápico) y se observa una mejoría, sea difícil distinguir si se trata de un efecto de la mencionada terapia o de su evolución psicomotriz normal, pudiendo llevarnos a conclusiones erróneas sobre la efectividad de cualquier intervención terapéutica ensayada.

4. Escalas para la valoración de la ataxia cerebelosa en niños

Durante los últimos 30 años se han ido desarrollando una serie de escalas clínicas destinadas a la medición de la severidad de la ataxia cerebelosa en pacientes aquejados de múltiples patologías. Su objetivo fundamental es el de constituir una herramienta lo más objetiva posible para determinar la evolución de este síntoma, tanto en estudios de historia natural de enfermedades, como especialmente en ensayos clínicos (Bürk y Sival 2018).

Las escalas clínicas más utilizadas en trastornos cerebelosa son:

- Escala internacional cooperativa de medición de la ataxia (ICARS, *international cooperative ataxia rating scale*).
- Escala breve para la medición de la ataxia (BARS, *brief ataxia rating scale*).
- Escala para la valoración y medición de la ataxia (SARA, *scale for the assessment and rating of ataxia*).
- Escala para la medición de la Ataxia de Friedrich (FARS, *Friedrich ataxia rating scale*).
- Escala de impresión clínica global para la ataxia telangiectasia (*clinical global impression scale for ataxia telangiectasia*).

Estas dos últimas, tienen quizá una utilidad más limitada al haber sido diseñadas para evaluar la ataxia cerebelosa en entidades específicas, no estar validadas en otras patologías, o considerar otros síntomas además de la ataxia (Subramony *et al.* 2005, Nissenkorn *et al.* 2005).

Todas estas escalas satisfacen una serie de criterios, imprescindibles para cumplir los objetivos para los que fueron diseñadas: (1) deben dar los mismos resultados cuando son utilizadas por diferentes profesionales entrenados (validez interobservador); (2) se deben obtener los mismos resultados cuando son utilizadas por el mismo observador en dos momentos distintos (validez intraobservador); (3) los diferentes apartados de la escala deben medir síntomas relacionados y mostrar puntuaciones similares (consistencia interna); (4) deben medir lo que quieren medir (validez del constructo); (5) no deben correlacionarse con otros signos-síntomas diferentes del que se pretende medir (validez discriminatoria; por ej. una escala de ataxia no debe relacionar su puntuación con una escala de mioclonía en el mismo paciente). Además, es preferible que la administración de la escala no requiera mucho tiempo, ni excesivo entrenamiento (Burk y Sival 2018).

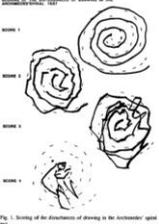
INTERNATIONAL CO-OPERATIVE ATAXIA RATING SCALE (ESCALA INTERNACIONAL COOPERATIVA DE ATAXIA)			PUNTAJES		
I. AFECTACIÓN DE LA POSTURA Y LA MARCHA					
1. HABILIDAD PARA LA MARCHA 0: normal 1: casi normal, pero incapaz de andar en líneas (un pie delante del otro) 2: marcha sin apoyo, pero claramente anormal e irregular 3: marcha sin apoyo, pero con considerable tambaleo, dificultades para la media-vuelta 4: imposibilidad para la marcha sin apoyo, el paciente se apoya ocasionalmente durante la prueba 5: marcha únicamente posible con bastón 6: marcha únicamente posible con 2 bastones especiales o apoyándose en el carruaje 7: marcha únicamente posible con un acompañante 8: marcha imposible incluso con acompañante (silla de ruedas)	Puntuación:				
2. VELOCIDAD DE LA MARCHA 0: normal 1: ligeramente reducida 2: claramente reducida 3: extremadamente lenta 4: imposibilidad para la marcha sin apoyo	Puntuación:				
3. BIPEDESTACIÓN OJOS ABIERTOS 0: normal, capaz de mantenerse sobre un pie durante más de 10 segundos 1: No puede mantenerse sobre un pie más de 10 segundos, pero es capaz de hacerlo con los pies juntos 2: No puede mantenerse en la posición de tandem, pero es capaz de hacerlo con los pies juntos 3: No puede mantenerse con los pies juntos, pero es capaz de hacerlo en posición natural sin apoyo (sin balanceo o con balanceo moderado) 4: Es capaz de mantenerse en posición natural sin apoyo, pero con balanceo y con oscilaciones considerables	Puntuación:				
4. SEPARACIÓN DE LOS PIES EN POSICIÓN NATURAL SIN APOYO OJOS ABIERTOS 0: normal < 10cm 1: ligeramente aumentada: 10-25cm 2: claramente aumentada: 25-35cm 3: gravemente aumentada: >35cm 4: imposibilidad para mantenerse en posición natural					
5. BALANCEO CORPORAL CON PIES JUNTOS OJOS CERRADOS 0: normal 1: oscilaciones ligeras 2: oscilaciones moderadas (<10cm a nivel de la cabeza) 3: oscilaciones severas (>10cm a nivel de la cabeza), que ponen en peligro la bipedestación 4: caída inmediata					
6. BALANCEO CORPORAL CON PIES JUNTOS OJOS CERRADOS 0: normal 1: oscilaciones ligeras 2: oscilaciones moderadas (<10cm a nivel de la cabeza) 3: oscilaciones severas (>10cm a nivel de la cabeza), que ponen en peligro la bipedestación 4: caída inmediata					
7. SEDESTACIÓN 0: normal 1: con oscilaciones ligeras del tronco 2: con oscilaciones moderadas del tronco y las piernas 3: con desequilibrio severo 4: imposible					
Puntuación Postura y Marcha (Score Estático)			___ / 34		
II. FUNCIONES CINÉTICAS			Puntuación:		
8. PRUEBA TALÓN-RODILLA 0: normal 1: se desciende el talón de forma continua, pero el movimiento está descompuesto en varias fases (sin sacudidas) o es anormalmente lento 2: descenso con sacudidas 3: descenso con sacudidas y movimientos laterales 4: descenso con sacudidas y movimientos laterales muy marcados, o test imposible	Dcha: Izqda:				
9. PRUEBA TALÓN-RODILLA 0: sin problemas 1: temblor que desaparece inmediatamente cuando el talón alcanza la rodilla 2: temblor que desaparece en <10 segundos después de que el talón alcance la rodilla 3: temblor que persiste >10 segundos después de que el talón alcance la rodilla 4: temblor continuo o test imposible	Dcha: Izqda:				
10. PRUEBA DEDO-NARIZ 0: normal 1: oscilaciones del miembro sin descomposición del movimiento 2: movimiento fraccionado en más de 2 fases y/o diámetro moderado al alcanzar la nariz 3: movimiento fraccionado en más de 2 fases y/o diámetro considerable al alcanzar la nariz 4: diámetro muy marcado que impide que el paciente alcance la nariz	Dcha: Izqda:				
11. PRUEBA DEDO-NARIZ 0: sin problemas 1: desviación durante el movimiento 2: temblor moderado con amplitud estimada >10cm 3: temblor marcado con amplitud estimada entre 10 y 40 cm 4: temblor severo con amplitud estimada >40cm			Dcha: Izqda:		
12. PRUEBA DEDO-DEDO 0: normal 1: inestabilidad moderada 2: oscilaciones moderadas del dedo con amplitud estimada <10cm 3: oscilaciones considerables del dedo con amplitud estimada entre 10 y 40 cm 4: sacudidas de >40cm de amplitud			Dcha: Izqda:		
13. PRONACIÓN-SUPINACIÓN 0: normal 1: movimiento ligeramente irregular y entelecido 2: claramente irregular y entelecido, pero sin oscilaciones del codo 3: sistemáticamente irregular y entelecido, con oscilación del codo 4: movimiento completamente desorganizado o imposible			Dcha: Izqda:		
14. DIBUJANDO LA ESPIRAL DE ARQUIMEDÉS SOBRE UN PATRÓN PREDEBUCADO 0: normal 1: patrón defectuoso y descompuesto; la línea abandona el patrón ligeramente, pero sin desviación hipométrica 2: línea completamente fuera del patrón sin cruzar varias veces el patrón ni desviación hipométrica 3: alteración importante debida a descomposición e hipometría 4: dibujo completamente desorganizado o imposible			Dcha: Izqda:		
Puntuación Cinética (Coordinación de miembros)			___ / 52		
III. TRASTORNOS DEL HABLA			Puntuación:		
15. DISARTRIA 0: normal 1: leve afectación de la fluidez 2: moderada afectación de la fluidez 3: habla considerablemente lenta y disártrica 4: imposibilidad para hablar					
16. DISARTRIA 0: normal 1: "arrastra" levemente las palabras 2: "arrastra" claro, mayoría de palabras comprensibles 3: "arrastra" grave, mayoría de palabras incomprensibles 4: imposibilidad para hablar					
Puntuación Disartria			___ / 8		
IV. TRASTORNOS OCULOMOTORES			Puntuación:		
17. NISTAGMO EVOCADO POR LA MIRADA 0: normal 1: transitorio 2: persistente pero moderado 3: persistente y severo					
18. ALTERACIONES EN EL SEGUIMIENTO VISUAL 0: normal 1: ligeramente sacádico 2: claramente sacádico					
19. DISMETRÍA DE LA SACADA 0: normal 1: dismetría bilateral clara de la sacada					
Puntuación Movimientos Oculomotores			___ / 6		
Puntuación Total Ataxia			___ / 100		

Figura 5. International Cooperative Ataxia Rating Scale (ICARS). Adaptado de: Trouillas et al. 1997.

Como ocurre con el resto de las escalas mencionadas (excepto para las escalas FARS y de impresión clínica global para la ataxia telangiectasia), ICARS se desarrolló y validó inicialmente en pacientes adultos (Trouillas et al. 1997). Comprende 19 ítems divididos en cuatro áreas: (1) postura y marcha; (2) funciones cinéticas; (3) trastornos del habla; y (4) trastornos oculomotores (ver figura 5). Las puntuaciones van de 0 (ausencia de ataxia) a 100 (ataxia con máxima severidad). Se requieren unos 25 minutos de media para completarla (Schmitz-Hübsch et al. 2006a). Tiene la ventaja de ser la más completa, evaluando la mayoría de los signos relevantes de ataxia. Presenta los inconvenientes de precisar más tiempo para administrarla (un factor potencialmente limitante para su uso en la práctica clínica diaria), y de incluir los trastornos oculomotores. Esto último puede ser un factor de confusión en aquellos trastornos neurológicos en los que existe afectación oculomotora de causa no cerebelosa, lo cual puede afectar a la validez discriminativa de esta escala (Schmitz-Hübsch et al. 2006a).

La escala BARS fue diseñada a partir de una extensión del ICARS (MICARS o escala ICARS modificada). MICARS constaba de 26 ítems (por los 19 de ICARS) y una puntuación máxima de 120 (por 100 en ICARS). Ante su complejidad, se decidió simplificarla manteniendo únicamente los 5 ítems que se correlacionaban mejor con la puntuación total del MICARS lo cual se comprobó mediante análisis estadístico, creándose la escala BARS (Schmahmann *et al.* 2009). Consta por tanto de 5 ítems: (1) marcha; (2) prueba talón-rodilla; (3) prueba dedo-nariz; (4) disartria; y (5) trastornos oculomotores. La puntuación oscila entre 0 y 30. Tiene la ventaja de que ser la más breve de las tres, precisando únicamente 10 minutos para completarla. Presenta los inconvenientes de no ser tan completa como ICARS y de, al igual que en ICARS, poder ver afectada su validez discriminatoria al incluir la valoración de la movilidad ocular (Brandsma *et al.* 2017, Schmitz-Hübsch *et al.* 2006b).

SARA es una escala desarrollada en adultos en 2006 para intentar corregir algunos problemas encontrados tras la administración de ICARS en pacientes con ataxia espino-cerebelosa (Schmitz-Hübsch *et al.* 2006b). Estos problemas de ICARS se centraban en el largo tiempo de cumplimentación de la escala y en el hallazgo, tras análisis estadísticos, que ICARS presentaba ciertas limitaciones en su validez de constructo para el mencionado grupo de pacientes (Schmitz-Hübsch *et al.* 2006a). SARA consta de 8 ítems: (1) marcha; (2) bipedestación; (3) sedestación; (4) trastornos del habla; (5) persecución con el dedo; (6) prueba dedo nariz; (7) movimientos rápidos alternos de la mano; (8) prueba talón-rodilla. La puntuación total va desde 0 a un máximo de 40 puntos para la ataxia más severa. Requiere para completarla, una media de 15 minutos. Sus ventajas son el breve tiempo de administración y la ausencia de problemas de validez discriminatoria para síntomas oculomotores no cerebelosos, ya que excluye la motilidad ocular (Bürk y Sival 2018). Su principal inconveniente es precisamente que no evalúa los movimientos oculomotores, cuya afectación puede ser una causa importante de discapacidad en pacientes con ataxia cerebelosa.

Las escalas ICARS, BARS y SARA, han sido validadas tanto en niños sanos de al menos 4 años (Sival y Brunt 2009, Brandsma *et al.* 2014, Lawerman *et al.* 2017a), como en niños con ataxia (Bransma *et al.* 2017, Lawerman *et al.* 2017b, Hartley *et al.* 2015) mostrando una buena validez interobservador, intraobservador, y de constructo, pero evidenciando insuficiente validez discriminatoria entre la ataxia y otros signos neurológicos concomitantes como distonía, mioclonías, corea, y debilidad muscular (Brandsma *et al.* 2017). Las escalas FARS y de impresión clínica global para la ataxia

telangiectasia se han desarrollado respectivamente en niños y adultos con ataxia de Friedrich, y niños con ataxia telangiectasia (Subramony *et al.* 2005, Nissenkorn *et al.* 2005), pero no han sido validadas en niños sanos.

Conocer los valores de referencia para cada edad de estas escalas es fundamental debido a que sólo por efecto del desarrollo psicomotor, la ataxia puede mejorar o estabilizarse, lo cual puede conllevar un efecto de “falsa mejoría” en ensayos clínicos dirigidos a valorar el efecto de un tratamiento sobre este síntoma (Sival *et al.* 2011, Brandsma *et al.* 2014). En este sentido, se ha observado que en niños mayores de 11 años las mencionadas escalas presentan unos resultados superponibles a los de los adultos, con unas puntuaciones en individuos sanos de entre 0 y 2 puntos (Brandsma *et al.* 2017). En cambio, en niños de entre 8 y 11 años, los resultados deben corregirse según los valores normativos para su edad, mientras que en niños de entre 4 y 8 años, aunque también pueden utilizarse, son menos fiables al ser mayor su margen de error (Bürk y Sival 2018). En niños menores de 4 años no existen por el momento escalas disponibles, ya que a estas edades los signos de ataxia cerebelosa son con frecuencia escasos e inespecíficos (ej: la hipotonía y la hipoactividad presentes en lactantes con lesión cerebelosa se observan también en muchas otras lesiones del SNC o periférico) (Steinlin *et al.* 1998).

En resumen, ICARS, BARS y SARA son escalas adecuadas para valorar la ataxia cerebelosa en niños de al menos 4 años. Sin embargo, debido a sus particularidades individuales, la elección de una sobre otra dependerá de las características específicas del grupo de pacientes a estudio.

5. Métodos neurorradiológicos para la estimación de las dimensiones del cerebelo

La intrincada estructura anatómica del cerebelo, caracterizada por la irregularidad de su superficie externa, con abundantes circunvoluciones (*folia cerebelli*), surcos y fisuras, junto con su localización en la fosa posterior, hacen que la valoración de sus dimensiones y volumen suponga un reto para las técnicas de neuroimagen (Mormina *et al.* 2017). Dos tipos de métodos radiológicos han sido utilizados para aproximar su tamaño, los métodos bidimensionales o lineales y los métodos tridimensionales o volumétricos. A continuación, se exponen las principales características de ambos.

5.1. Métodos bidimensionales (2-D)

Las técnicas radiológicas bidimensionales o lineales consisten en el uso de diámetros, longitudes, o áreas, para la estimación de las dimensiones de una determinada estructura anatómica. Debido a que en la fosa posterior se localizan algunas de las principales malformaciones encefálicas (Rutherford 2009) y a la importancia general de la ecografía fetal y neonatal para evaluar el adecuado desarrollo del SNC, la mayoría de las técnicas bidimensionales de medición cerebelosa fueron originalmente desarrolladas para ser utilizadas en ecografía fetal (Pilu y Nicolaidis 1999) y neonatal (Birnholtz 1982). En esta etapa resulta crucial detectar precozmente dichas malformaciones con el objetivo de tomar decisiones diagnósticas (ej. amniocentesis) o incluso la interrupción de la gestación. Posteriormente, con la llegada de la resonancia magnética nuclear (RMN), los métodos bidimensionales se han seguido utilizando a partir de imágenes de RMN encefálica, tanto en las etapas fetal y neonatal, como en niños de todas las edades (Garel 2005, Leijser *et al.* 2007, Jandeaux *et al.* 2019).

La principal ventaja de las técnicas lineales es su sencillez, pudiendo realizarse tanto a partir de imágenes de ecografía como de resonancia magnética (Zhao *et al.* 2013, Jandeaux *et al.* 2019), de forma rápida y con un mínimo entrenamiento (especialmente en el caso de la RMN), lo que posibilita incluso el completarlas en el momento de la consulta clínica. Su inconveniente es su relativa falta de precisión a la hora de estimar el volumen de una estructura no esférica, muy irregular, y con morfología que varía entre individuos sanos y también según la enfermedad de los pacientes (hipoplasia, atrofia, desmielinización, etc.). En todo caso, la correlación entre algunas de estas medidas y el volumen cerebeloso parece ser buena (Vatansever *et al.* 2013).

Las medidas bidimensionales de biometría cerebelosa más utilizadas tanto en investigación como en la práctica clínica, son las siguientes (ver **figura 6**):

- Altura del vermis: Se define como la longitud máxima superoinferior del vermis, medida en el plano medio-sagital (Vatansever *et al.* 2013). Se puede determinar tanto en ecografía como en RMN (Huang y Liu 1993, Garel 2005, Leijser *et al.* 2007, Imamoglu *et al.* 2013).
- Diámetro anteroposterior del vermis o anchura del vermis: Definido como la distancia máxima entre el *fastigium* y la parte posterior del vermis, medido en el plano medio-sagital (Vatansever *et al.* 2013). Se puede determinar tanto en ecografía como en RMN (Huang y Liu 1993, Garel 2005, Leijser *et al.* 2007, Imamoglu *et al.* 2013).
- Diámetro transverso del cerebelo o anchura hemisférica máxima cerebelosa: Definido como la mayor anchura del cerebelo en el plano coronal posterior al nivel del atrio (Garel 2005). Puede realizarse en ecografía fetal, en ecografía neonatal a través de la fontanela mastoidea o en RMN (Leijser *et al.* 2007, Garel 2005).
- Diámetro transcerebeloso: Se define como la máxima distancia lateral cerebelosa, medida en el plano transverso (Vatansever *et al.* 2013). Es muy similar al diámetro transverso del cerebelo, pero calculado en el plano transverso en lugar de en el plano coronal. Se puede determinar en RMN (Pier *et al.* 2016).
- Área o superficie del vermis: Se define como el área delimitada por una línea que rodea el perímetro del vermis en el plano medio-sagital (Garel 2005, Vatansever *et al.* 2013). Habitualmente, se dibuja de forma manual a partir de una imagen de RMN.

En la actualidad, están disponibles valores normativos según la edad (semanas de gestación, recién nacidos a término y prematuros, niños hasta 15 años) para la mayoría de estas mediciones en: ecografía fetal (Pilu y Nicolaidis 1999, Malinger *et al.* 2001), RMN fetal (Garel 2004), ecografía neonatal (Imamoglu *et al.* 2013) y RMN en niños (Jandeaux *et al.* 2019).

Por otro lado, algunas de estas medidas u otros métodos lineales similares, se han utilizado en patología cerebelosa tanto en niños como en adultos. En niños, se han implementado en la evaluación pre y postoperatoria de meduloblastomas (Szathmari *et al.* 2010), en el síndrome de Costello (Calandrelli *et al.* 2015), o la acondroplasia (Calandrelli *et al.* 2017). En adultos, se han aplicado en la malformación de Chiari-I (Urbizu *et al.* 2013), la degeneración espinocerebelosa y la atrofia multisistémica (Hara *et al.* 2016), entre otras.

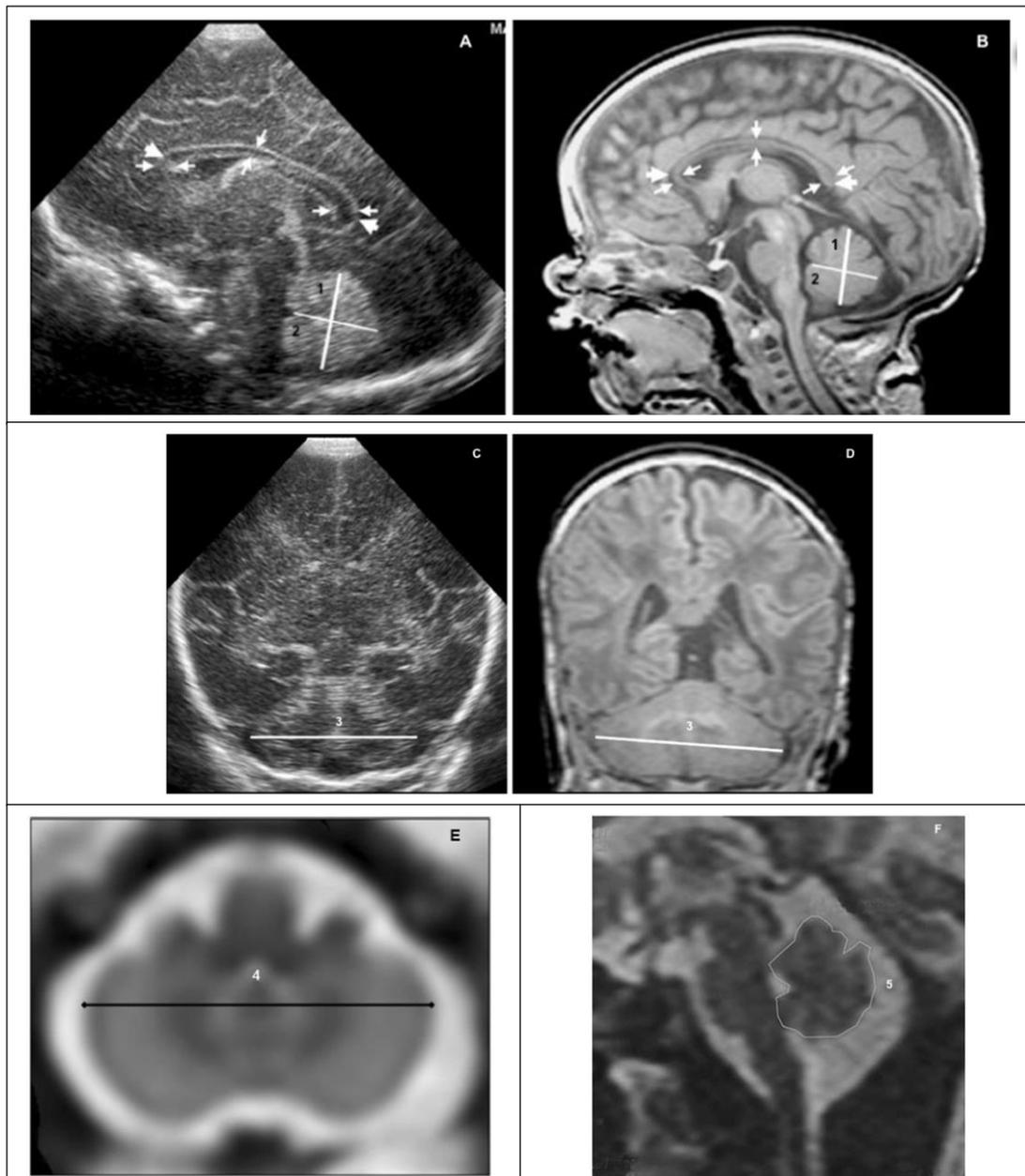


Figura 6. **A)** Ecografía neonatal, plano medio-sagital; **B)** RMN cerebral neonatal, plano medio-sagital; **C)** Ecografía neonatal, plano coronal; **D)** RMN cerebral neonatal, plano coronal; **E)** RMN fetal, plano transversal; **F)** RMN fetal, plano medio-sagital.
(1) Altura del vermis; **(2)** Diámetro anteroposterior del vermis; **(3)** Diámetro transverso del cerebelo; **(4)** Diámetro transcerebeloso; **(5)** Área del vermis.

Imágenes adaptadas de Garel 2005, Leijser et al. 2007, y Vatansever et al. 2013.

5.2. Volumetría cerebelosa

El aumento de la potencia de los campos magnéticos empleados en RMN, junto con el desarrollo de la bioinformática han hecho posible estimar el volumen de diferentes estructuras encefálicas a partir de imágenes en dos dimensiones, inicialmente mediante métodos manuales muy laboriosos, pero posteriormente por técnicas computarizadas cada vez más rápidas (Mormina *et al.* 2017).

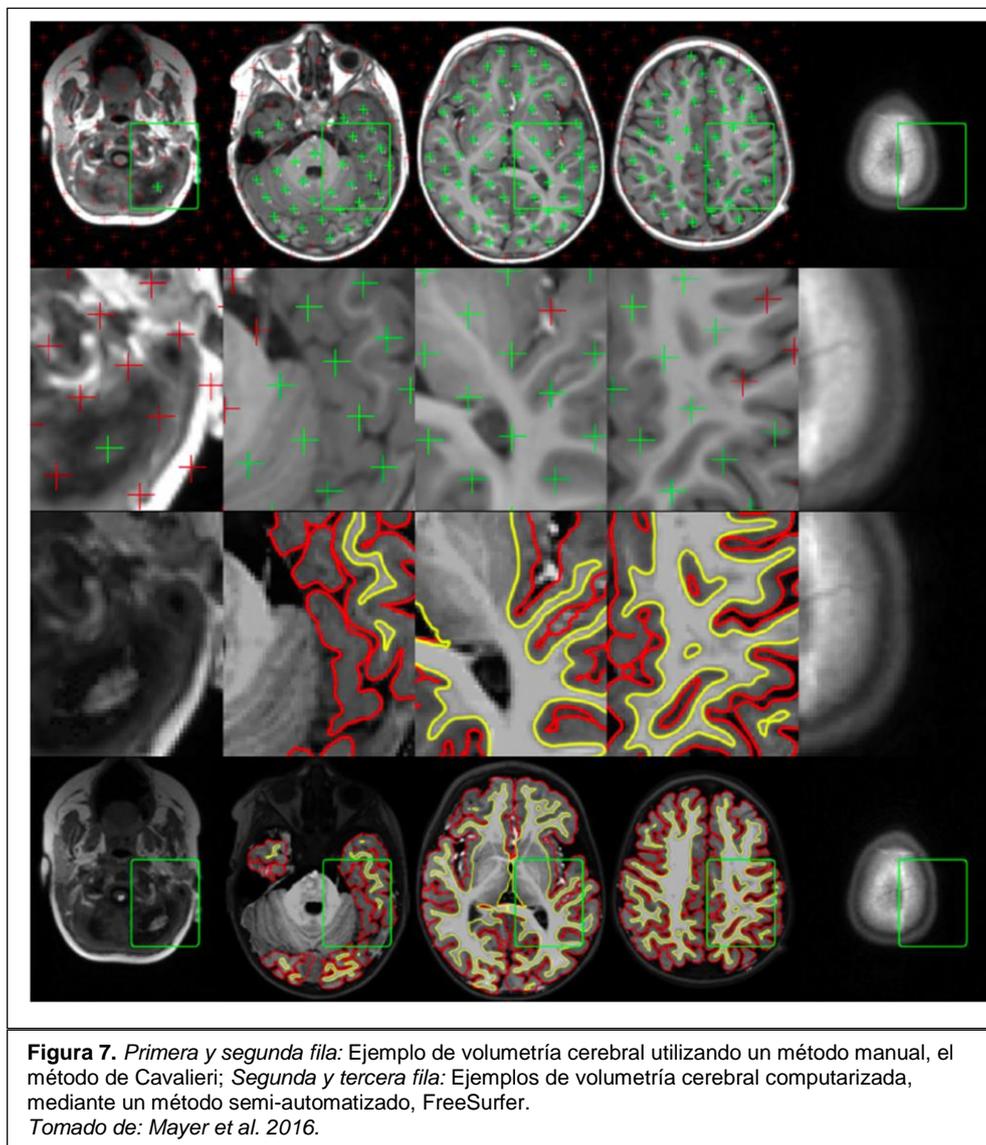
A continuación, se exponen a grandes rasgos las diferentes técnicas disponibles para la obtención de imágenes volumétricas del SNC (**figura 7**):

- **TÉCNICAS MANUALES**: Consisten en la delimitación de diferentes puntos de referencia en las imágenes de RMN a partir de posiciones anatómicas conocidas (ej: puntos en la superficie del cerebelo, en los límites de sustancia gris y sustancia blanca, en los límites de las folias, etc.). Estos puntos son marcados por un operador humano en los 3 planos del espacio (axial, coronal y sagital), para formar regiones tridimensionales. Después un programa informático específico determina el volumen de los vóxeles (o píxeles tridimensionales) obteniéndose así el volumen total de la región seleccionada (Loeber *et al.* 2001, Pierson *et al.* 2002, Ranta *et al.* 2009). Se denominan técnicas “manuales” ya que la selección de las áreas anatómicas (circunvoluciones, lóbulos, córtex, sustancia blanca, núcleos profundos, etc.) se realiza de forma manual por un técnico entrenado. Estos métodos continúan siendo los más precisos, por lo aún hoy se consideran el *gold standard* (Mormina *et al.* 2017). Sin embargo, requieren entrenamiento previo, conocimientos profundos de anatomía, y son técnicas minuciosas que consumen mucho tiempo (Ranta *et al.* 2009).

- **TÉCNICAS COMPUTARIZADAS**: Se caracterizan porque las posiciones anatómicas que delimitan un determinado volumen (ej: determinación de los límites del córtex cerebeloso) son establecidas, total o parcialmente, por programas informáticos diseñados para tal fin (Diedrichsen 2006, Price *et al.* 2014). Cuando estos volúmenes son totalmente decididos por el programa, sin intervención humana, se denominan técnicas automatizadas. En cambio, cuando se requiere un técnico que corrija y complete los volúmenes delimitados por el programa, se denominan técnicas semi-automatizadas (Weier *et al.* 2012). La principal ventaja de las técnicas computarizadas es que los cálculos volumétricos se realizan en mucho menor tiempo. Existen diversas herramientas informáticas desarrolladas para este fin, como Icobrain (Smeets *et al.* 2016), Neuroquant (Brewer 2009), o FreeSurfer (Fischl *et al.* 2002), y otras específicamente diseñadas para estudios volumétricos del cerebelo como SUIT (*spatially unbiased atlas template of the cerebellum and brainstem*), CATK (*cerebellar*

analysis toolkit), o ECCET (Mormina *et al.* 2017). Algunas de estas, han sido mejoradas mediante métodos de aprendizaje automático o *machine learning* (Wang *et al.* 2016).

Las herramientas mencionadas han sido desarrolladas fundamentalmente a partir de imágenes de RMN cerebral de pacientes adultos. Por ello, el análisis de imágenes pediátricas debe resolver 2 problemas fundamentales: a) los artefactos de movimiento que suelen presentar las imágenes pediátricas, y b) las diferencias anatómicas y de crecimiento entre el cerebro del niño y del adulto. Esto último constituye la principal dificultad a solventar, ya que el cerebro infantil, a diferencia del adulto, sigue patrones de crecimiento específicos y no-lineales para diversas áreas cerebrales (Muzik *et al.* 2000, Yoon *et al.* 2009). Para superar estos problemas, se han desarrollado otros instrumentos informáticos como Childmetrix (Phan *et al.* 2018) que permite realizar volumetría cerebral computarizada en niños, con mayor fiabilidad.



Como ocurre con las medidas bidimensionales, actualmente disponemos de valores normativos en individuos sanos para el volumen del cerebelo a diferentes edades, tanto en adultos (Luft *et al.* 1999, Bernard *et al.* 2015), como en niños (Tiemeier *et al.* 2010, Brain Development Cooperative Group 2012).

En niños con patología, se ha utilizado la volumetría para cuantificar la afectación estructural del cerebelo, en el trastorno del espectro autista (Lange *et al.* 2015), la distrofia neuroaxonal infantil (Mascalchi *et al.* 2017), las gangliosidosis GM1 y GM2 (Nestrasil *et al.* 2018) y la enfermedad de Lafora (Villanueva *et al.* 2006), entre otras.

6. Déficit de fosfomanomutasa (PMM2-CDG)

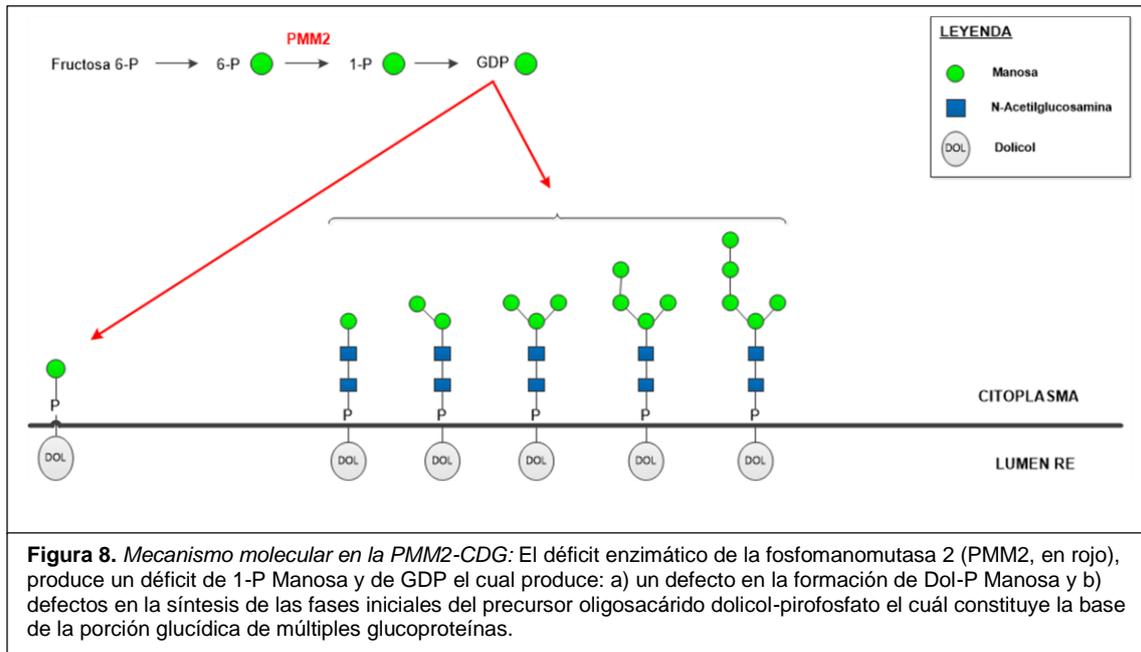
6.1. Introducción

El déficit de fosfomanomutasa (PMM2-CDG) fue descrito por primera vez por el pediatra belga Jaak Jaeken en 1980 (Jaeken *et al.* 1980). Sin embargo, transcurrieron 15 años hasta que se descubrió el defecto enzimático causante, una alteración de la fosfomanomutasa (PMM), y dos años más hasta que el gen codificante para esta enzima, (gen *PMM2*) fue clonado por primera vez (Matthijs *et al.* 1997). Durante una primera etapa, esta entidad se denominó “síndrome de glicoproteínas deficientes en carbohidratos”, más tarde CDG-Ia (debido a su patrón de isoformas de la transferrina de tipo I), y finalmente a partir de 2009, según su nomenclatura genética, PMM2-CDG (Jaeken *et al.* 2009).

La PMM2-CDG es un trastorno genético de herencia autosómica recesiva debido a mutaciones en homocigosis o heterocigosis compuesta (en algún caso también por microdelecciones) (Schollen *et al.* 2007) ocurridas en el gen *PMM2*, localizado en el cromosoma 16p13. El gen *PMM2* codifica la enzima PMM, que se encarga de catalizar el segundo paso de la vía de la manosa, en concreto la conversión de manosa-6-fosfato a manosa-1-fosfato, la cual es una molécula precursora de guanosín difosfato-manosa (GDP-manosa) y dolicol-P-manosa (Dol-P-Man). Estos dos compuestos son los principales dadores de manosa en el RE y son esenciales para la síntesis del oligosacárido dolicol-pirofosfato (Pérez-Cerdá *et al.* 2015). El déficit de GDP-manosa y Dol-P-Man da lugar a escasez del mencionado oligosacárido, lo que a su vez provoca un defecto en la N-glicosilación de múltiples proteínas, incluidas glucoproteínas séricas (enzimas lisosomales y proteínas de transporte), y proteínas de membrana (**figura 8**). Las alteraciones en estas glucoproteínas producen una patología multisistémica en la que predomina la afectación neurológica. A pesar de los mecanismos descritos, no se conoce por completo la fisiopatología de la PMM2-CDG. La variabilidad clínica existente entre pacientes con el mismo genotipo e incluso entre gemelos monocigóticos afectados, indica que probablemente existen otros factores genéticos y ambientales implicados en el espectro fenotípico de la enfermedad (Drouin-Garraud *et al.* 2001, Kjaergaard *et al.* 2001, Barone *et al.* 2008).

Existen más de 900 pacientes en el mundo con diagnóstico de PMM2-CDG confirmado por estudio enzimático o genético. La incidencia estimada de la enfermedad a partir de estudios de portadores sanos, es de 1/20.000 (Schollen *et al.* 2000). En un estudio sobre

frecuencia de defectos congénitos de la glicosilación en Europa, la PMM2-CDG constituyó el 62% de todos los pacientes diagnosticados de CDG (Péanne *et al.* 2018).



6.2. Espectro clínico

a) FENOTIPOS:

La PMM2-CDG puede presentarse en 2 formas clínicas más o menos diferenciadas (de Lonlay *et al.* 2001, Marquardt y Denecke 2003, Pérez-Dueñas *et al.* 2009):

- **Fenotipo clásico o multisistémico:** En ocasiones llamada también forma neurológica-multivisceral. Se caracteriza por un debut más precoz, normalmente en la etapa neonatal o primeros meses de vida. Su curso es por lo general más grave, al menos al inicio, viéndose afectados prácticamente todos los órganos. Suele haber fallo de medro, dificultades para la ingesta, vómitos, afectación hepática y renal, y rasgos dismórficos (faciales, almohadillas de grasa sobre las nalgas o *fat pads*, mamilas invertidas). Algunos lactantes presentan hipoalbuminemia, derrame pericárdico, síndrome nefrótico, anasarca y distrés respiratorio, evolucionando hacia una “fase catastrófica” que tiene como consecuencia el fallecimiento. La mortalidad de esta forma multisistémica en el primer año de vida es del 20%. En su forma más extrema, da lugar a muerte fetal por hidrops no-inmune (van de Kamp *et al.* 2007).

- **Fenotipo neurológico:** Se expresa con sintomatología fundamentalmente neurológica, siendo la ataxia cerebelosa el síntoma principal. Los síntomas digestivos (vómitos, rechazo de la ingesta, fallo de medro) están ausentes. Otros hallazgos neurológicos son: hipotonía, hiporreflexia, estrabismo, desviación tónica paroxística de la mirada, retraso psicomotor/ discapacidad intelectual, retinitis pigmentosa, y neuropatía periférica. Puede haber también afectación extra-neurológica, más leve que en la forma clásica. Estos síntomas sistémicos suelen hacerse patentes a lo largo de la evolución. Entre ellos encontramos: talla baja, hipogonadismo hipogonadotrópico, rasgos dismórficos, alteraciones en la coagulación, cifoescoliosis, osteopenia. En general es una forma de menor gravedad, pudiendo encontrar incluso, en el extremo más leve de su espectro, a adultos con escasos síntomas (Coman *et al.* 2007) o incluso asintomáticos (Vuillaumier-Barrot *et al.* 2011).

La **tabla 7** resume los principales signos y síntomas en la PMM2-CDG.

b) SÍNTOMAS NEUROLÓGICOS:

Como ocurre en otros trastornos congénitos del metabolismo, aún tratándose de una patología multisistémica, el sistema nervioso es el órgano más afectado en la PMM2-CDG. Su síntoma principal es la ataxia secundaria a una atrofia del cerebelo. Esta afectación cerebelosa se suele manifestar, ya desde los primeros meses de vida, con hipotonía, pobre control de la musculatura extraocular (que ocasiona estrabismo intermitente bilateral), y desviación tónica de la mirada hacia arriba (Pérez-Dueñas *et al.* 2009, Drouin-Garraud *et al.* 2001, Melberg *et al.* 2011). Durante los primeros 2-3 años aparece más claramente una ataxia cerebelosa con disartria, dismetría y ataxia de la marcha, de forma que sólo una minoría consigue caminar sin ayuda (Barone *et al.* 2014).

Suele haber asociados a la ataxia, un retraso psicomotor y discapacidad intelectual, de grado entre leve y profundo, aunque en algunos casos el cociente intelectual es normal (Barone *et al.* 2007, Casado *et al.* 2012, Barone *et al.* 2015). También se observa en ocasiones, una neuropatía periférica, habitualmente diagnosticada a partir de los 10 años de edad (Monin *et al.* 2014). Aunque sólo existen registros de velocidades de conducción para una minoría de casos, en la mayor parte de pacientes se aprecia ausencia de reflejos osteotendinosos e hipotrofia muscular en extremidades. Las crisis epilépticas no son excesivamente frecuentes y suelen responder bien a los fármacos antiepilépticos (Barone *et al.* 2015, Schiff *et al.* 2017). Además de la ataxia, se han descrito otros trastornos del movimiento como discinesias de manos y distonía cervical (Rossi *et al.* 2017, Mostile *et al.* 2019).

Tabla 7. Principales signos y síntomas de PMM2-CDG.

ÓRGANO/ SISTEMA	PRINCIPALES SIGNOS/ SÍNTOMAS
Sistema Nervioso	<ul style="list-style-type: none"> - Hipotonía. - Ataxia cerebelosa: dismetría, disartria, ataxia de la marcha, nistagmus. - Retraso psicomotor/ discapacidad intelectual. - Movimientos oculares descoordinados, desviación tónica de la mirada hacia arriba. - Episodios <i>stroke-like</i>, epilepsia, neuropatía periférica. - Atrofia cerebelosa en neuroimagen.
Aparato Digestivo	<ul style="list-style-type: none"> - Vómitos, diarrea, dificultades alimentación, fallo de medro severo.
Sistema Endocrino	<ul style="list-style-type: none"> - Talla baja, hipotiroidismo, hipogonadismo hipergonadotropo, hipoglucemia.
Sistema Hematológico	<ul style="list-style-type: none"> - Tendencia a trombosis y hemorragias.
Sistema Cardiovascular	<ul style="list-style-type: none"> - Derrame pericárdico/ pericarditis, taponamiento cardíaco, miocardiopatía hipertrófica, hipertensión arterial, hipertensión pulmonar, isquemia miocárdica.
Aparato Renal	<ul style="list-style-type: none"> - Riñón poliquístico, nefromegalia, hidronefrosis, proteinuria.
Sistema inmunológico	<ul style="list-style-type: none"> - Infecciones frecuentes, sepsis.
Sistema visual	<ul style="list-style-type: none"> - Estrabismo, retinopatía pigmentaria, miopía, hipoplasia macular.
Aparato Locomotor	<ul style="list-style-type: none"> - Cifoescoliosis, osteopenia/osteoporosis, <i>pectus carinatum</i> o <i>excavatum</i>, pie equinovaro, pie valgo, pie plano.
Rasgos dismórficos/ Malformativos	<ul style="list-style-type: none"> - Facies con fisuras palpebrales “almendradas”, pabellones auriculares grandes, filtrum largo. - Mamilas invertidas. - Lipodistrofia, con acúmulo de grasa superolaterales a crestas ilíacas.
Hallazgos de Laboratorio	<ul style="list-style-type: none"> - IGF-1 baja, aumento de TSH y descenso de FT4, TBG baja, hipoglucemia, insulina elevada, FSH elevada. - Descenso de factores II, V, VII, IX y X, descenso de antitrombina, descenso de proteínas C y S, aumento del tiempo de protrombina, aumento del dímero-D, trombocitopenia. - Proteinuria, aminoaciduria. - Linfopenia, neutropenia, leucocitosis, hipogammaglobulinemia, defecto quimiotaxis de neutrófilos, fallo vacunal. - Descenso de colesterol total, LDL-colesterol y apolipoproteína B, hipotrigliceridemia.

Otra complicación neurológica que puede presentarse son episodios *stroke-like*. Se trata de cuadros transitorios durante los cuales los afectados manifiestan alguno de los siguientes síntomas: estupor, somnolencia, irritabilidad, hemiparesia, crisis epilépticas, afasia, ceguera cortical, etc. Suelen persistir durante horas o días, pero son generalmente reversibles. Con frecuencia no hay desencadenante claro, aunque en algunos aparecen en contexto de cuadros febriles o traumatismos craneales leves. Puede haber cambios electroencefalográficos o alteraciones en la RMN cerebral (edema hemisférico, lesiones focales) (Izquierdo-Serra *et al.* 2018).

c) SÍNTOMAS EN OTROS ÓRGANOS Y SISTEMAS:

Debido a que las glucoproteínas son estructuras ubicuas en el organismo, prácticamente todos los órganos pueden verse afectados en la PMM2-CDG, aunque en general esta disfunción es más extensa en el fenotipo clásico.

A continuación, se describen los principales síntomas extra-neurológicos de la enfermedad:

- Síntomas gastrointestinales: Posiblemente constituyen la afectación extra-neurológica más frecuente. Se presentan en forma de vómitos, diarrea y especialmente fallo de medro asociado a dificultades para la alimentación por probable disfunción deglutoria de origen neurológico (Boyer *et al.* 2003, Shanti *et al.* 2009, Schiff *et al.* 2017). Con frecuencia, los pacientes precisan alimentación a través de sonda nasogástrica o mediante gastrostomía. Por otro lado, es también frecuente la lesión hepática, en los casos más leves únicamente con elevación de transaminasas, en los casos moderados con esteatosis y en las formas más graves como fallo hepático con fibrosis periportal y colestasis (Kristiansson *et al.* 1998, Marques da Silva *et al.* 2017).

- Alteraciones endocrinológicas: Otro de los sistemas más frecuentemente afectado en la forma multisistémica. Los síntomas más prominentes son: talla baja, hipotiroidismo, hipogonadismo hipergonadotrópico e hipoglucemia. La talla baja se ha relacionado con déficit de IGF-1 e IGPBP3, proteínas que se transportan en sangre en forma de complejos glucoproteicos (Kjaergaard *et al.* 2002, Miller *et al.* 2009). El hipotiroidismo suele ser subclínico, aunque si la tiroxina libre (FT4) desciende puede ser necesario iniciar tratamiento con levotiroxina. El hipogonadismo hipergonadotrópico afecta sobre todo a mujeres ocasionando pubertad ausente o retrasada y amenorrea (de Zegher y Jaeken 1995). Algunos lactantes pueden presentar crisis de hipoglucemia con letargia

o crisis epilépticas, desencadenadas en ocasiones por hiperinsulinemia (Böhles *et al.* 2001).

- Síntomas hematológicos: En la PMM2-CDG hay un descenso tanto de factores procoagulantes como anticoagulantes. Entre los factores procoagulantes descendidos encontramos los factores de la coagulación II, V, VII, IX y X. Entre los anticoagulantes suelen estar bajos la antitrombina, y las proteínas C y S. En general, existe un desequilibrio de la hemostasia lo que puede inducir tanto fenómenos hemorrágicos como trombóticos (Van Geet *et al.* 2001). Por ello, los afectados requieren un manejo específico, especialmente durante las intervenciones quirúrgicas (para evitar sangrados excesivos) y en la convalecencia postoperatoria (para evitar trombosis) (Meaudre *et al.* 2005).

- Afectación cardiovascular: Cuando se presenta suele hacerlo durante los primeros meses de vida en el contexto del fenotipo multisistémico en forma de derrame pericárdico/pericarditis, miocardiopatía hipertrófica, hipertensión arterial, hipertensión pulmonar, o isquemia miocárdica (Kusa *et al.* 2003, Rudaks *et al.* 2012). En ocasiones, el derrame pericárdico evoluciona hacia taponamiento y fallo cardiaco, y constituye una de las principales causas de mortalidad (Schiff *et al.* 2017).

- Afectación renal: En la forma multisistémica suele haber algún grado de lesión renal, que se puede manifestar como tubulopatía con proteinuria, riñón poliquístico, nefromegalia o hidronefrosis (Altassan *et al.* 2018).

- Alteraciones inmunológicas e infecciones: Entre las alteraciones inmunológicas encontramos defectos cuantitativos como linfopenia, neutropenia, leucocitosis, hipogammaglobulinemia; y también defectos funcionales (García-López *et al.* 2016) como alteración de la quimiotaxis de los neutrófilos, descenso de CD16 en neutrófilos y déficit de CD14 en monocitos. Estos trastornos ocasionan infecciones frecuentes algunas de las cuales pueden ser graves (Blank *et al.* 2006).

- Afectación oftalmológica: Los hallazgos más habituales son el estrabismo y la retinopatía pigmentaria. El primero suele aparecer durante los primeros meses de vida, mientras que el segundo parece desarrollarse con el tiempo, siendo detectado en la adolescencia y edad adulta (Giurgea *et al.* 2005, Pérez-Dueñas *et al.* 2009). Otros síntomas neurooftalmológicos son: nistagmus, apraxia oculomotora, miopía, retinopatía no pigmentaria, ceguera nocturna, o hipoplasia macular (Morava *et al.* 2009).

- Afectación esquelética: La afectación esquelética no es infrecuente, especialmente en pacientes adultos. Se debe en gran parte a la escasa movilidad secundaria a la ataxia. Se manifiesta especialmente como cifoescoliosis y osteopenia/ osteoporosis de probable causa multifactorial. También puede haber *pectus carinatum* o *excavatum*, pie equinovaro, pie valgo o pie plano (Coman *et al.* 2008, Monin *et al.* 2014, Barone *et al.* 2015).

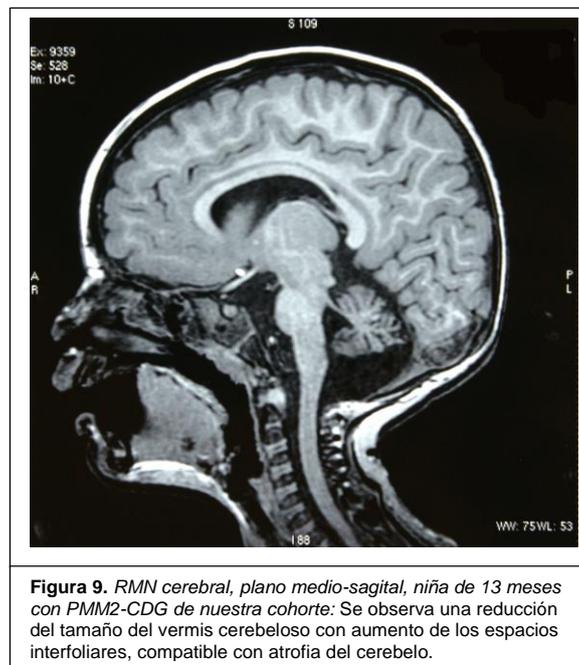
- Alteraciones lipídicas: Muchos pacientes presentan hipocolesterolemia, especialmente descenso de colesterol total, LDL-colesterol y apolipoproteína B. En algunos casos puede haber también hipotrigliceridemia (Briones *et al.* 2002, van den Boogert *et al.* 2017).

- Rasgos dismórficos/ malformativos: Son frecuentes en la PMM2-CDG, tanto en el fenotipo clásico como en el neurológico. Los hallazgos más frecuentes son mamilas invertidas, lipodistrofia (especialmente acúmulo de grasa sobre las nalgas), pabellones auriculares grandes, labios finos, dedos de manos y pies finos y largos, fisuras palpebrales almendradas y criptorquidia (esta última en varones neonatos y lactantes) (Kjaergaard *et al.* 2001, Martinez-Montseny *et al.* 2018).

6.3. Hallazgos radiológicos

Las alteraciones morfológicas que produce la PMM2-CDG a nivel del SNC son apreciables a nivel radiológico, fundamentalmente mediante tomografía computarizada (TAC) craneal y especialmente en imágenes de RMN encefálica. El principal hallazgo y el causante de gran parte de los síntomas neurológicos, es la atrofia cerebelosa (AC) (ver **figura 9**). Ya desde los primeros pacientes descritos se hizo patente la presencia de una marcada AC (Jaeken *et al.* 1980), caracterizada por una reducción del tamaño del cerebelo, con aumento del espacio entre las folias cerebelosas (Feraco *et al.* 2012). Esta afectación es global, pero incide especialmente a nivel del lóbulo anterior del vermis (Akaboshi *et al.* 1995). En algunos casos es posible observar también hiperintensidades corticales cerebelosas en la RMN, asociadas con leve hiperintensidad de la sustancia blanca subcortical (“cerebelo brillante”) en las secuencias FLAIR (*fluid-attenuated inversión-recovery*) y T2.

Si la AC es severa, ocasionalmente se aprecia un aumento del cuarto ventrículo el cual comunica con un quiste en la fosa posterior (Fiumara *et al.* 1996). Esto se considera una variante de la malformación de Dandy-Walker, pero no un Dandy-Walker verdadero, el cual se caracteriza por hipoplasia del vermis (en lugar de atrofia) e hidrocefalia (Barkovich *et al.* 2007). Otros diagnósticos diferenciales en los que coexisten una AC e hiperintensidades cerebelosas corticales son la distrofia neuroaxonal infantil, el síndrome de Mainesco-Sjogren, y diversas enfermedades mitocondriales (Poretti *et al.* 2008, Feraco *et al.* 2012).



Eventualmente, en algunos pacientes puede haber atrofia olivopontocerebelosa (Horslen *et al.* 1991, Pavone *et al.* 1996), pero en menor frecuencia de la que se creía inicialmente. Otros hallazgos menos comunes son: atrofia cortical cerebral, ventriculomegalia, hiperintensidades en sustancia blanca cerebral, y retraso de la mielinización (Miossec-Chauvet *et al.* 2003, Feraco *et al.* 2012, Schiff *et al.* 2017).

En la resonancia magnética cerebral espectroscópica del cerebelo pueden verse una disminución marcada del pico de N-acetilacetato, reducción leve de colina y aumento de inositol (Holzbach *et al.* 1995, Feraco *et al.* 2012).

No está claro por qué existe una afectación preferente del cerebelo en esta entidad. Los trastornos de la N-glicosilación de proteínas se asocian a alteraciones del plegamiento proteico, por lo que se cree que el exceso de proteínas defectuosas activaría una

respuesta metabólica compensatoria y pondría en situación de sobrecarga al retículo endoplasmático. Se ha postulado que las células granulosas del cerebelo y sobre todo las células de Purkinje, son especialmente sensibles al estrés del retículo endoplasmático, por lo que una situación de sobrecarga de esta organela les produciría una lesión mantenida y finalmente la muerte celular (Lecca *et al.* 1995, Sun *et al.* 2013). Esta hipótesis se vería corroborada por los estudios anatomopatológicos realizados en pacientes, los cuales muestran pérdida de células de Purkinje y células granulares, así como pérdida de sustancia blanca y gliosis. Así mismo, las células de Purkinje presentan un árbol dendrítico infradesarrollado con arborizaciones aberrantes (Strømme *et al.* 1991, Aronica *et al.* 2005).

6.4. Diagnóstico

No existen unos criterios de diagnóstico clínico establecidos para la PMM2-CDG. En general, el diagnóstico de sospecha debe hacerse en todos aquellos pacientes que presenten ataxia cerebelosa, atrofia del cerebelo en pruebas de neuroimagen, rechazo de la ingesta y fallo de medro severo en primeros meses de vida, o rasgos dismórficos característicos. Sin embargo, algunas formas paucisintomáticas pueden omitir estos síntomas (Vuillaumier-Barrot *et al.* 2015, de la Morena-Barrio *et al.* 2012).

Contamos con 2 tipos de pruebas diagnósticas, pruebas de cribado y pruebas de confirmación. A continuación, se exponen las características de ambas:

a) PRUEBAS DE CRIBADO:

- **Análisis de la transferrina (Tf)**: Es la prueba de cribado inicial ante un paciente con sospecha clínica de PMM2-CDG. La Tf es una glucoproteína encargada de transportar hierro en la sangre, dónde se encuentra en gran concentración. Habitualmente presenta 4 cadenas de glucanos unidas a su porción proteica, cada una de ellas terminada en una molécula de ácido siálico. Sin embargo, en individuos sanos podemos hallarla en 5 isoformas principales: asialo-Tf o sin ningún residuo de ácido siálico unido a la proteína, monosialo-Tf o con 1 residuo de ácido siálico, disialo-Tf o con 2 residuos, trisialo-Tf o con 3 residuos y tetrasialo-Tf o con 4 residuos (MacGillivray *et al.* 1983). Puede considerarse que la ausencia de uno de estos residuos equivale a la pérdida total o parcial de la cadena de glucanos a la que está unido. Como se ha comentado, en la mayoría personas la isoforma mayoritaria es la tetrasialo-Tf, encontrándose las otras 4

en cantidades muy reducidas. Teniendo esto en consideración, a continuación se exponen los dos métodos existentes de análisis de la transferrina:

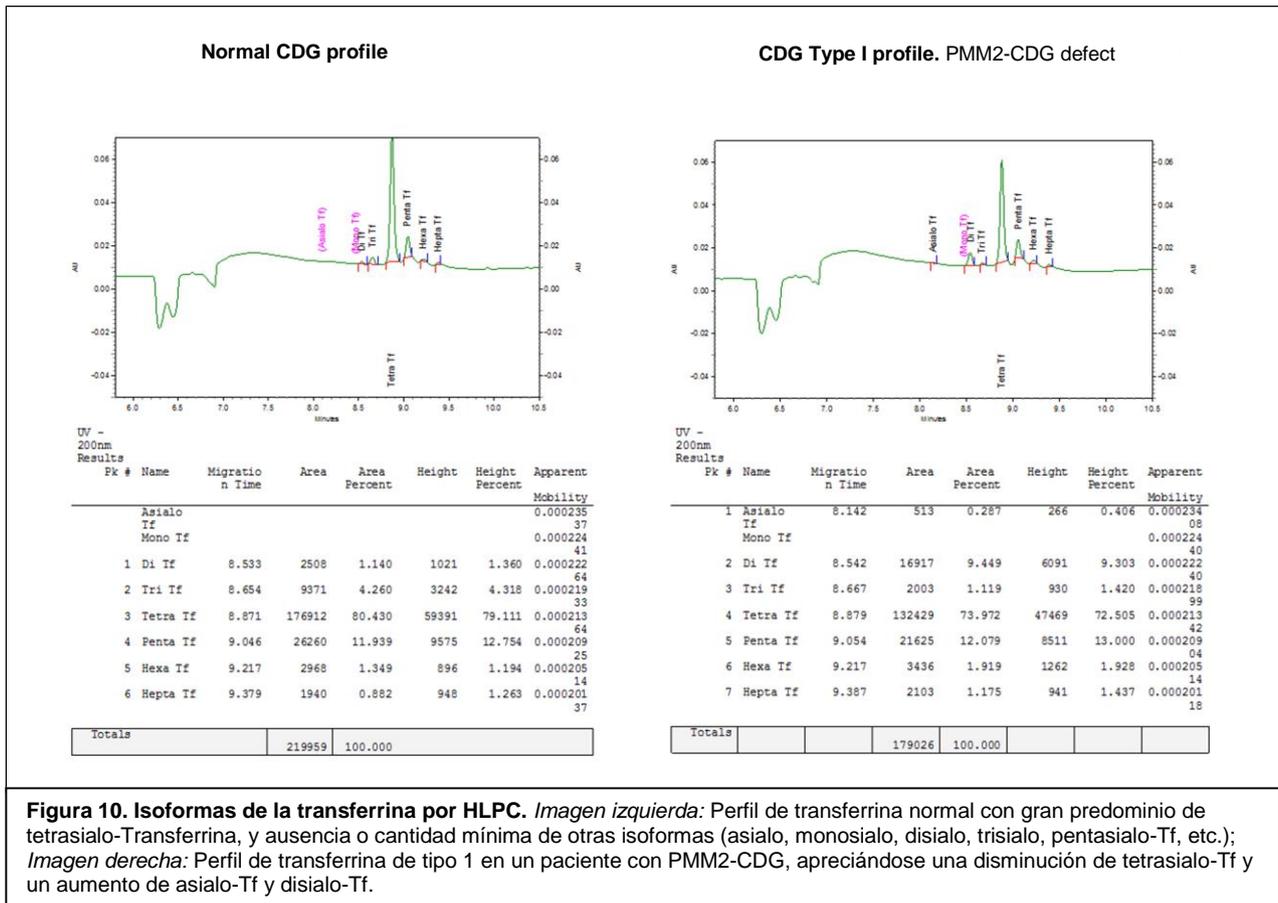
1) Medida del porcentaje de transferrina deficiente en carbohidratos (CDT): Esta prueba nos indica qué proporción de formas hipoglicosiladas de la transferrina existe (asialo, monosialo, disialo y trisialo) con respecto al total de isoformas de transferrina. No nos informa sobre cual es la cantidad de cada una de las formas hipoglicosiladas, por lo que sólo podemos conocer si existe un defecto de la glicosilación, pero no saber cual es el perfil de este defecto. Se puede realizar mediante radioinmunoensayo con dilución isotópica o inmunoturbidimetría. Se ha utilizado para monitorizar la alcoholemia (dónde hay un aumento del % de CDT), y para el cribado de CDG (Colomé *et al.* 2000), aunque en esta última función ha sido superada por el análisis del perfil de isoformas de la transferrina.

2) Análisis del perfil de isoformas de la transferrina: Consiste en el estudio de qué isoformas de la Tf se encuentran aumentadas o disminuidas, y en qué cantidad lo hacen. Se puede realizar por diversos métodos: isoelectroenfoque (IEF), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), electroforesis capilar de zona (CZF), o espectrometría de masas (MS) (Quintana *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2016). Los pacientes con trastornos de la N-glicosilación de proteínas suelen presentar uno de los siguientes 2 patrones anormales de isoformas de la Tf (**figura 10**):

a) Perfil de tipo 1: Aumento de asialo y disialo-Tf, con disminución de tetrasialo-Tf. Indica una pérdida de glicanos completa lo que es característico de los pacientes con defectos del ensamblaje del glicano estándar (oligosacárido dolicol-pirofosfato). Es el perfil presente en la PMM2-CDG (Jaeken y Carchon 2001, Sanz-Nebot *et al.* 2007).

b) Perfil de tipo 2: Aumento de monosialo o trisialo-Tf. Indica un defecto más tardío en los procesos de la N-glicosilación (Sparks y Krasnewich 2005).

El análisis del perfil de isoformas de la transferrina presenta, sin embargo, algunas limitaciones debido a sus posibles falsos positivos y negativos. Entre las causas de falsos positivos se encuentran: personas sanas con variantes polimórficas de la Tf, hepatopatía (por ej. por alcoholismo), sepsis, enfermedades inflamatorias crónicas, la fructosemia y la galactosemia (Pérez-Cerdá *et al.* 2015). Los falsos negativos ocurren sobre todo relacionados con la edad, ya que el perfil de transferrina puede ser normal en recién nacidos (Clayton *et al.* 1992), o en algunos adultos con PMM2-CDG, dado que el perfil de Tf tiende a normalizarse con la edad (Hahn *et al.* 2006).



b) PRUEBAS DE CONFIRMACIÓN:

- **Estudios genéticos:** Podemos utilizar 3 tipos de técnicas de diagnóstico molecular:

1) **Estudio del gen PMM2-CDG:** La técnica de elección para el diagnóstico genético de la PMM2-CDG es la secuenciación por el método de Sanger del gen PMM2. Con ella es posible detectar >99% de las mutaciones en pacientes con diagnóstico enzimático de déficit de PMM. Sin embargo, puede tener falsos negativos en caso de mutaciones intrónicas profundas o deleciones (Schollen *et al.* 2007).

2) **Panel multigénico incluyendo el gen PMM2:** En el caso de encontrarnos con un perfil de isoformas de la Tf de tipo 1 en un paciente con signos clínicos poco específicos o atípicos para PMM2-CDG, una aproximación diagnóstica eficiente podría ser la secuenciación simultánea de varios genes relacionados con defectos congénitos de la glicosilación y perfil de Tf de tipo 1 (Bastaki *et al.* 2018). Algunas de las opciones disponibles para ello son: los paneles específicamente diseñados para CDG, los paneles enriquecidos, o los paneles de exoma clínico. Entre los inconvenientes de estos paneles están su menor sensibilidad con respecto a la técnica de Sanger, la necesidad de confirmar por Sanger cualquier mutación encontrada, y la posibilidad de hallar variantes

de significado incierto en otros genes no relacionados con la patología, que compliquen el diagnóstico (Sparks y Krasnewich 2005). Además de ser coste-efectivos en algunos casos, otra ventaja de los paneles, es que suelen permitir el incluir estudios de delección-duplicación para los genes estudiados (Sparks y Krasnewich 2005).

3) Exoma/Genoma completo: Podrían ser utilizados en casos en los que queramos ampliar el diagnóstico diferencial ya que generen dudas diagnósticas, por ejemplo, en pacientes con PMM2-CDG paucisintomáticos o con síntomas atípicos, en los que el perfil de isoformas de Tf ha sido negativo (falso negativo). Sus inconvenientes son similares a los de los paneles multigénicos (Sparks y Krasnewich 2005). Una de las ventajas del genoma completo sería la inclusión de la secuenciación de regiones intrónicas. En los últimos años, varios pacientes publicados han sido diagnosticados mediante exoma completo (Choi *et al.* 2015).

- **Estudios enzimáticos**: Consiste en el estudio de la actividad enzimática de la fosfomanomutasa 2 en leucocitos o fibroblastos. En pacientes con la forma clásica esta actividad varía entre el 0% y el 10% respecto a un control normal (Van Schaftingen y Jaeken 1995). Si se utiliza como técnica de confirmación del diagnóstico de PMM2-CDG es preferible medir su actividad en leucocitos en lugar de fibroblastos, ya que se ha observado que estos últimos pueden mantener cierta actividad residual para la fosfomanomutasa y desorientar el proceso diagnóstico (Grünewald *et al.* 2001).

c) DIAGNÓSTICO PRENATAL:

En caso de que ambos progenitores sean portadores conocidos de mutaciones causantes de PMM2-CDG (ej. por hijo previo afecto o por identificación mediante los conocidos como *carrier-tests*), el diagnóstico de elección se realiza mediante estudio genético preimplantacional o prenatal (Bjursell *et al.* 1998). También es posible realizarlo mediante estudio enzimático de la actividad de la PMM en cultivo de amniocitos (Edwards *et al.* 2006). Debe evitarse el estudio de isoformas de la transferrina fetal por su tasa de error (Matthijs *et al.* 1998).

6.5. Tratamiento

Por el momento, no hay tratamientos específicos aprobados para la PMM2-CDG, por lo que la terapia se basa fundamentalmente en medidas de soporte orientadas en función de la sintomatología de cada paciente. Estos tratamientos se aplican de forma multidisciplinar, interviniendo especialistas de diversos ámbitos como neuropediatras,

neurólogos, especialistas en metabopatías congénitas, gastroenterólogos, endocrinólogos, especialistas en enfermedades infecciosas, hematólogos, oftalmólogos, médicos rehabilitadores, traumatólogos, fisioterapeutas, psicopedagogos, logopedas, etc. A continuación, se enumeran las principales terapias utilizadas en las manifestaciones más frecuentes (Sparks y Krasnewich 2005, Altassan *et al.* 2019):

a) Retraso psicomotor/ Discapacidad Intelectual: Se recomienda, una vez detectado el retraso del desarrollo, iniciar estimulación temprana, fisioterapia, y a partir de la etapa preescolar, logopedia y tratamiento psicopedagógico. En niños mayores, adolescentes y adultos es fundamental orientar los apoyos hacia el aumento de la funcionalidad, el autocuidado y hacia la mayor independencia y autonomía individual posibles.

b) Ataxia cerebelosa: Se recomienda fisioterapia y ortesis si son necesarias para facilitar la estática o el desplazamiento. Los casos más graves precisan bastones, caminador o el uso de silla de transporte.

c) Episodios *stroke-like*: Los antiepilépticos parecen mejorar tanto las crisis comiciales como los déficits focales neurológicos durante los episodios. También se recomienda el uso de benzodiacepinas, así como valorar los antiagregantes y/o anticoagulantes en la fase aguda si se confirman alteraciones en la coagulación. En casos recurrentes, podría considerarse el uso mantenido de antiagregantes como tratamiento preventivo.

f) Problemas para la ingesta/ fallo de medro: En función de la severidad se recomienda: maximizar el aporte calórico (no son necesarias fórmulas específicas para la enfermedad), fisioterapia/ logopedia para optimizar los movimientos deglutorios, medidas anti-reflujo (posición erguida tras ingesta, espesantes, antiácidos), y si es necesario alimentación por sonda nasogástrica o gastrostomía.

h) Síntomas endocrinológicos: En caso de talla baja podría considerarse el uso de IGF-1 humana recombinante (Miller *et al.* 2013). Si hay hipotiroidismo con TSH elevada, FT4 baja y especialmente si hay sintomatología compatible, se recomienda el uso de levotiroxina vía oral. Las crisis de hipoglucemia deben tratarse con nutrición por sonda nasogástrica a débito continuo, glucosa endovenosa a ritmo de entre 8-10 mg/kg/min y uso de diazóxido en caso de hipoglucemia por hiperinsulinismo. En mujeres con retraso puberal, es recomendable iniciar terapia de reemplazo hormonal con estrógenos por vía dérmica (*European Society for Human Reproduction and Embryology Guideline Group on POI* 2016).

g) Riesgo de trombosis y hemorragias: Con respecto al manejo y prevención de trombosis se aconseja seguir las guías generales de la Asociación Norteamericana de Medicina Torácica (Monagle 2012, Kearon *et al.* 2016). Entre los tratamientos utilizados en pacientes con PMM2-CDG se encuentran la heparina de bajo peso molecular, el rivaroxaban (en pacientes que no responden a heparina) y el concentrado de antitrombina si hay déficit de antibrombina III. Para la prevención de hemorragias en el contexto de intervenciones quirúrgicas se recomienda, el uso preventivo de plasma fresco congelado o concentrado de complejo protrombínico. En el caso de que el concentrado de complejo protrombínico contenga proteínas C y S, su administración debe realizarse teniendo en cuenta los niveles de estos factores anticoagulantes (Meaudre *et al.* 2005).

e) Derrame pericárdico: Requiere adecuada hidratación y nutrición. Además, pueden ser necesarias transfusiones de albúmina.

d) Estrabismo: Si existe un estrabismo no intermitente el oftalmólogo puede valorar el tratamiento con lentes correctoras, parches oculares, o cirugía (reparadora o para administración de toxina botulínica), con el objetivo de preservar la visión.

i) Afectación esquelética: Si hay escoliosis debe valorarse, dependiendo de la severidad, el uso de corsé o cirugía. En presencia de *pectus carinatum* puede ser necesario el uso de ortesis o cirugía. En caso de *pectus excavatum* severo con afectación cardiopulmonar está indicada la cirugía. Si existe osteopenia o osteoporosis, se recomienda aumentar la movilidad y las posturas anti-gravitatorias en lo posible (con andadores o bipedestadores), diagnosticar y tratar el hipogonadismo hipergonadotropo, y valorar el uso de bifosfonatos en caso de fracturas óseas.

JUSTIFICACIÓN DE LA UNIDAD TEMÁTICA E HIPÓTESIS

◆ *Justificación de la unidad temática*

◆ *Hipótesis*

Justificación de la unidad temática.

En la era de la terapia genética, se abren por primera vez posibilidades reales de ofrecer tratamientos modificadores del curso clínico, o incluso curativos, para las enfermedades monogénicas. Sin embargo, existe un importante factor limitante a la hora de abordar este objetivo: suele tratarse de patologías minoritarias con un número escaso de pacientes, separados geográficamente, y tratados por especialistas no vinculados entre sí. Estos condicionantes reducen nuestra capacidad para conocer el espectro clínico asociado a cada defecto genético, su historia natural y sus factores pronósticos. Los defectos CDG son un claro ejemplo de enfermedad minoritaria causada por un defecto genético hereditario. El uso de herramientas para la monitorización y cuantificación clínica de los principales síntomas y signos en pacientes CDG, permitirá avanzar en el conocimiento de esta enfermedad.

Por otro lado, la glicobiología ha sido en los últimos años una de las áreas de mayor desarrollo de la bioquímica y de la biología celular. Sus progresos han tenido una gran repercusión en la medicina (desde el estudio del cáncer hasta los mecanismos de infección viral), la farmacología (componentes de fármacos antivirales, antiepilépticos, vacunas, etc.) y la biotecnología (nanopartículas polisacáridas, nanotubos de carbono, entre otros). Uno de los principales catalizadores de esta evolución gliobiológica ha sido la investigación en trastornos congénitos de la glicosilación. El conocimiento de la fisiopatología de estas enfermedades ha permitido grandes avances en la biología de los glucoconjugados en individuos sanos, siendo un notable ejemplo de investigación traslacional en ambas direcciones.

El propósito de esta tesis es, por una parte, describir las relaciones fenotipo-genotipo, el desarrollo psicomotor, y la sintomatología neurológica general en los pacientes españoles con PMM2-CDG, ampliando el conocimiento sobre esta entidad con pocos casos publicados.

Por otro lado, conocer y cuantificar con escalas objetivas, la historia natural clínica y neurorradiológica de la lesión cerebelosa, origen principal de la ataxia y la discapacidad cognitiva de estos enfermos, permitiendo así medir la eficacia de futuros tratamientos.

Y finalmente, crear en nuestro país una estructura consolidada de investigación en trastornos congénitos de la glicosilación, agrupando a pacientes, clínicos e investigadores básicos, que pueda hacer uso de una plataforma on-line específica, y se encuentre integrada en la red europea de investigación en CDG.

Este estudio supone un acercamiento multidisciplinar a la PMM2-CDG y los CDG. Aspectos clínicos, bioquímicos, genéticos y de neuroimagen han sido evaluados

por expertos de cada uno de los citados campos. La investigación ha estado orientada hacia la búsqueda de una mejor calidad de vida para los pacientes.

Hipótesis.

A pesar de que la PMM2-CDG es una enfermedad genética multisistémica cuya supervivencia durante las primeras etapas de la vida viene determinada por el grado de afectación multiorgánico, una vez transcurridos esos primeros meses es la lesión cerebelosa la que constituye la principal causa de discapacidad. Aunque, desde el punto de vista anatomopatológico, dicha alteración cerebelosa es neurodegenerativa, desde el punto de vista clínico la enfermedad parece comportarse de una forma relativamente estática, especialmente después de los primeros años de evolución. Conocer mejor este periodo inicial, tanto desde el punto de vista radiológico como clínico, permitiría identificar una ventana terapéutica en la que un fármaco podría enlentecer o frenar la progresión de la enfermedad.

Así, cuantificar la ataxia y el grado de atrofia cerebelosa, así como recoger datos sobre los diferentes parámetros clínicos, bioquímicos y genéticos de los pacientes, posibilitaría conocer la historia natural de la enfermedad, establecer factores pronósticos e identificar nuevos fenotipos clínicos.

Por último, para avanzar en el conocimiento de los trastornos congénitos de la glicosilación, resulta fundamental establecer un grupo de investigación nacional que englobe a pacientes y especialistas, y se apoye si es necesario, en las tecnologías de la información. Esta forma de trabajo en red constituye un nuevo modelo de investigación en enfermedades raras, y genera un cambio de paradigma en el estudio de las patologías minoritarias.

OBJETIVOS

1- Objetivo principal

2- Objetivos concretos

1- Objetivo principal

Analizar la evolución natural del déficit de PMM2-CDG tanto desde el punto de vista clínico como radiológico mediante el desarrollo y validación de herramientas que permitan cuantificar los aspectos más relevantes de la enfermedad, como son la ataxia cerebelosa, la disfunción cognitiva y la atrofia del cerebelo.

2- Objetivos concretos

2.1) Desarrollo y validación de escalas clínicas.

Validar la escala ICARS y utilizarla para cuantificar la evolución del síndrome cerebeloso en pacientes con PMM2-CDG mayores de 4 años.

A la vez que se valida la escala ICARS, se busca encontrar una relación entre la gravedad del síndrome cerebeloso y el grado de atrofia del cerebelo, medido mediante métodos bidimensionales y análisis volumétrico en imágenes de resonancia magnética.

2.2) Desarrollo y validación de herramientas radiológicas.

Validar 2 métodos radiológicos para el mejor conocimiento y seguimiento de la afectación cerebelosa como alteración nuclear en el cuadro clínico de la PMM2-CDG. Un método bidimensional de rápida y sencilla implementación, incluso durante la visita médica, el diámetro medio-sagital relativo del vermis (MVRD); y otro volumétrico como herramienta de precisión para medir la lesión del cerebelo en un contexto fundamentalmente de investigación.

Evaluar la progresión de la atrofia cerebelosa en niños con PMM2-CDG usando el MVRD y el análisis volumétrico.

2.3) Ampliar el espectro de fenotipos de la PMM2-CDG mediante el estudio exhaustivo de los pacientes de nuestra cohorte, y correlacionar los diferentes aspectos clínicos (fenotipo, evaluación mediante escalas clínicas, evaluación cognitiva), radiológicos, bioquímicos y moleculares entre sí, en esta entidad.

2.4) Instaurar una red de profesionales y hospitales a nivel nacional para el estudio y seguimiento de pacientes con PMM2-CDG con el soporte y ayuda de las dos instituciones de investigación que centralizan el diagnóstico: CEDEM-UAM de Madrid e IBC-HC de Barcelona.

2.5) Elaborar protocolos clínicos para el manejo práctico de las principales manifestaciones de los CDG, y ponerlos a disposición de los profesionales que atienden a estos pacientes a nivel nacional.

2.6) Desarrollar una herramienta *on-line* abierta a pacientes y médicos, que facilite la investigación en trastornos congénitos de la glicosilación y que proporcione material educativo fiable sobre la enfermedad.

PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

1- Diseño

2- Sujetos de estudio

a. Pacientes

b. Controles

3- Evaluaciones y variables

a. Variables clínicas

b. Estudios neurorradiológicos

c. Estudios bioquímicos en sangre

d. Estudios genéticos y funcionales

e. Protocolos, material docente para familias, y cuestionarios para médicos y pacientes

f. Análisis estadístico

4- Aspectos éticos

1. Diseño

El diseño es transversal y retrospectivo en los dos primeros estudios y ambispectivo de forma global, ya que incluye un estudio prospectivo descrito en el último trabajo publicado. Se analizan datos clínicos, bioquímicos, radiológicos y moleculares de pacientes con PMM2- CDG en la población española.

2. Sujetos de estudio

a. Pacientes

Se incluyeron pacientes con diagnóstico molecular confirmado de PMM2-CDG. Se utilizó como fuente la base de datos compartida entre el Centro de Diagnóstico Molecular CEDEM-UAM de Madrid y el *Institut de Bioquímica Clínica de Barcelona*, IBC-HC de Barcelona. Entre ambos centros se han diagnosticado más de 70 pacientes con este déficit que se encuentran en seguimiento en diferentes hospitales de toda España, y que participan en la red nacional de trabajo en CDG (*CDG Spanish Consortium*).

Criterios de inclusión:

Pacientes diagnosticados de déficit de PMM2-CDG mediante estudios enzimáticos (algunos) y genéticos (en su totalidad) con mutaciones en el gen *PMM2*, en seguimiento en un centro de la red nacional.

En el caso de las evaluaciones clínicas mediante escalas, por las dificultades de comprensión y colaboración en las mismas, y siguiendo las recomendaciones en base a estudios en niños sin ataxia, se incluyeron pacientes con edad superior o igual a 5 años.

En relación a la evaluación neurorradiológica, únicamente se incluyeron aquellas imágenes de RMN cerebral de una calidad suficiente (por ej. sin artefactos de movimiento), y en el caso de los estudios volumétricos, que contasen también con secuencias 3D T1.

Criterios de exclusión:

Se excluyeron a los pacientes que no facilitaron el consentimiento informado o desearon interrumpir su colaboración a lo largo del proyecto, ya fuese personalmente o por decisión de sus padres o tutores.

En el caso de evaluaciones clínicas mediante escalas, por las dificultades de comprensión y colaboración en las mismas, se excluyeron aquéllos que por discapacidad intelectual o problemas de conducta no pudieron participar en las diferentes maniobras.

En el estudio sobre la evolución de ICARS a lo largo del tiempo, se excluyó también a aquellos pacientes que presentasen afectación supratentorial concurrente, episodios *stroke-like* durante el seguimiento, o hubiesen recibido cualquier medicación no validada por el equipo investigador.

Con respecto a los estudios de neuroimagen se excluyó a los pacientes con antecedentes de complicaciones neurológicas que pudiesen afectar a las imágenes de RMN cerebral (ej. accidentes cerebrovasculares).

b. Controles

Para la validación de escalas clínicas (ICARS) se seleccionó una muestra de niños control con desarrollo neurotípico (n=30), sin déficits cognitivos ni problemas de conducta asociados, y comparable en cuanto a edad y sexo con nuestra población de pacientes con PMM2-CDG. Conocemos por publicaciones previas (Brandsma *et al.* 2014) que la propia maduración neurológica del niño da lugar a puntuaciones diferentes a cero. Por este motivo, para estudios comparativos, se aplicó un factor de corrección debido a la edad a partir de los datos de la cohorte de sujetos con desarrollo normal.

En el caso de los estudios de neuroimagen, se valoraron las RMN cerebrales de niños estudiados en el Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona (HSJDBCN), que se solicitaron por cefalea, traumatismos leves, epilepsia focal, antecedentes familiares de aneurismas cerebrales, y trastorno con tics; y cuyas imágenes fueron informadas como normales por especialistas en neurorradiología infantil (n=30). De nuevo, en la selección se tuvo en cuenta la comparabilidad por edad y sexo con el grupo de pacientes PMM2-CDG. Se excluyeron aquellos controles que hubiesen manifestado sintomatología cerebelosa previamente o en los 12 meses posteriores a la RMN cerebral, o que hubiesen sido diagnosticados de una patología con potencial afectación del cerebelo.

3. Evaluaciones y variables

a. Variables clínicas

La evaluación atendió principalmente a las variables clínicas que se afectan en el **síndrome cerebeloso**: motricidad general (marcha, estática, coordinación de miembros), trastorno del lenguaje expresivo (disartria), trastorno del movimiento ocular (nistagmo, sacada, apraxia oculomotora, estrabismo), y perfil neuropsicológico (evolución del desarrollo psicomotor, test psicométricos y perfil conductual). Por otro lado, se analizaron también diversas variables relacionadas con la **afectación general neurológica y multisistémica**.

Síndrome cerebeloso: Se utilizó como principal variable la escala de valoración de función cerebelosa ICARS (International Cooperative Ataxia Rating Scale) (Trouillas *et al.* 1997). La escala ICARS fue aplicada por uno de los tres examinadores clínicos, quien se desplazó a los centros principales durante el proyecto. El examen se grabó en video con objetivos de docencia y de revisión. La grabación en video se realizó siguiendo un protocolo estandarizado. El material audiovisual fue revisado por los otros dos examinadores en el centro coordinador, de modo que cada paciente fue puntuado por tres especialistas de forma independiente, facilitando el análisis de variabilidad y coherencia interobservador en los resultados de la escala.

Para objetivar la evolución y poder describir la historia natural de la enfermedad, el síndrome cerebeloso de los pacientes se evaluó mediante la escala ICARS en dos momentos diferentes de evolución con un intervalo mínimo de 20 meses entre las evaluaciones.

Con respecto al perfil neuropsicológico y la evaluación de inteligencia, en los pacientes que recibieron pruebas neuropsicológicas estructuradas, los datos fueron incluidos para análisis. Para ello se utilizó su cociente intelectual global, obtenido de las pruebas WISC-IV-R (escala de inteligencia de Wechsler para niños-IV, revisada) o KBIT (Kaufman Brief Intelligence Test).

Por otro lado, se recogieron datos del desarrollo psicomotor de forma retrospectiva y/o mediante examen neurológico. La información retrospectiva se obtuvo mediante entrevista con las familias o, cuando estuvo disponible, a partir de las historias clínicas. Se realizaron preguntas sobre los principales hitos de desarrollo de las áreas “desarrollo motor grueso”, “desarrollo motor fino”, “socialización”, “lenguaje expresivo”, y “lenguaje comprensivo”. Para calcular el grado de desarrollo con respecto a su edad, se tomó como referencia la edad de consecución de los hitos según la escala de desarrollo

psicomotor de Haizea-Llevant (Fernández 1991). En concreto, para cada hito se asignó un valor del 100% a la edad en meses a la que el 50% de los niños ya lo ha conseguido (ej: percentil 50 para marcha autónoma= 12 meses, 12 meses= 100% de desarrollo para este hito), y después se dividió la edad de consecución del hito en un paciente concreto, entre el p50 de edad de consecución en la población sana, multiplicando el resultado por 100 (ej: si un paciente consiguió la marcha autónoma con 30 meses, $(30/12) \times 100 = 250\%$). El resultado obtenido refleja el grado de desarrollo con respecto a la población neurotípica (en el ej. anterior, el paciente evaluado tiene un desarrollo motor de -250% para este ítem, es decir su desarrollo es 2,5 veces más lento que el percentil 50 para ese ítem). Finalmente, se calcularon para el conjunto de los pacientes, las medias de retraso en cada área a partir de la suma de las medias de retraso en cada uno de los hitos de esa área, obteniendo así una aproximación al patrón global de desarrollo psicomotor de los niños con PMM2-CDG. Un desarrollo de hasta -125% se consideró normal, dado que para todos los hitos evaluados, su consecución hasta un 1,25% más lento que la población general quedaba por debajo del p95.

Valoración general neurológica y multisistémica: Se recogieron: antecedentes personales y familiares, exploración y manifestaciones neurológicas, y exploración y manifestaciones generales.

La recogida de datos en cuanto a manifestaciones clínicas estuvo centrada en (1) variables somatométricas (peso, talla y perímetro craneal); (2) aspectos neurológicos generales: características clínicas de la ataxia, epilepsia, crisis febriles, movimientos oculares anormales, neuropatía, síntomas visuales y auditivos; (3) afectación multisistémica: dismorfológica, digestiva-nutricional, hepática, cardiaca, renal, hematológica, endocrinológica; (4) pruebas complementarias previas: electroencefalograma, electromiograma, potenciales evocados auditivos, potenciales evocados visuales, electrorretinograma.

Adicionalmente, con respecto a la valoración multisistémica, a los pacientes se les administró la escala de NPCRS (Nijmegen Pediatric Cerebellum Rating Scale) (Achouitar *et al.* 2011) con sus tres secciones: *Section I: Current Function; Section II: System Specific Involvement; Section III: Current Clinical Assessment*. Esta escala fue validada en uno de los grupos de referencia en CDG y está basada en la *Newcastle Paediatric Mitochondrial Disease Scale*. Evalúa información de afectación multiorgánica, incluyendo afectación neurológica de una forma global.

b. Estudios neurorradiológicos

Se revisaron de forma protocolizada las RMN cerebrales realizadas en pacientes ya diagnosticados de PMM2-CDG y las de los nuevos diagnósticos que surgieron durante el proyecto. Se incluyeron igualmente de forma prospectiva los subsecuentes estudios de neuroimagen que se realizaron en pacientes conocidos durante el curso del estudio.

En análisis bidimensional se basó en una medición rutinariamente utilizada en neurosonografía fetal denominada “altura del vermis”. A partir de esta, y teniendo en cuenta también la altura de la fosa posterior, se desarrolló una proporción que denominamos *midsagittal vermis relative diameter* (MVRD). Este estudio sencillo presentó la ventaja de poder implementarse en todas las resonancias magnéticas realizadas con diferentes tecnologías a lo largo de las diferentes edades de los pacientes. El MVRD se calculó utilizando una sección sagital en la línea media de la RMN cerebral, midiendo el diámetro total de la fosa craneal posterior (un segmento lineal desde la comisura posterior cerebral al opistion) y el diámetro sagital de mayor tamaño del cerebelo (paralelo al segmento lineal anterior).



$$MVRD = 100 \frac{a}{A}$$

Figura 11. Determinación del MVRD en un paciente de nuestra cohorte (imagen de RMN cerebral, plano medio-sagital). A: diámetro fosa posterior. a: diámetro sagital mayor del cerebelo.

denominamos *midsagittal vermis relative diameter* (MVRD). Este estudio sencillo presentó la ventaja de poder implementarse en todas las resonancias magnéticas realizadas con diferentes tecnologías a lo largo de las diferentes edades de los pacientes. El MVRD se calculó utilizando una sección sagital en la línea media de la RMN cerebral, midiendo el diámetro total de la fosa craneal posterior (un segmento lineal desde la comisura posterior cerebral al opistion) y el diámetro sagital de mayor tamaño del cerebelo (paralelo al segmento lineal anterior). De esta manera, se valoró la relación entre el diámetro del cerebelo

y el diámetro total de la fosa craneal posterior, obteniendo una medida aproximada del grado de atrofia del vermis cerebeloso.

El estudio volumétrico se llevó a cabo, independientemente del centro emisor, en el Servicio de Radiodiagnóstico del HSJDBC. Para dicho análisis volumétrico se transfirieron las imágenes de las secuencias 3D T1 al programa *Philips IntelliSpace Portal 4.0*, el cuál creó un modelo tridimensional de las mismas permitiendo delimitar los volúmenes de las estructuras deseadas mediante un método computarizado semi-automatizado. Un neuropediatra entrenado en este procedimiento se encargó de corregir y ajustar manualmente en los 3 planos del espacio los volúmenes del cerebelo que el software sugería, de manera que las áreas delimitadas por el sistema se correspondiesen al máximo posible con los límites físicos del cerebelo y excluyesen los pedúnculos cerebelosos, el cuarto ventrículo y los espacios interfoliares. Finalmente, se

obtuvo un volumen cerebeloso en cm^3 para cada resonancia magnética cerebral analizada. El procedimiento, una vez pasada la curva de aprendizaje inicial, requirió unos 30 minutos por estudio.

Para la valoración de la progresión neurorradiológica de la PMM2-CDG, un análisis longitudinal en pacientes con varias RMN cerebrales de calidad suficiente, permitió analizar los valores de un mismo enfermo en diferentes momentos y así estudiar el desarrollo de esta patología, tanto con respecto al MVRD como al volumen del cerebelo. Para cuantificar la evolución de la atrofia cerebelosa por unidad de tiempo, utilizamos la siguiente fórmula: $(\text{MVRD de la primera resonancia magnética} - \text{MVRD de la resonancia magnética de seguimiento}) / \text{intervalo de tiempo entre ambos estudios de resonancia magnética (años)}$. Un resultado positivo representó una disminución en el tamaño cerebeloso.

Para facilitar la correlación entre los aspectos clínicos y el estudio volumétrico se consideraron como válidas aquellas RMN cerebrales realizadas en un periodo previo no superior a un año con respecto a la evaluación clínica. En caso de que las resonancias hubiesen sido obtenidas con anterioridad mayor de un año, se solicitaron nuevas RMN cerebrales de control.

Para los análisis comparativos en relación al MVRD entre pacientes y controles, se utilizó 1 estudio de RMN cerebral de control por cada estudio de un paciente (50 estudios de pacientes y 50 estudios de controles). Para los análisis comparativos sobre volumen cerebeloso, se emplearon 2 estudios de control por cada estudio de un paciente con el objetivo de incrementar la sensibilidad estadística (19 estudios de pacientes y 38 estudios de controles). Todos los pacientes y sus controles fueron apareados por edad y sexo.

En el HSJDBCN las RMN cerebrales se obtuvieron con el equipo General Electric de 1.5 T, Signa Excite HD, Milwaukee, WI, USA. El protocolo estándar constó de secuencias: T1- sagital, SPGR 3D T1-axial (secuencia volumétrica), fast-spin echo with fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR) coronal y FSE DP-T2-axial. Se realizó de forma específica un protocolo que incluyó dos secuencias (sagital y coronal) FIESTA (fast imaging employing steady state acquisition) en fosa posterior, para tener mejor contraste y resolución. Con respecto a las RMN cerebrales realizadas en otros centros, se aceptaron todos aquellos estudios que incluyeron, al menos, secuencias T1, T2, FLAIR y Difusión, junto con imágenes en los 3 planos del espacio (axial, sagital y coronal).

c. Estudios bioquímicos en sangre

El análisis del perfil de sialotransferrina en suero se analizó en los laboratorios del HSJDBCN, IBC-HC y CEDEM-UAM, en función de la procedencia de la muestra, mediante isoelectroenfoque (IEF), electroforesis capilar zonal (CZF) o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se aplicaron dichos métodos semicuantitativos para mejorar la sensibilidad y facilitar la posibilidad de establecer una correlación entre los datos cuantitativos obtenidos tras la evaluación clínica y radiológica, y las anomalías bioquímicas en los diferentes análisis del perfil de sialotransferrinas.

Para el estudio de otros órganos y sistemas dentro de las posibles alteraciones relacionadas con la PMM2-CDG se utilizaron los estudios generales que se realizan de rutina en el laboratorio del HSJDBCN, o bien, se recogió información sobre los análisis efectuados en los hospitales de referencia de los pacientes. Estos fueron: hemograma con las diferentes series, glucosa, iones, pruebas de función hepática, pruebas de función renal, colesterol total y triglicéridos, tiempo de protrombina (PT), factores de coagulación (IX, X y XI), antitrombina III, proteínas C y S, hormona estimulante de la tiroides (TSH) y tiroxina libre (FT4), así como otras determinaciones más concretas en función de las comorbilidades del paciente.

d. Estudios genéticos y funcionales

En todos los pacientes y progenitores se realizaron análisis genéticos para confirmar la presencia de variantes patogénicas en ambos alelos del gen *PMM2*, así como estudios de segregación familiar para comprobar su carácter hereditario.

Para el estudio se utilizó DNA genómico (y en algunos casos además RNAm), extraído de leucocitos de sangre periférica o fibroblastos. La técnica utilizada fue diferente según el paciente: secuenciación de Sanger del gen *PMM2*, panel enriquecido, o bien panel *TSO Illumina*. La confirmación fue llevada a cabo en cada paciente y sus progenitores utilizando PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y sucesiva secuenciación de Sanger. Los cebadores utilizados para la amplificación de DNA se diseñaron utilizando la base de datos ENSEMBL (<http://www.ensembl.org/index.html>, ENSG00000140650) y el número de acceso de GenBank NM_000303.2. Las nomenclaturas de las mutaciones se realizan según: <http://www.hgvs.org./mutnomen>.

e. Protocolos, material docente para familias, y cuestionarios para médicos y pacientes

Tanto los protocolos para pacientes nacionales, como el material docente para familias incluido en Rarecommons (www.rarecommons.org), se desarrollaron utilizando la bibliografía existente sobre PMM2-CDG y defectos congénitos de la glicosilación. Únicamente para aquellos aspectos específicos en los que la información publicada era escasa o inexistente, se incluyó la opinión de los redactores en función de su experiencia clínica. En el caso del material docente para familias se adaptó la terminología científica para una mejor comprensión por parte de los lectores. Tanto los cuestionarios para médicos como aquellos para pacientes, de acceso a través de Rarecommons, se crearon en función de las principales manifestaciones conocidas de la PMM2-CDG, así como de otras que se consideraron de interés por el equipo investigador. De igual manera que en el material docente, en los cuestionarios para familias se adaptó el lenguaje y la complejidad de las preguntas para que pudiesen ser cumplimentadas por personas sin formación médica.

f. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software SPSS V.22.0 (Armonk, NY: IBM Corp.).

Las variables clínicas (historia familiar, antecedentes perinatales, manifestaciones clínicas, escalas, estudios cognitivos), bioquímicas y genéticas se recogieron en bases de datos custodiadas siguiendo las directrices de protección de datos del HSJDBCN. Se detallaron variables cuantitativas y categóricas, especialmente para los estudios clínicos, radiológicos y bioquímicos.

La prueba U de Mann-Whitney se utilizó para comparar la puntuación total de ICARS y la de sus subescalas entre pacientes y controles. Para evaluar la validez interobservador de ICARS y sus subescalas en los pacientes, se calcularon los coeficientes de correlación intraclase (ICC). La consistencia interna de la escala ICARS y sus subescalas se evaluó utilizando el alfa de Cronbach. La prueba de coeficiente de correlación de Spearman se usó para estudiar la relación de ICARS con NPCRS, diámetro relativo medio-sagital del vermis (MVRD) y cociente intelectual. Esta misma prueba se utilizó también para evaluar la relación entre MVRD con NPCRS y cociente intelectual, así como para analizar la asociación entre NPCRS y cociente intelectual. Para evitar el efecto de confusión de la edad en la muestra de pacientes, se obtuvo un

nuevo valor de ICARS para cada paciente restando los valores medios de ICARS encontrados en nuestra población de control a diferentes edades.

El coeficiente de correlación de Pearson se empleó para estudiar la relación entre el MVRD y el volumen cerebeloso. Para analizar la evolución del MVRD y el volumen cerebeloso según la edad, se usaron el coeficiente de correlación de Pearson así como modelos de regresión lineal teniendo en cuenta la edad, el grupo (pacientes y controles), y su interacción como variables independientes.

Para comparar los resultados de ICARS1 (primera evaluación de la escala) con ICARS2 (segunda evaluación de la escala), y entre las diferentes subescalas, se utilizó la prueba T Student. Para analizar la correlación entre la mejoría anual de ICARS con respecto a la edad en el momento de la evaluación y con respecto a la magnitud inicial del ICARS, se utilizó la correlación de Pearson. Se analizó la correlación entre ICARS y los volúmenes cerebelosos calculando la correlación de Spearman (no paramétrica).

Para todos los análisis, un valor de $p < 0,05$ se consideró significativo.

4. Aspectos éticos

El estudio, presentado en el global de un proyecto FIS, obtuvo el aval del Comité de Investigación y Ética del Hospital Sant Joan de Déu (número de referencia: CEIC_PIC-108-14).

Los padres dieron su consentimiento informado por escrito, y los niños y adolescentes dieron su consentimiento/asentimiento, tanto para la participación como para obtener documentación gráfica (vídeos y fotografías).

Las muestras biológicas utilizadas se obtuvieron de conformidad con la Declaración de Helsinki de 1964, revisada en octubre de 2013 en Fortaleza, Brasil.

RESULTADOS

1- Características de la población española con PMM2-CDG. Fenotipado clínico y neurológico de precisión.

2- Publicaciones científicas.

2.1 Aplicación de la escala ICARS para la valoración de la ataxia cerebelosa en pacientes con PMM2-CDG, y su correlación con los estudios de neuroimagen y las pruebas cognitivas.

2.2 Evolución neurorradiológica de la atrofia cerebelosa en la PMM2-CDG cuantificada mediante medidas bidimensionales (MVRD) y volumetría.

2.3 Evolución del síndrome cerebeloso en niños con PMM2-CDG.

3- Protocolos de actuación.

3.1 Protocolo diagnóstico en los defectos congénitos de la glicosilación.

3.2 Manejo de los trastornos de la coagulación en pacientes con PMM2-CDG.

4- Consolidación de un grupo de trabajo multicéntrico en CDG de ámbito nacional, el Consorcio Español en CDG.

5- Participación en la red de investigación europea en trastornos congénitos de la glicosilación, "Euro-CDG".

6- Creación de contenidos y soporte on-line en CDG para familias y profesionales sanitarios: "RareCommons".

7- Comunicaciones a Congresos.

1. Características de la población española con PMM2-CDG. Fenotipado clínico y neurológico de precisión.

Mercedes Serrano, Belén Pérez-Dueñas, Víctor De Diego, y el Consorcio Español en CDG.

Aunque el objetivo principal de este trabajo estuvo orientado hacia la descripción de la historia natural de la PMM2-CDG y la validación de escalas neurológicas y radiológicas, también fue posible recoger información clínica general y neurológica detallada de 27 pacientes (14 varones y 13 mujeres). Las características principales de esta cohorte se detallan en la **tabla 8**.

Los parámetros perinatales fueron en general, normales. En la mayoría de casos (21/25) el embarazo transcurrió sin incidencias. En 1 gestación se detectó polihidramnios, y en 1 caso se trató de un embarazo de trillizos, 2 de los cuales fallecieron espontáneamente intraútero. Sobre el parto, el 91% (23/32) nacieron a término (semanas 37-41) y el 9% (2/23) fueron pretérminos de 31 y 36 semanas. El parto fue eutócico en el 69% de casos (15/22), por cesárea en el 22% (5/22) e instrumentado en el 9% (2/22).

En 27 pacientes contamos con datos sobre el primer síntoma. Todos iniciaron síntomas relacionados con la PMM2-CDG durante el primer año de vida (rango: desde el nacimiento hasta los 9 meses). La edad media al debut fue de 2,4 meses. En el 29,6% de los pacientes la enfermedad se manifestó inicialmente con síntomas en un único órgano o sistema (el 37% con síntomas digestivos y el 33,3% con síntomas neurológicos). Los pacientes restantes debutaron con una combinación de síntomas neurológicos y digestivos (14,8%) o de síntomas neurológicos y visuales (14,8%).

Se dispuso de información sobre el desarrollo psicomotor en 17 pacientes (10 varones y 7 mujeres), con una media de edad en el momento de la revisión de 9,7 años (rango: 10 meses - 34 años). El mayor retraso se observó, por orden, en las áreas motora gruesa, motora fina y lenguaje expresivo. La comprensión y el desarrollo social fueron normales o casi normales. Ninguno de los pacientes que consiguieron el sostén cefálico después de los 6 meses o la sedestación estable más allá de los 15 meses, había conseguido caminar a los 5 años. Cabe destacar que, una paciente valorada a los 34 años, consiguió caminar a los 13 años, y correr, aunque con dificultad, a los 28 años.

Tabla 8. Características generales y neurológicas de la cohorte española con PMM2-CDG (27 pacientes)

Edad media a la valoración (rango)		11a (1m – 34a)
Género M/F		14/13
Perímetro craneal	Microcefalia congénita	1/14 (7%)
	Microcefalia adquirida	4/12 (33%)
Peso	Bajo peso al nacimiento	3/23 (13%)
	Bajo peso adquirido	6/15 (40%)
Talla	Talla baja al nacimiento	1/15 (7%)
	Talla baja adquirida	7/14 (50%)
Primer síntoma	Digestivo	10/27 (37%)
	Neurológico	9/27 (33%)
	Neurológico y digestivo	4/27 (15%)
	Neurológico y visual	4/27 (15%)
Ataxia		15/15 (100%)
Hipoplasia/Atrofia cerebelosa		19/19 (100%)
Marcha independiente		6/20 (30%)
Afectación cognitiva		14/17 (82%)
Crisis febriles		3/19 (16%)
Epilepsia		2/22 (9%)
EEG	Normal	11/15 (73%)
	Alterado	4/15 (27%)
Episodios stroke-like		4/20 (20%)
Neuropatía		6/16 (37%)
	Axonal	2/4 (50%)
	Desmielinizante	2/4 (50%)
Afectación visual		21/22 (95%)
Afectación auditiva*		2/7 (29%)

Abreviaturas. m: mes; a: años; EEG: electroencefalograma.

*: Potenciales evocados auditivos del tronco cerebral alterados.

Todos los pacientes explorados (100%, 15/15) presentaron signos de ataxia. Todos mostraron (aunque con diferente nivel de gravedad): ataxia de la marcha, temblor de acción, disimetría, y disdiadococinesia. El paciente más leve fue el único en el que no se observó disartria ni afectación de la movilidad ocular (ausencia de nistagmus, movimientos sacádicos, o disimetría de las sacadas). Analizando individualmente las subescalas del ICARS, evaluando de forma porcentual el grado medio de afectación en cada subescala (puntuación media para todos los pacientes analizados con respecto a la puntuación máxima) y comparando estos porcentajes entre subescalas, se observó que los pacientes evidenciaban una ataxia global, aunque con predominio de afectación de la marcha y el lenguaje expresivo (disartria), estando algo menos afectadas las funciones cinéticas y oculomotoras. Un resumen de las características del desarrollo psicomotor y la ataxia puede verse en la **tabla 9**.

Dispusimos de datos sobre la presencia de epilepsia en 22 pacientes. Únicamente un 9% (2/22) fue diagnosticado de epilepsia.

En ambos casos las crisis fueron tónico-clónicas generalizadas y se controlaron completamente con un único fármaco antiepiléptico (en un caso levetiracetam y en el otro caso, ácido valproico).

Tabla 9. Características detalladas del desarrollo psicomotor y la ataxia en la cohorte española con PMM2-CDG

Desarrollo Psicomotor	Media (nº pacientes)
Retraso motor grueso	-285% (17)
Retraso motor fino	-251% (13)
Retraso lenguaje expresivo	-160% (17)
Retraso lenguaje comprensivo	-118% (7)
Retraso social	-128% (14)
Ataxia	Media* (nº pacientes)
Postural y marcha	48% (15)
Disartria	46% (15)
Funciones cinéticas	38% (15)
Movimientos oculares	30% (15)

*: (puntuación media subescala/ máximo subescala) x 100.

Sólo se observaron alteraciones electroencefalográficas en 1 de los 2 pacientes, en forma de descargas de punta-onda en regiones centrales. Además de las descargas de punta-onda centrales descritas en el paciente con epilepsia, el trazado mostró en 3 pacientes sin crisis clínicas los siguientes hallazgos: descargas epileptiformes generalizadas en 1 paciente, disminución difusa de amplitud en otro caso, y un trazado de base discretamente organizado en el paciente restante.

En 20 enfermos contamos con información sobre la aparición previa de eventos *stroke-like*. Estos se definieron como cuadros con sintomatología compatible con un accidente cerebrovascular agudo (ej. hemiparesia, afasia, parálisis facial central, somnolencia) pero en ausencia de hallazgos en la neuroimagen relacionados con esta etiología. De los 4 pacientes que sufrieron episodios *stroke-like* (4/20, 20%), todos ellos presentaron más de un episodio, manifestándose en un rango de edad entre los 2 y los 32 años. El desencadenante fue un traumatismo craneoencefálico leve en 2 de los 4 casos, mientras que en los otros 2 el desencadenante fue desconocido. Una paciente presentó múltiples

episodios clínicamente compatibles con parálisis facial central desencadenados por traumatismos, mostrando el último de ellos a los 32 años, momento en el que se inició tratamiento con clopidogrel, sin nuevos eventos similares posteriores. Un paciente recibió tratamiento con ácido valproico inicialmente para ser sustituido después por ácido acetilsalicílico, mientras que otro fue tratado con ácido acetilsalicílico en primera instancia, para ser cambiado después por clopidogrel.

En base a los estudios neuropsicológicos disponibles (ver primer artículo de este apartado) y a la percepción de los cuidadores y familiares, los pacientes presentaron dificultades intelectuales centradas en problemas de atención, lentitud para la ejecución de tareas, fatigabilidad e inteligencia verbal más afectada que la manipulación. El cociente intelectual medio fue compatible con discapacidad intelectual leve (CI medio de 65). A nivel de conducta, se observaron estereotipias frecuentes, escasa flexibilidad y conductas obsesivas en algunos casos, aunque en general mostraron un desarrollo adecuado de sus habilidades sociales.

Se obtuvieron datos genéticos de 19 pacientes. En ellos, se encontraron 22 mutaciones distintas. Dos de los pacientes (2/17) presentaron la misma mutación en homocigosis (p.P113L, p.E139K) debido a isodisomía materna. Se describió 1 mutación nueva (c.523+3A>G), posiblemente afectando al *splicing* del precursor del RNA mensajero. Así mismo, se encontró otra mutación localizada en un intrón (IVS3+2T>C).

Con respecto a la actividad enzimática, se dispuso de información en 11 pacientes, en su mayoría obtenida a partir de fibroblastos. La **tabla 10** muestra las relaciones entre el genotipo, la actividad enzimática, y la presentación clínica (puntuación ICARS; neurológica o multisistémica; leve, moderada o grave).

Tabla 10. Relaciones genotipo-fenotipo y actividad enzimática de los pacientes de la cohorte española con PMM2-CDG

Paciente (edad, género) ¹	Forma clínica ²	ICARS	Actividad enzimática ³	Genética 1 ⁴	Genética 2 ⁴	Fenotipo
1 (5, F)	N	10	30% (ND)	R123Q	C241S (3)	- Leve
2 (8, M)	N	ND	28% (ND)	R141H (5)	R162W (3)	- Leve
3 (10, M)	N	23	ND	R162W	c.523+3A>G	- Leve
4 (8, F)	M	61	33% (L)	P113L (5)	T118S+P184D	- Grave
5 (9, F)	N	34	ND	F157S	R162W	- Leve
6 (2, M)	M	ND	19% (ND)	Y64C	R141H	- Moderado
7 (1m, F)	M	ND	33% (F)	V129M	IVS3+2T>C	- Grave
8 (16, M)	M	4	ND	E93A	R141H	- Leve
9 (10m, F)	M	ND	ND	P113L	F207S	- Grave
10 (5, F)	N	70	ND	P113L	P113L	- Grave
11 (2, M)	N	ND	<10% (ND)	E139K (3)	F207S	- Grave
12 (7, F)	N	17	6% (ND)	F157S	C241S	- Leve
13 (16, F)	M	62	8,4% (ND)	R123X	I153T	- Grave
14 (5, M)	M	50	ND	R141K	C241S	- Leve
15 (10, F)	M	47	16% (ND)	P113L	D209G	- Grave
16 (7, M)	N	18	ND	L32R	R141H	- Leve
17 (10, F)	N	60	9,5% (F)	T237M	c.640-9 T>G	- Grave
18 (11, M)	M	79	11,4% (ND)	E139K	E139K	- Grave
19 (5, M)	M	ND	ND	G15E	R141H	- Moderado

ND: no disponible. ICARS: *International Cooperative Ataxia Rating Scale*. **1.** Edad en el momento de la exploración en años, salvo leyenda "m" indicando meses; M: masculino, F: Femenino. **2.** N: Neurológica; M: Multisistémica. **3.** L: Linfocitos; F: Fibroblastos. **4.** En negrita: mutaciones más prevalentes en esta serie (su frecuencia se indica entre paréntesis).

2. Publicaciones científicas

2.1 Aplicación de la escala ICARS para la valoración de la ataxia cerebelosa en pacientes con PMM2-CDG, y su correlación con los estudios de neuroimagen y las pruebas cognitivas.

“Phosphomannomutase deficiency (PMM2-CDG): ataxia and cerebellar assessment”

Mercedes Serrano, Víctor De Diego, Jordi Muchart, Daniel Cuadras, Ana Felipe, Alfons Macaya, Ramón Velázquez, M. Pilar Poo, Carmen Fons, M. Mar O'Callagan, Angels García-Cazorla, Cristina Boix, Bernabé Robles, Francisco Carratalá, Marisa Girós, Paz Briones, Laura Gort, Rafael Artuch, Celia Pérez-Cerdá, Jaak Jaeken, Belén Pérez y Belén Pérez-Dueñas.

Orphanet Journal of Rare Diseases 2015; 10: 138.

En los artículos publicados hasta el momento, la evaluación de la ataxia como principal síntoma de los pacientes con PMM2-CDG, se limitaba a la descripción clínica de sus diferentes vertientes (ataxia de la marcha, disimetría, disartria, nistagmus, etc.). Por otro lado, la valoración de la atrofia del cerebelo también se había restringido a una descripción de sus características visuales, sin que se dispusiese de herramientas de ponderación adecuadas para la misma.

En este artículo, por primera vez en pacientes PMM2-CDG, se cuantificó el grado de ataxia utilizando una escala objetiva, la escala ICARS, la cual fue además validada para esta enfermedad. También por primera vez en la PMM2-CDG, se midió el grado de atrofia del cerebelo en resonancia magnética cerebral, utilizando para ello una técnica bidimensional de rápida y sencilla implementación y reproducibilidad, el diámetro relativo medio-sagital del vermis (MVRD).

Adicionalmente, se correlacionaron las puntuaciones de la escala ICARS en pacientes con las obtenidas en niños sanos de la misma edad, y se compararon los resultados de la escala ICARS en pacientes con: su grado de afectación multisistémica (escala pediátrica de valoración de los CDG de Nijmegen, NPCRS), su grado de atrofia cerebelosa (MVRD), y su cociente intelectual (IQ).

Finalmente, se describieron las características clínicas de los pacientes participantes, con especial atención a sus particularidades genéticas y sus relaciones genotipo-fenotipo.

Serrano et al. *Orphanet Journal of Rare Diseases* (2015) 10:138
DOI 10.1186/s13023-015-0358-y



RESEARCH

Open Access



Phosphomannomutase deficiency (PMM2-CDG): ataxia and cerebellar assessment

Mercedes Serrano^{1*}, Víctor de Diego¹, Jordi Muchart², Daniel Cuadras⁴, Ana Felipe⁵, Alfons Macaya⁵, Ramón Velázquez⁶, M. Pilar Poo¹, Carmen Fons¹, M. Mar O'Callaghan¹, Angels García-Cazorla¹, Cristina Boix¹, Bernabé Robles⁷, Francisco Carratalá⁸, Marisa Girós⁹, Paz Briones⁹, Laura Gort⁹, Rafael Artuch³, Celia Pérez-Cerdá¹⁰, Jaak Jaeken¹¹, Belén Pérez¹⁰ and Belén Pérez-Dueñas¹

Abstract

Background: Phosphomannomutase deficiency (PMM2-CDG) is the most frequent congenital disorder of glycosylation. The cerebellum is nearly always affected in PMM2-CDG patients, a cerebellar atrophy progression is observed, and cerebellar dysfunction is their main daily functional limitation. Different therapeutic agents are under development, and clinical evaluation of drug candidates will require a standardized score of cerebellar dysfunction. We aim to assess the validity of the International Cooperative Ataxia Rating Scale (ICARS) in children and adolescents with genetically confirmed PMM2-CDG deficiency. We compare ICARS results with the Nijmegen Pediatric CDG Rating Scale (NPCRS), neuroimaging, intelligence quotient (IQ) and molecular data.

Methods: Our observational study included 13 PMM2-CDG patients and 21 control subjects. Ethical permissions and informed consents were obtained. Three independent child neurologists rated PMM2-CDG patients and control subjects using the ICARS. A single clinician administered the NPCRS. All patients underwent brain MRI, and the relative diameter of the midsagittal vermis was measured. Psychometric evaluations were available in six patients. The Mann–Whitney *U* test was used to compare ICARS between patients and controls. To evaluate inter-observer agreement in patients' ICARS ratings, intraclass correlation coefficients (ICC) were calculated. ICARS internal consistency was evaluated using Cronbach's alpha. Spearman's rank correlation coefficient test was used to correlate ICARS with NPCRS, midsagittal vermis relative diameter and IQ.

Results: ICARS and ICARS subscores differed between patients and controls ($p < 0.001$). Interobserver agreement of ICARS was "almost perfect" (ICC = 0.99), with a "good" internal reliability (Cronbach's alpha = 0.72). ICARS was significantly correlated with the total NPCRS score (r_s 0.90, $p < 0.001$). However, there was no agreement regarding categories of severity. Regarding neuroimaging, inverse correlations between ICARS and midsagittal vermis relative diameter (r_s -0.85, $p = 0.003$) and IQ (r_s -0.94, $p = 0.005$) were found. Patients bearing p.E93A, p.C241S or p.R162W mutations presented a milder phenotype.

Conclusions: ICARS is a reliable instrument for assessment of PMM2-CDG patients, without significant inter-rater variability. Despite our limited sample size, the results show a good correlation between functional cerebellar assessment, IQ and neuroimaging. For the first time a correlation between ICARS, neuroimaging and IQ in PMM2-CDG patients has been demonstrated.

Keywords: Cerebellum, Congenital disorders of glycosylation, Developmental disorders, Gait disorders/ataxia, MRI, Neuropsychological assessment

* Correspondence: mserrano@hsjdbcn.org

¹Neuropediatric Department, Hospital Sant Joan de Déu, U-703 Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBER-ER), Instituto de Salud Carlos III, Passeig Sant Joan de Déu, 2. 08950 Esplugues, Barcelona, Spain
Full list of author information is available at the end of the article



© 2016 Serrano et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Congenital disorders of glycosylation (CDG) comprise some 100 genetic disorders caused by impaired synthesis of glycoconjugates [1, 2]. Mammals have eight major glycosylation pathways in the endoplasmic reticulum and Golgi, and the N-linked glycosylation pathway is by far the best studied [3, 4].

Phosphomannomutase deficiency (PMM2-CDG, previously CDG-Ia), is the most frequent congenital disorder of N-linked glycosylation and accounts for approximately 80 % of all diagnosed patients since it was described in 1980 [5]. PMM2-CDG is caused by mutations in *PMM2* (*#601785OMIM), encoding an enzyme that catalyzes the second step in the N-glycosylation pathway, the conversion of mannose-6-phosphate to mannose-1-phosphate.

The CNS and peripheral nervous system are prime targets of PMM2-CDG deficiency, but many other systems are affected, as in other CDG [2].

Early clinical signs of PMM2-CDG are usually abnormal fat distribution, inverted nipples, strabismus and hypotonia. Infants develop ataxia, psychomotor delay and extraneurological manifestations, including failure to thrive, enteropathy, hepatic dysfunction, coagulation abnormalities and cardiac and renal involvement. The phenotype is extremely variable: some patients develop a severe systemic illness leading to early death [6, 7], and some patients show milder forms with variable systemic and mild neurological involvement [2, 8].

Cerebellar involvement is a common feature of PMM2-CDG. At birth, most children have marked hypotrophy of the vermis and cerebellar hemispheres, followed by progression towards atrophy [9, 10]. However, in mild cases, brain MRI may be normal [8]. Many key neurological symptoms found in PMM2-CDG patients can be explained by this cerebellar syndrome (ataxia, dysmetria, tremor, abnormal eye movements, dysarthria, and cognitive deficits or low intelligence quotient (IQ)), leading to major disability.

The recently validated Nijmegen Pediatric CDG Rating Scale (NPCRS) based on the Newcastle Paediatric Mitochondrial Disease Scale, evaluates multisystemic data, including neurological involvement [11]. However, this scale does not specifically assess cerebellar symptoms.

The International Cooperative Ataxia Rating Scale (ICARS) is a neurologist-completed scale developed to assess cerebellar ataxia [12], that has been recently validated in healthy children above 4 years of age [13]. ICARS has been used in some genetic diseases such as Friedreich ataxia, coenzyme Q deficiency and others [14, 15]. However, no standardized tools have been used to evaluate cerebellar dysfunction in PMM2-CDG patients.

In the present study, we aim to assess the validity of the ICARS in children and adolescents with genetically

confirmed PMM2-CDG deficiency. ICARS results are compared with NPCRS, neuroimaging, IQ and molecular data.

Methods

Eligible patients included children and adolescents older than four years of age with a molecular diagnosis of PMM2-CDG. Exclusion criteria were severe cognitive impairment or behavioral problems precluding complete administration of the scales.

A pediatric age-matched control population was selected. The control sample included children older than four years recruited by open advertisement or from children attending the Hospital Sant Joan de Déu (HSJD) outpatient clinic for mild, untreated tensional headache. Exclusion criteria were cognitive or behavioral problems.

ICARS involves a 100-point rating scale with higher scores denoting more evident clinical abnormalities (https://commondataelements.ninds.nih.gov/Doc/NOC/International_Cooperative_Ataxia_Rating_Scale_NOC_Link.pdf) [12]. ICARS includes subscores for posture and gait (0–34), kinetic functions (0–52), speech abnormalities (0–8) and oculomotor function (0–6). Three independent child neurologists rated PMM2-CDG patients simultaneously with the ICARS. All of the examinations were videotaped following a standardized protocol for educational and revision purposes. The NPCRS was administered by one of the three child neurologists on the same day as the ICARS assessment.

Brain MRI exams included T1 and T2-weighted, diffusion-weighted and FLAIR sequences. An adapted measurement procedure similar to the classic fetal cerebellum measurements was applied [16, 17]. The relative diameter of the midsagittal vermis was calculated using a midsagittal section and measuring total posterior cranial fossa diameter in a linear segment from the posterior commissura to the opisthion and the largest sagittal diameter of the cerebellum parallel to the previous linear segment. The ratio of the cerebellum diameter over the total posterior cranial fossa diameter was used (Fig. 1). Only those patients with MRI studies performed within the two years preceding ICARS assessment were included in this analysis ($n = 9$).

Biochemical and molecular studies were carried out in all PMM2-CDG patients enrolled. Genetic analysis was performed in the CEDEM-UAM in Madrid. Total mRNA and genomic DNA were isolated from venous whole blood or patient-derived fibroblasts using a MagnaPure system following the manufacturer's protocol (Roche Applied Science, Indianapolis). Mutational analysis was performed by genomic DNA analysis both in patients' and parents' samples to assure that both changes are on different alleles and to rule out the presence of a large genomic rearrangement. In some cases the effect on splicing was



Fig. 1 Midsagittal vermian relative diameter (MVRD). Legend: Midsagittal vermian relative diameter (MVRD) was calculated using a midsagittal section and measuring total posterior cranial fossa diameter (a linear segment from the posterior commissura to the occipital bone at the foramen magnum) and the largest axial diameter of the cerebellum parallel to the previous linear segment. The fraction (cerebellum diameter/total posterior cranial fossa diameter) is used to express the proportion of both values: $MVRD = 100 \frac{a}{A}$. The image represents MVRD calculation of patient 5, with a MVRD result of 49 %

analyzed by cDNA profile analysis. The primers used for cDNA and genomic DNA amplifications were designed using the ENSEMBL database (<http://www.ensembl.org/index.html>, ENSG00000140650) and GenBank accession number NM_000303.2. Segregation genetic studies were performed in all patients. Maternal isodisomy was detected in patients 12 and 13 by SNP array analysis (Infinium CytoSNP-850 K BeadChip).

For intelligence evaluation, six patients received structured neuropsychological testing; their global IQ, obtained from WISC-IV-R or K-BIT tests, was used for analysis.

Ethical permission for the study was obtained from the Research & Ethics Committee of the HSJD. Parents gave their written informed consent and children/adolescents gave their assent. Samples were obtained in accordance with the Helsinki Declaration of 1964, as revised in October 2013 in Fortaleza, Brazil.

Statistical analysis was performed using SPSS V.22.0 (Armonk, NY: IBM Corp.). The Mann-Whitney *U* test was used to compare ICARS and ICARS subscales between patients and controls. To evaluate inter-observer agreement in patients' ICARS and ICARS sub-scales, intraclass correlation coefficients (ICC) were calculated. Internal consistency of the ICARS scale and its sub-scales was evaluated using Cronbach's alpha. Spearman's rank correlation coefficient test was used to study the relationship between the ICARS and the NPCRS, mid-

sagittal vermian relative diameter and IQ. To avoid the confounding effect of age in the patient sample, a new ICARS value for every patient was obtained subtracting the mean values of the ICARS found in our control population at different ages. All statistical tests were two-sided. *P*-values <0.05 were considered significant.

Results

Thirteen PMM2-CDG children (mean age 9.3 years (SD 3.5; range [4.9-16.2]); five males, eight females) were included in the study. One teenager affected by PMM2-CDG was excluded due to severe cognitive impairment that precluded the assessment of ICARS. Tables 1 and 2 show clinical, radiological and molecular data, ICARS and NPCRS results. Twenty-one children between the ages of four and fifteen years were included in the study as control subjects (mean age 8.41 years (SD 3.2; Range [4.0-14.3]); 13 males, eight females). Eleven were recruited by open advertisement, and ten were outpatients.

ICARS and ICARS subscores were significantly different between patients and controls (patients' mean 41.1 vs. controls' mean 1.3; $p = 0.01$) (Fig. 2a). There was a statistically significant inverse correlation between the controls' age and ICARS that was not present in patients ($r_s = -0.86$, $p < 0.001$).

The ICCs for interobserver agreement of ICARS (three different observers) was scored "almost perfect" (ICC = 0.99), with an internal reliability when the four subscales are included scoring as "good" (Cronbach's alpha = 0.72). Only exclusion of the oculomotor subscore would have increased Cronbach's alpha. Inter-item evaluation in every subscale reliability was scored "excellent" for postural/gait, kinetic and dysarthria subscores (0.96, 0.94 and 0.88, respectively) and "poor" for the oculomotor subscale (0.20).

The ICARS score was positively correlated with the total NPCRS score ($r_s = 0.90$, $p < 0.001$) (Fig. 2b). However, patients with high ICARS values (60, 61 and 70, respectively) were in the low-moderate category of severity according to the NPCRS, and only the most severe patient (79 total ICARS) was in the low range of the severe category in the NPCRS (Fig. 2b). Regarding the NPCRS sections, ICARS correlated with Section I (Current Function) ($r_s = 0.92$, $p < 0.001$), and Section III (Current Clinical Assessment) ($r_s = 0.88$, $p < 0.001$) but not with section II (System Specific Involvement) ($r_s = 0.35$, $p = 0.27$).

Regarding the genetic basis, 14 different previously described mutations were identified, and one novel mutation (c.523 + 3A > G). Eleven patients were compound heterozygous and two were homozygous for the p.P113L or p.E139K. Both patients presented a maternal isodisomy. Transcriptional profile analysis of patient 6 patient-derived fibroblasts revealed an aberrant transcript due to skipping from exon 3 to 6 (r.179_523del345, p.Val60_Ile174del).

Table 1 Molecular findings and multiorgan characteristics

Patient/Sex	1 Male	2 Female	3 Female	4 Male	5 Male	6 Female	7 Female	8 Male	9 Female	10 Female	11 Female	12 Female	13 Male
Molecular findings	p.E93A/ p.R141H	p.R123Q/ p.C241S	p.F157S/ p.C241S	p.L32R/ p.R141H	p.R162W/ c.523 + 3A > G	p.F157S/ p.R162W	p.P113L/ p.D209G	p.C241S/ p.R141H	p.T237M/ c.640-9 T > G	p.P113L/ c.353C > T + c.550C > A	p.R123X/ p.I153T	p.P113L/ p.P113L	p.E139K/ p.E139K
Age at evaluation/ age at onset	15 years/ 21 months	6 years/ 9 months	8 years/ 8 months	7 years/ Newborn	10 years/ 3 months	10 years/ 8 months	11 years/ Newborn	5 years/ 2.5 years	11 years/ 8 months	8 years/ 7 months	16 years/ Newborn	6 years/ 3 months	11 years/ Newborn
Dysmorphic features	Large normal setting ears	Almond slanted eyes	No	Anteverted ears	Inverted nipples	Lipodystrophy	Almond slanted eyes, lipodystrophy	No	Almond slanted eyes	Almond slanted eyes, low anteverted ears, lipodystrophy	Almond slanted eyes, thick lips, pronounced cheekbones, lipodystrophy	Almond slanted eyes, broad face, large mouth, lipodystrophy,	Almond slanted eyes, broad face, large mouth, lipodystrophy
Cardiac involvement	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	PDA	Truncus arteriosus
Digestive involvement	Diarrhea, hypoglycemia	No	No	Vomits	No	↑ALT	↑ALT, AST (only perinatal period)	No	↑ALT, AST	Growth failure, hypoglycemia	Vomits, growth failure, diarrhea	↑ALT, AST	Failure to drive
Coagulation	↓ AT-III, PC	↓ AT-III, PC, PS	↓ AT-III, PC	↓ AT-III, PC	Normal	↑ PT; ↓AT-III, PS	↓ PC, PS	No	↓FXI	↑PT, aPTT, ↓AT-III, PC, PS	↓ aPTT	↓ AT-III	↑PT
Endocrine involvement	No	No	No	No	No	No	Hypergonadotropic hypogonadism	No	No	Mild ↑TSH, hypoglycemia	Delayed puberty	ND	No
Kidney involvement	Nephro calcinosis	No	No	No	No	No	No	No	No	↑Echogenicity, nephrolithiasis	Proteinuria	No	No
Eye abnormalities	Strabismus, pigmentary retinopathy	Strabismus upgaze deviation	Strabismus	Strabismus, hypermetropia, astigmatism	Strabismus, saccadic movements hypermetropia	Strabismus, hypermetropia	Strabismus, hypermetropia, astigmatism, abnormal ERG	No	Strabismus	Strabismus, upgaze deviation, saccadic movements	Strabismus, upgaze deviation, retinopathy, hypermetropia	Strabismus, hypermetropia	Strabismus

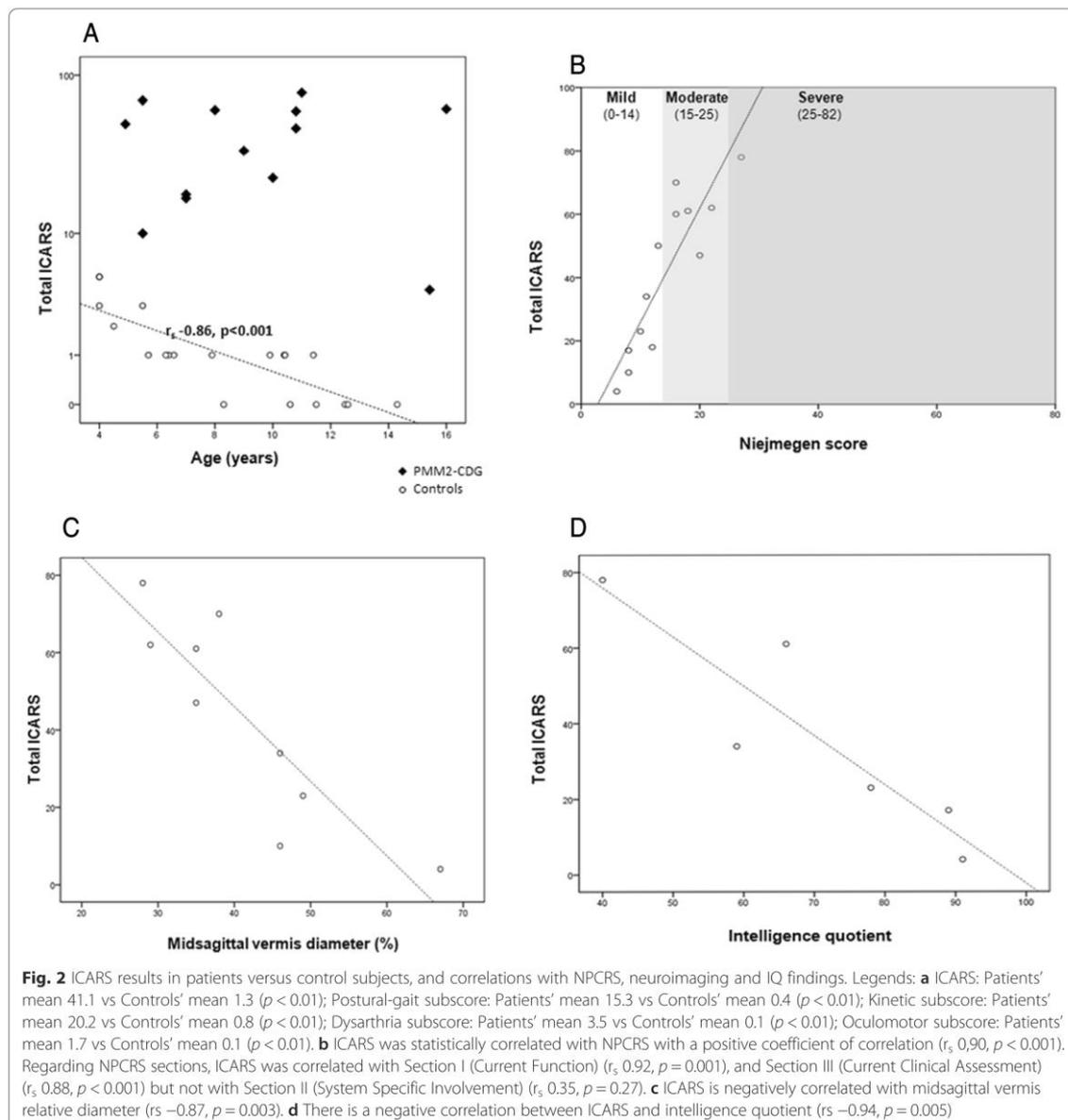
PDA Persistent ductus arteriosus, ALT Alanine transaminase, AST Aspartate transaminase, ↑ Increased values, ↓ Decreased values, AT-III Antithrombin III, PC Protein C, PS Protein S, FXI Coagulation factor XI, aPTT Activated partial thromboplastin time, FIX Coagulation factor IX, PT Prothrombin time, ND No data available, TSH Thyroid stimulating hormone

Table 2 Molecular findings and neurological evaluation (neuroimaging, IQ, NPCRS and ICARS results)

Patient/Sex	1 Male	2 Female	3 Female	4 Male	5 Male	6 Female	7 Female	8 Male	9 Female	10 Female	11 Female	12 Female	13 Male
Molecular findings	p.E93A/p.R141H	p.R123Q/p.C241S	p.F157S/p.C241S	p.L32R/p.R141H	p.R162W/c.523 + 3A > G	p.F157S/p.R162W	p.P113L/p.D209G	p.C241S/p.R141H	p.T237M/c.640-9 T > G	p.P113L/c.353C > T + c.550C > A	p.R123X/p.I153T	p.P113L/p.P113L	p.E139K/p.E139K
Age at evaluation	15 years	6 years	8 years	7 years	10 years	10 years	11 years	5 years	11 years	8 years	16 years	6 years	11 years
Peripheral neuropathy	Motor-sensory axonal neuropathy	No NC/↓DTR	No NC/↓DTR	No	No NC/↓DTR	Slow nerve conduction	No	No NC/↓DTR	No NC/↓DTR	Slow nerve conduction velocity	Slow nerve conduction velocity	No NC/↓DTR	No NC/↓DTR
Epilepsy	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Yes
Psychometric evaluation	IQ 91 (WISC-IV)	ND	IQ 89 (WISC-IV)	ND	IQ 78 (K-BIT)	IQ 59 (WISC-IV)	ND	ND	ND	IQ 66 (K-BIT)	IQ 40 (K-BIT)	ND	ND
MRI findings	Mild prominence cerebellar folia	Cerebellar vermis atrophy	Global cerebellar atrophy	ND	Global cerebellar atrophy	Global cerebellar atrophy	Global cerebellar atrophy	Global cerebellar atrophy	Cerebellar vermis atrophy	Global cerebellar atrophy, juxtacortical signal change	Global cerebellar atrophy with pons atrophy	Global cerebellar atrophy	Global cerebellar and pons atrophy, ventricular enlargement
MRI MVRD	67 %	46 %	No recent MRI ^a	No recent MRI ^a	49 %	46 %	35 %	No recent MRI ^a	No recent MRI ^a	35 %	29 %	36 %	28 %
NPCRS	6	8	8	12	8	11	20	13	16	18	22	16	27
ICARS	4	10	17	18	23	34	47	50	60	61	62	70	79

NC Nerve conduction studies, DTR Deep tendon reflexes, IQ Intelligence quotient, WISC-IV Wechsler Intelligence Scale for Children, Fourth edition, K-BIT Kaufman Brief Intelligence Test, Second edition, MVRD midsagittal vermis relative diameter, NPCRS Nijmegen Pediatric CDG Rating Score, ICARS International Cerebellar Assessment Rating Scale

^aSee criteria in the text to include MRI in the analysis



Patients bearing p.E93A, p.C241S or p.R162W mutations presented a milder phenotype with less severe ICARS and milder cerebellar findings on MRI. Patients bearing p.P113L and E139K presented the most severe ICARS and cerebellar atrophy (Fig. 3).

All patients showed different degrees of cerebellar atrophy on MRI, mostly vermian atrophy. The cerebellar atrophy was more evident in those with higher ICARS (Fig. 3). An inverse correlation between midsagittal vermis relative diameter and ICARS was found (r_s -0.85 , $p =$

0.003) (Fig. 2c). Midsagittal vermis relative diameter was also inversely correlated with NPCRS (r_s -0.95 , $p < 0.001$).

Concerning IQ, despite the small number of patients available, there was a negative correlation between ICARS and IQ (r_s -0.94 , $p = 0.005$) (Fig. 2d), NPCRS and IQ (r_s -0.94 , $p = 0.005$) and midsagittal vermis relative diameter and IQ (r_s -0.90 , $p = 0.037$).

To avoid the confounding effect of age in the patients' sample, a new ICARS value for every patient was obtained subtracting the mean values of ICARS found in

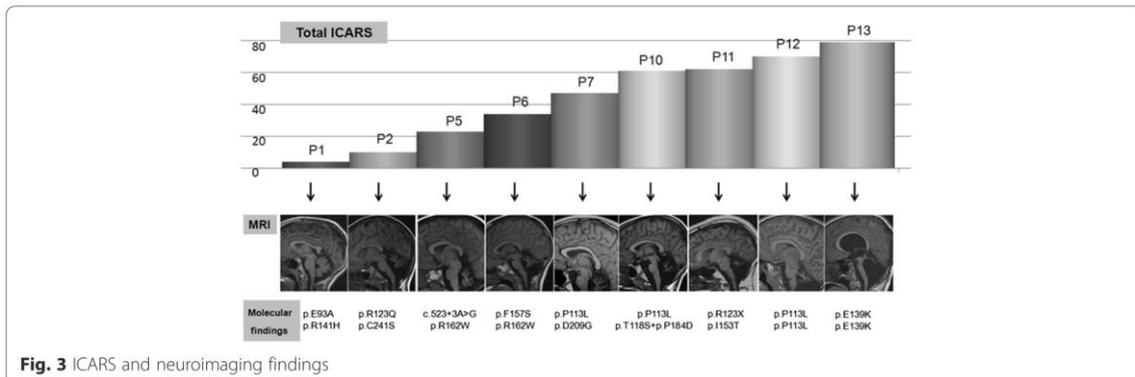


Fig. 3 ICARS and neuroimaging findings

our control population at different ages. All of the above described significant correlations between ICARS and NPCRS, MRI findings or IQ remained unchanged when the new ICARS value was introduced into the analyses.

Discussion

ICARS is a commonly used evaluation for patients with ataxia. It is an exhaustive scale from which some other derivatives, such as BARS (Brief Ataxia Rating Scale), have been created to increase the speed of the evaluation. The value of ICARS, BARS and SARA (Scale for the Assessment and Rating of Ataxia) have recently been validated in the pediatric population above 4 years of age [13]. SARA includes a restricted number of items; for instance, oculomotor abnormalities are not included, which is a major drawback because they are frequently found in PMM2-CDG patients. The previous evidence of ICARS reliability when applied to children underlines the necessity of age correction in the interpretation of absolute ICARS results. This is particularly true in the sub-scores of posture and gait and limb coordination, as both areas are the most influenced by variation in fine and gross motor skills and change during normal neurodevelopment [13].

Regarding pediatric patients under 4 years of age, at the present time, big efforts are being performed by patients' associations and clinicians to develop an ataxia rating score.

In the present study, differences in ICARS scores between PMM2-CDG patients and controls were important and statistically significant. There was no age effect in patient scores when a "corrected-by-age" ICARS was included in the analysis. This fact is probably due to the limited impact of age compared to the effect of the clinical phenotype.

When applying ICARS, inter-observer variability varied between "almost perfect" and "substantial". Concerning inter-item reliability for every subscale, the worst results were obtained regarding oculomotor abnormalities. This

may be explained by the fact that only three items were evaluated and by the influence of the collaboration of the patient, hampering proper scoring and data interpretation. This methodological issue should prompt reconsideration of SARA, a scale that does not rely upon evaluation of oculomotor abnormalities. However, this is a major drawback because signs of oculomotor dysfunction were frequently observed in our series of PMM2-CDG patients, and the oculomotor subscore was significantly higher in patients compared to controls (Fig. 2a).

Non-cerebellar aspects of the neurological spectrum of PMM2-CDG patients can act as potential confounders to ICARS assessment, such as muscle weakness, peripheral neuropathy, extracerebellar muscle hypotonia and cognitive impairment, increasing the final score. Sival et al. evaluated sensory ataxia and muscle weakness in children affected by Friedreich ataxia scored using ICARS [14]. They conclude that only maximal sensory ataxia and pronounced muscle weakness increase the ICARS score, reaching a maximal plateau. None of our included PMM2-CDG patients had pronounced muscle weakness or severe peripheral neuropathy. Moreover, unlike Friedreich ataxia, spinal cord abnormalities are not included in the PMM2-CDG phenotype.

Concerning cognitive impairment as a further limitation to ICARS, we facilitated the comprehension of the different maneuvers by training the patient before the final evaluation. In addition, we allowed the patients to imitate movements, as they completed the test together with their siblings or parents. The evaluators found that the patients' comprehension was enough to understand and perform the maneuvers in thirteen PMM2-CDG patients. However, one teenager was excluded from the study due to severe cognitive impairment that precluded the assessment of ICARS. We found limb coordination and oculomotor sub-scores the more challenging items both for patients and controls.

In summary, two main limitations should be considered in a particular patient when rating a PMM2-CDG patient

with ICARS; the level of cooperation/comprehension as well as sensory abnormalities and/or peripheral neuropathy. Considering that PMM2-CDG patients usually associate cognitive impairment, their neurodevelopmental quotient is relevant for the interpretation of ICARS. Finally, future longitudinal studies will be necessary to demonstrate the validity of this scale when assessing the progression of cerebellar manifestations in PMM2-CDG.

The NPCRS is a scale based on the Newcastle Pediatric Mitochondrial Disease Scale recently validated for CDG patients, reflecting cross-usefulness in these two groups of diseases with multiple organ system involvement [11]. Although NPCRS is a good tool for the global evaluation of the patient, it has poor specificity for cerebellar symptoms. In PMM2-CDG, ataxia, and, to a lesser extent, other neurological abnormalities, appear to be the main cause of the patients' daily limitations. Therefore, the ICARS seems a more precise option when addressing functional disability in PMM2-CDG. In our study there was a good correlation between ICARS and total NPCRS results. However, the NPCRS did not seem to discriminate between moderate and severe cerebellar phenotypes.

Due to the broad mutation spectrum in the Spanish population [8], and our limited sample size, our ability to reach conclusions regarding genotype-phenotype correlations is limited. However, some conclusions can be drawn by taking into account the reported functional effects of some mutations [18], and the patient's phenotype described in this work. Among our patients, p.E93A, p.C241S and p.R162W mutations that retain residual activity, combined with null missense mutations with no residual activity (p.R141H, p.R123Q or p.F157S) or splicing and nonsense mutations (c.523 + 3A > G and p.R123X) were observed with milder phenotypes. Therefore, these mutations p.E93A, p.C241S and p.R162W can be considered milder mutations. It is noteworthy that the two homozygous patients present the most severe phenotype. Regarding the mutation showed by patient 13, the p.E139K mutant protein retains 25 % of its residual activity, and the protein can be expressed at a sufficient level *in vivo* to confer residual activity compatible with life [19], being found in milder phenotypes. Concerning the mutation showed by patient 13, p. P113L mutation affects PMM2 dimerization and is present in this work in three patients associated with different phenotypes being associated with a less severe phenotype in heterozygosity [18]. Importantly, patients 12 and 13 presented a segmental maternal chromosome isodisomy [20] a genetic condition reported in chromosome 16 [21]; other sequence variants present in this homozygous region could affect the clinical features in these two patients.

An important neurological feature in PMM2-CDG is cerebellar ataxia. No clear correlation between the severity of ataxia and cerebellar imaging has been reported

previously. In our sample, an apparent relationship was observed between ICARS and the severity of cerebellar atrophy because higher ICARS scores were associated with wider inter-folia spaces and lower cerebellar volumes by visual inspection. A more objective, simple and very easy measure is the midsagittal vermis relative diameter as performed on MRI studies. A negative correlation between cerebellar measures and ICARS supports a clinical and anatomical correlation; however, this simple measure can be biased by many factors. 3D segmentation and measurement of the cerebellum has proven to be most accurate in assessing cerebellar volume as has been reported in other genetic diseases [22]. Unfortunately, in the vast majority of our recruited patients, only non-volumetric MRI scans were available. Therefore, we have been forced to use a linear measurement approach similar to the classic fetal cerebellum measurements [16, 17], in order not to repeat MRI examinations for ethical reasons (most of the patients would probably need sedation). Although this method is not as precise, it is easily reproducible and is able to show gross cerebellum size anomalies in relationship to the posterior fossa size. Furthermore, in patients with more than one MRI, a progression of the cerebellum atrophy was found (data not reported). Whether this neuroimaging progression correlates with a measurable clinical worsening and whether this progression is pointing toward a therapeutic window deserves further studies.

Regarding supratentorial abnormalities, patient 13 showed lateral ventricular enlargement. This patient underwent cardiac surgery during the newborn period and suffered a prolonged cardiorespiratory arrest during the procedure. This hypoxic-ischemic event may explain neuroimaging findings aside from the expected cerebellar atrophy.

The cerebellum, while once considered a brain region principally involved in motor control and coordination, is increasingly associated with a range of neuropsychological and neuropsychiatric presentations. In patients who suffer from different cerebellar disorders, cerebellar degeneration and focal cerebellar lesions, impairments in attention, memory, executive functions and intelligence quotient demonstrate that the cerebellum likely plays a significant role in numerous higher cognitive functions such as language, cognitive and emotional functions [23]. The analysis of all of these traits in our patients was not within the scope of our present work. However, interestingly, a negative correlation between ICARS and QI was found. Again, this is a complex issue that deserves further study.

Conclusions

In conclusion, our study demonstrates the reliability of ICARS for the assessment of cerebellar involvement in

PMM2-CDG patients, showing no significant inter-rater variability. Our results suggest a correlation between cerebellar symptoms and neuroimaging findings that needs to be further explored.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution

The work presented here was carried out in collaboration among all authors. Drafting/revising the manuscript for content, including medical writing for content: MS, VD, AM, PP, CP, JJ, BP, BPD. Analysis or interpretation of data: MS, VD, AM, PP, CP, JJ, BP, BPD. Acquisition of data: Clinical and psychological data: MS, VD, AF, AM, RV, PP, CF, MO, AG, CB, BR, FC, BPD. Biochemical, enzymatic and molecular data: MG, PB, LG, RA, CP, BP. Neuroimaging: VD, JM. Statistical analysis: DC. Study supervision or coordination: MS, JJ, BPD. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank the patients and their families for their collaboration in this study. The work was supported by national grants PI14/00021, PI11/01096, PI11/01250, and PI10/00455 from the National Plan on I+D+i, cofinanced by ISC-III (Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación Sanitaria) and FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional) and IPT-2012-0561-010000 from MINECO. Three research groups (U-746, U-737 and U703) from the Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBER-ER), Instituto de Salud Carlos III, Spain, have worked together for the present study.

Author details

¹Neuropediatric Department, Hospital Sant Joan de Déu, U-703 Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBER-ER), Instituto de Salud Carlos III, Passeig Sant Joan de Déu, 2. 08950 Esplugues, Barcelona, Spain. ²Radiology Department, Hospital Sant Joan de Déu, U-703 Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBER-ER), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain. ³Clinical Biochemistry Department, Hospital Sant Joan de Déu, U-703 Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBER-ER), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain. ⁴Statistics Department, Fundació Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain. ⁵Grup de Recerca en Neurologia Pediàtrica, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Secció de Neurologia Pediàtrica, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain. ⁶Neurology Department, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain. ⁷Neurology Department, Hospital General de Sant Boi, Parc Sanitari Sant Joan de Déu, Sant Boi, Barcelona, Spain. ⁸Neurology Department, Hospital Sant Joan d'Alacant, Alicante, Spain. ⁹Hospital Clinic-IBC, IDIBAPS, Instituto de Salud Carlos III, U-737 Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBER-ER), Barcelona, Spain. ¹⁰Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares (CEDEM), Universidad Autónoma de Madrid (UAM), U-746 Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBER-ER) Madrid, Instituto de Salud Carlos III, IdiPAZ, Madrid, Spain. ¹¹Center for Metabolic Disease, KULeuven, Leuven, Belgium.

Received: 13 June 2015 Accepted: 19 October 2015

Published online: 26 October 2015

References

- Freeze HH, Chong JX, Bamshad MJ, Ng BG. Solving glycosylation disorders: fundamental approaches reveal complicated pathways. *Am J Hum Genet.* 2014;94:161–75.
- Freeze HH, Eklund EA, Ng BG, Patterson MC. Neurology of inherited glycosylation disorders. *Lancet Neurol.* 2012;11:453–66.
- Hennet T. Diseases of glycosylation beyond classical congenital disorders of glycosylation. *Biochim Biophys Acta.* 1820;2012:1306–17.
- Freeze HH. Disorders: Biochemistry Leads the Charge Understanding Human Glycosylation. *J Biol Chem.* 2013;288:6936–45.
- Jaeken J, Vanderschueren-Lodeweyckx M, Casaer P, Smeets E, Vanacker G, Cornette C, et al. Familial psychomotor retardation with markedly fluctuating serum prolactin, FSH and GH levels, partial TBG deficiency, increased serum arylsulphatase A and increased CSF protein: a new syndrome? *Pediatr Res.* 1980;14:P179.
- Grünewald S, Matthijs G, Jaeken J. Congenital disorders of glycosylation: a review. *Pediatr Res.* 2002;52:618–24.
- Leonard J, Grünewald S, Clayton P. Diversity of congenital disorders of glycosylation. *Lancet.* 2001;357:1382–3.
- Pérez-Duenas B, García-Cazorla A, Pineda M, Poo P, Campistol J, Cusi V, et al. Long-term evolution of eight Spanish patients with CDG type Ia: typical and atypical manifestations. *Eur J Paediatr Neurol.* 2009;13:444–51.
- Antoun H, Villeneuve N, Gelot A, Panisset S, Adamsbaum C. Cerebellar atrophy: an important feature of carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type 1. *Pediatr Radiol.* 1999;29:194–8.
- Aronica E, van Kempen AA, van der Heide M, Poll-The BT, van Slooten HJ, Troost D, et al. Congenital disorder of glycosylation type Ia: a clinicopathological report of a newborn infant with cerebellar pathology. *Acta Neuropathol.* 2005;109:433–42.
- Achouitar S, Mohamed M, Gardeitchik T, Wortmann SB, Sykut-Cegielska J, Ensenauer R, et al. Nijmegen paediatric CDG rating scale: a novel tool to assess disease progression. *J Inher Metab Dis.* 2011;34:923–7.
- Trouillas P, Takayanagi T, Hallett M, Currier RD, Subramony SH, Wessel K, et al. International Cooperative Ataxia Rating Scale for pharmacological assessment of the cerebellar syndrome. The Ataxia Neuropharmacology Committee of the World Federation of Neurology. *J Neurol Sci.* 1997;145:205–11.
- Brandsma R, Spits AH, Kuiper MJ, Luning RJ, Burger H, Kremer HP, et al. Ataxia rating scales are age-dependent in healthy children. *Dev Med Child Neurol.* 2014;56:556–63.
- Sival DA, Pouwels ME, Van Brederode A, Maurits NM, Verschuuren-Bemelmans CC, Brunt ER, et al. In children with Friedreich ataxia, muscle and ataxia parameters are associated. *Dev Med Child Neurol.* 2011;53:529–34.
- Pineda M, Montero R, Araçil A, O'Callaghan MM, Mas A, Espinos C, et al. Coenzyme Q(10)-responsive ataxia: 2-year-treatment follow-up. *Mov Disord.* 2010;25:1262–8.
- Imamoglu EY, Gursoy T, Ovali F, Hayran M, Karatekin G. Nomograms of cerebellar vermis height and transverse cerebellar diameter in appropriate-for-gestational-age neonates. *Early Hum Dev.* 2013;89:919–23.
- Zhao D, Liu W, Cai A, Li J, Chen L, Wang B. Quantitative evaluation of the fetal cerebellar vermis using the median view on three-dimensional ultrasound. *Prenat Diagn.* 2013;33:153–7.
- Vega AI, Pérez-Cerdá C, Abia D, Gámez A, Briones P, Artuch R, et al. Expression analysis revealing destabilizing mutations in phosphomannomutase 2 deficiency (PMM2-CDG): expression analysis of PMM2-CDG mutations. *J Inher Metab Dis.* 2011;34:929–39.
- Vuillaumier-Barrot S, Barnier A, Cuer M, Durand G, Grandchamp B, Seta N. Characterization of the 415G>A (E139K) PMM2 mutation in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type Ia disrupting a splicing enhancer resulting in exon 5 skipping. *Hum Mutat.* 1999;14:543–4.
- Pérez B, Nevado J, Lapunzina P, Gallego L, Pérez-Cerdá C, Merinero B, et al. Segmental uniparental disomy leading to homozygosity for a pathogenic mutation in three recessive metabolic diseases. *Mol Genet Metab.* 2012;105:270–1.
- Yong PJ, Marion SA, Barrett IJ, Kalousek DK, Robinson WP. Evidence for imprinting on chromosome 16: the effect of uniparental disomy on the outcome of mosaic trisomy 16 pregnancies. *Am J Med Genet.* 2002;112:123–32.
- Lukas C, Bellenberg B, Köster O, Greschner S, Hahn HK. A new sulcus-corrected approach for assessing cerebellar volume in spinocerebellar ataxia. *Psychiatry Res.* 2011;193:123–30.
- Tedesco AM, Chiricozzi FR, Clausi S, Lupo M, Molinari M, Leggio MG. The cerebellar cognitive profile. *Brain.* 2011;134:3672–86.

Síntesis de los resultados

- La escala ICARS demostró ser un instrumento fiable para cuantificar la gravedad clínica de la ataxia en niños con PMM2-CDG, apreciándose una diferencia significativa entre los valores obtenidos en pacientes y en controles emparejados por edad, una excelente validez interobservador y una buena consistencia interna.
- En cuanto a las subescalas del ICARS, también se observó una diferencia significativa entre casos y controles, una excelente validez interobservador, y una buena consistencia interna global. Al analizar la consistencia interna por áreas individuales, ésta fue excelente entre las puntuaciones de postura y marcha, funciones cinéticas y disartria; pero pobre para la subescala oculomotora.
- La escala ICARS se correlacionó positivamente con el grado de afectación multisistémica (NPCRS) en niños con PMM2-CDG. Aunque constituyen el principal marcador de funcionalidad, se observó que el grado de ataxia y síndrome cerebeloso tuvieron un impacto relativamente bajo en la escala NPCRS, considerada de referencia para clasificar la gravedad de estos pacientes.
- La correlación entre el grado de ataxia según la escala ICARS, y el nivel de atrofia cerebelosa cuantificado con el MVRD, fue significativa.
- Se apreciaron, además, correlaciones significativas entre la escala ICARS y la capacidad intelectual, entre el MVRD y la capacidad intelectual, y entre el NPCRS y la capacidad intelectual.
- En referencia a los aspectos genéticos, se describió una mutación no identificada previamente (c.523+3A>G). Por otro lado, los pacientes portadores de las mutaciones p.E93A, p.C241S o p.R162W presentaron fenotipos más leves con menor puntuación en la escala ICARS, mientras que los pacientes con las mutaciones p.P113L y p.E139K mostraron puntuaciones más altas en ICARS, mayor gravedad y mayor atrofia cerebelosa.

2.2 Evolución neurorradiológica de la atrofia cerebelosa en la PMM2-CDG cuantificada mediante medidas bidimensionales (MVRD) y volumetría.

“Longitudinal volumetric and 2D assessment of cerebellar atrophy in a large cohort of children with phosphomannomutase deficiency (PMM2-CDG)”

Víctor de Diego, Antonio F. Martínez-Monseny, Jordi Muchart, Daniel Cuadras, Raquel Montero, Rafael Artuch, Celia Pérez-Cerdá, Belén Pérez, Belén Pérez-Dueñas, Andrea Poretti, Mercedes Serrano, Colaboradores del Consorcio Español en CDG.

Journal of Inherited Metabolic Disease 2017; 40 (5): 709–713.

La ataxia cerebelosa es el síntoma dominante y el principal causante de discapacidad en pacientes con PMM2-CDG. Esta ataxia tiene su origen en una atrofia del cerebelo determinada por lesión neuronal, afectando especialmente a las células de Purkinje y granulosas del córtex cerebeloso.

La atrofia del cerebelo se diagnostica habitualmente por descripción radiológica. Varios estudios cualitativos y transversales en RMN de pacientes han mostrado este hallazgo, junto con hiperintensidades en el córtex cerebeloso en secuencias T2. Por otro lado, se sospecha que los pacientes con PMM2-CDG experimentan una progresión de la mencionada atrofia, pero no existen estudios longitudinales que confirmen esta observación.

Además de los estudios anatomopatológicos, la volumetría del cerebelo a partir de imágenes de RM cerebral, es el método cuantitativo de elección para medir con precisión el volumen del cerebelo, y una herramienta valiosa en pacientes con atrofia cerebelosa. Adicionalmente, estas técnicas volumétricas son especialmente útiles para realizar correlaciones con el fenotipo clínico. Hasta el momento, el análisis volumétrico únicamente se ha utilizado para asociar el grado de atrofia con la severidad clínica de la ataxia en algunas patologías, como la ataxia espinocerebelosa (SCA).

Según nuestro conocimiento, este es el primer estudio en el que se demuestra la atrofia cerebelosa en pacientes PMM2-CDG mediante medidas cuantitativas bidimensionales y volumétricas. Además, se trata de la primera investigación en evidenciar la progresión de dicha atrofia y establecer su ritmo de evolución en función de la edad de los pacientes.



Longitudinal volumetric and 2D assessment of cerebellar atrophy in a large cohort of children with phosphomannomutase deficiency (PMM2-CDG)

Víctor de Diego^{1,2} · Antonio F. Martínez-Monseny³ · Jordi Muchart^{1,2} · Daniel Cuadras⁴ · Raquel Montero^{1,2} · Rafael Artuch^{1,2} · Celia Pérez-Cerdá⁵ · Belén Pérez⁵ · Belén Pérez-Dueñas^{1,2} · Andrea Poretti⁶ · Mercedes Serrano^{1,2,3,7}

Received: 23 October 2016 / Accepted: 19 February 2017
© SSIEM 2017

Abstract

Objective We aim to delineate the progression of cerebellar atrophy (the primary neuroimaging finding) in children with phosphomannomutase-deficiency (PMM2-CDG) by analyzing longitudinal MRI studies and performing cerebellar volumetric analysis and a 2D cerebellar measurement.

Methods Statistical analysis was used to compare MRI measurements [midsagittal vermis relative diameter (MVRD) and volume] of children with PMM2-CDG and sex- and age-

matched controls, and to determine the rate of progression of cerebellar atrophy at different ages.

Results Fifty MRI studies of 33 PMM2-CDG patients were used for 2D evaluation, and 19 MRI studies were available for volumetric analysis. Results from a linear regression model showed that patients have a significantly lower MVRD and cerebellar volume compared to controls ($p < 0.001$ and $p < 0.001$ respectively). There was a significant negative correlation between age and MVRD for patients ($p = 0.014$). The rate of cerebellar atrophy measured by the loss of MVRD and cerebellar volume per year was higher at early ages ($r = -0.578$, $p = 0.012$ and $r = -0.323$, $p = 0.48$ respectively), particularly in patients under 11 years ($p = 0.004$). There was a significant positive correlation between MVRD and cerebellar volume in PMM2-CDG patients ($r = 0.669$, $p = 0.001$).

Conclusions Our study quantifies a progression of cerebellar atrophy in PMM2-CDG patients, particularly during the first decade of life, and suggests a simple and reliable measure, the MVRD, to monitor cerebellar atrophy. Quantitative measurement of MVRD and cerebellar volume are essential for correlation with phenotype and outcome, natural follow-up, and monitoring in view of potential therapies in children with PMM2-CDG.

Communicated by: Jaak Jaeken

✉ Mercedes Serrano
mserrano@hsjdbcn.org

¹ Neuropediatric, Radiology and Clinical Biochemistry Departments, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

² U-703 Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBER-ER), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain

³ Genetic Medicine and Rare Diseases' Pediatric Institute, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

⁴ Statistics Department, Fundació Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

⁵ Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares (CEDEM), Universidad Autónoma de Madrid (UAM), U-746 Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBER-ER) Madrid, Instituto de Salud Carlos III, IdiPAZ, Madrid, Spain

⁶ Section of Pediatric Neuroradiology, Division of Pediatric Radiology, Russell H Morgan Department of Radiology and Radiological Science, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MA, USA

⁷ Neurology Department & Genetic Medicine, Hospital Sant Joan de Déu, and U-703 Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBER-ER), Instituto de Salud Carlos III, Passeig Sant Joan de Déu, 2, 08950 Esplugues, Barcelona, Spain

Phosphomannomutase deficiency (PMM2-CDG), caused by mutations in PMM2 (OMIM: 601785), is the most frequent congenital disorder of N-linked glycosylation (Freeze et al 2014, Freeze et al 2012). Patients with PMM2-CDG develop a cerebellar syndrome with axial and limb ataxia, abnormal eye movements, dysarthria, and cognitive impairment, causing long-term disability (Pérez-Dueñas et al 2009). Neuroimaging and neuropathology studies showed a selective

involvement of the cerebellum in PMM2-CDG (Feraco et al 2012, Antoun et al 1999, Aronica et al 2005).

Qualitative, cross-sectional MRI studies revealed cerebellar atrophy and T2-hyperintense signal of the cerebellar cortex that are probably due to neuronal loss and secondary gliosis. In PMM2-CDG, the neuroimaging literature is mostly based on qualitative studies to assist the diagnosis. Cerebellar atrophy is suspected to progress (Barone et al 2015), but no longitudinal MRI studies have previously quantified the rate of progression of cerebellar atrophy during the evolution of the disease. Only a study from our group correlated qualitative neuroimaging evaluation and disease severity (Serrano et al 2015). Although there is no reference validated method to measure cerebellar volume, due to its complex shape and folding, in other genetic cerebellar diseases, quantitative evaluation of MRI studies has been increasingly applied and may detect mild abnormalities that remained undetected by qualitative image evaluation alone. In addition, quantitative volumetric measurements are ideal for correlation with the phenotype. In a few types of spinocerebellar ataxia (SCA), the results of volumetric analysis have been shown to correlate with the severity of the disease as measured by ICARS (Klockgether et al 1998, Lukas et al 2011, Eichler et al 2011).

In this study, we evaluated the progression of cerebellar atrophy in children with PMM2-CDG using midsagittal vermian relative diameter (MVRD) and volumetric analysis.

Methods

Ethical permission for the study was obtained from the Research & Ethics Committee of the Sant Joan de Déu Hospital (SJDH). Parents gave their written informed consent. Samples and data were obtained in accordance with the Helsinki Declaration of 1964, as revised in October 2013 (Fortaleza, Brazil).

Children with a genetically confirmed diagnosis of PMM2-CDG and brain MRI studies without artifacts were included. Neurological complications, such as ischemic or hemorrhagic stroke, were exclusion criteria. Basic demographic data including age and gender were collected. Age- and sex-matched controls were selected from the SJDH neuroimaging database. All the control MRIs were performed in the SJDH following the same protocol. Control patients underwent MRI studies due to headache ($n=28$), mild focal epilepsy ($N=7$), minor head trauma ($n=12$), patient at risk for familial antecedents of aneurisms ($n=2$), tic disorder ($n=1$). A child neuroradiologist ruled out morphologic abnormalities, and MRIs were interpreted as normal. Clinical records have been reviewed (from hospitals and ambulatory centers)

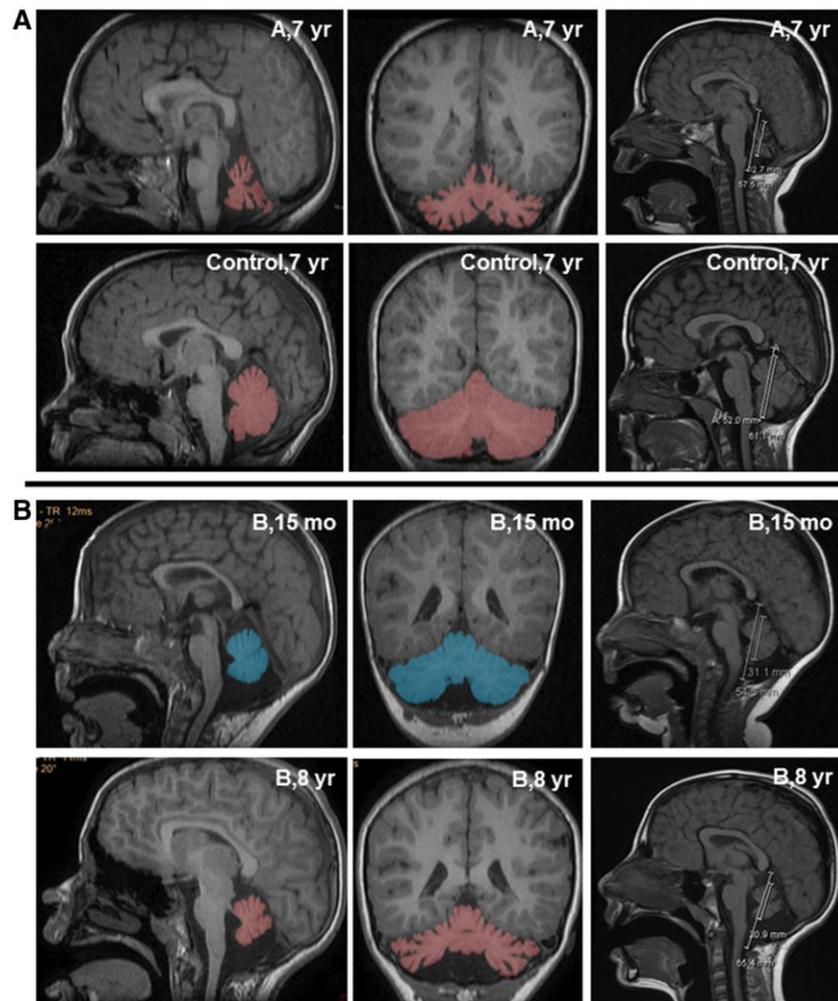
12 months after the MRI acquisition, and patients remained free of cerebellar symptoms. For volumetric comparisons, in order to reduce biases, two controls for every patient were included in the analysis.

MRI obtained at the SJDH were performed on a 1.5T MR scanner scan (Signa Excite, GE, Milwaukee, WI, USA) and included a sagittal or 3D-T1-weighted, axial T2-weighted and FLAIR, and diffusion weighted images. Regarding brain MRI studies performed in other institutions (15 different institutions from Spain) we accepted all the studies including at least T1-weighted, T2-weighted, FLAIR, and diffusion weighted images in the axial, sagittal, and coronal planes. Regarding volumetric studies, all were performed in Sant Joan de Déu Hospital, with the only exception of two MRIs from the same patient. For this analysis a volumetric 3D T1 sequence was required (3D IR FSPGR in our MR scanner, 1.5T Signa HDxt General Electric). For the 2D evaluation of the vermian size, we used the MVRD. The MVRD is typically used to assess the size of the vermis in fetuses and has been successfully applied in children with PMM2-CDG by our group (Fig. 1) (Serrano et al 2015). To quantify the progression of cerebellar atrophy, we used the following formula: $(\text{MVRD of the first MRI} - \text{MVRD of the follow-up MRI}) / \text{time interval between both MRI studies (years)}$. A positive result represents a decrease in cerebellar size. Due to the differences in the follow-up protocols among different hospitals the possibility of having two MRIs was arbitrary and did not correlate with clinical severity of the patient.

For volumetric analysis, 3D-T1-weighted images were transferred to the Philips IntelliSpace Portal 4.0 software [<http://www.mea.philips.com/healthcare/product/HCNOCN281/intellispaceportal-7>] and automatically reconstructed in three planes. A pediatric neurologist with experience in imaging post-processing manually delineated the cerebellar contours excluding the cerebellar peduncles, fourth ventricles, and interfolial spaces on contiguous sagittal images, reviewed the accuracy of the delineation on the other planes, and calculated the cerebellar volume in cm^3 (Fig. 1).

Statistical analysis was performed using SPSS V.22.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Armonk, NY: IBM Corp.). Pearson's correlation coefficient was calculated to explore the relationship between MVRD and cerebellar volume. To evaluate the evolution of both the MVRD and the cerebellar volume depending on age at MRI, Pearson's correlation coefficient and linear regression models with age, group (patients and control subjects) and their interaction as independent variables were used. For MVRD and cerebellar volume measurement, each MRI was paired with one (MVRD) or two (cerebellar volume) MRIs of sex- and age-matched controls. P values < 0.05 were considered significant.

Fig. 1 Images from volumetric and MVRD evaluations. **a** Volumetric evaluation (*left*) and MVRD (*right*) of a 7-year-old PMM2-CDG patient (*above, A*) compared with images of a 7-year control (*below, control*). Patient B is a boy with genotype c.484C>T/c.523+3A>G. The cerebellar volume of the patient was 40.4 cm³, MVRD was: 0.57, and the ICARS score 23/100. The cerebellar volume of the 7-years control was 119.0 cm³ and the MVRD was 0.85. **b** Volumetric evaluation (*left*) and MVRD (*right*) at different ages of a PMM2-CDG patient (**B**), at the ages of 15 months (*above*) and 8 years (*below*). At 15 months, the cerebellar volume was 62.2 cm³ compared to a 15-months control volume of 101.7 cm³, and the MVRD was 0.57, compared to a 15-months-control MVRD of 0.77. At 8 years of age the cerebellar volume was 55.1 cm³ compared to an 8-year control volume of 132.7 cm³, and the MVRD was 0.47, compared to an 8-year control MVRD of 0.88. At 8 years of age, the ICARS score was 16/100. Patient A is a girl with genotype c.470T>C/c.722G>C



Results

Fifty MRI studies of 33 children with PMM2-CDG were used to measure MVRD.

For 13 patients, more than one MRI study (see distribution in Fig. 2e) was available. Fifty MRI studies of 50 controls were used for comparison. Nineteen 3D-T1-weighted MRI data of 12 PMM2-CDG patients (for six patients, more than one set of 3D-T1-weighted MRI data was available) were available for volumetric analysis. Thirty-eight 3D-T1-weighted MRI data of 38 controls were used for comparison.

The linear regression model showed a significantly lower MVRD in patients compared to controls ($p < 0.001$). There was a significant negative correlation with age ($p = 0.014$), that is, patients had a decrease in their MVRD over time, in contrast to controls (Fig. 2a).

The cerebellar volume was significantly lower in patients compared to controls ($p < 0.001$). For both patients and controls, a positive correlation was found between cerebellar volume and age at MRI, but the correlation was significantly weaker for patients compared to controls ($p = 0.02$) (Fig. 2b). If the patient with the mildest phenotype is excluded as an outlier, the correlation was negative ($r = -0.368$, $p = 0.133$) (Fig. 2c).

In patients, we found a significant positive correlation between MVRD and cerebellar volume ($r = 0.669$, $p = 0.001$) (Fig. 2d).

In all patients with more than one MRI study, MVRD and cerebellar volume decreased over time (Fig. 2e and f). The decrease rate in MVRD and cerebellar volume calculated by the percentage loss per year of MVRD (green dots) and cerebellar volume (red dots) per year showed a significantly

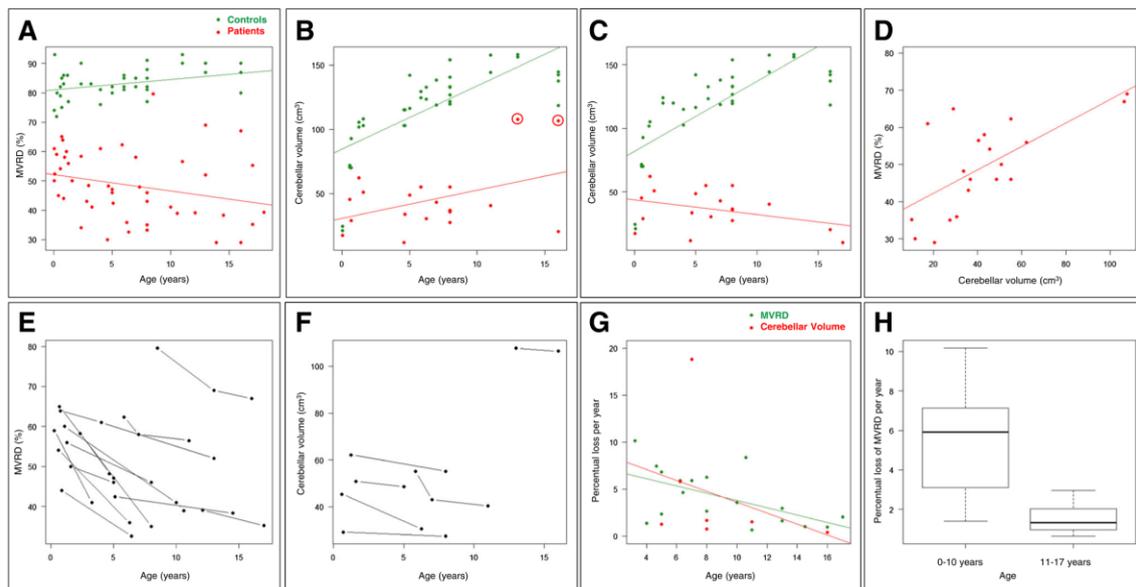


Fig. 2 Graphical representation of volumetric and 2D results. **a** Linear regression model: patients have significantly lower MVRD compared to controls ($p < 0.001$). There is a significant negative correlation between age and patients ($p = 0.014$). **b** Patients have lower cerebellar volume compared to controls ($p < 0.001$). As a group, there is an increase in cerebellar volume with age for both patients and controls, but the increase in cerebellar volume is significantly lower for patients compared to controls ($p = 0.02$). Encircled dots belong to the same patient at 13 and 16 years of age, with a very mild clinical phenotype. **c** Linear regression model excluding the outlier data encircled in the previous figure. Cerebellar volume tend to decrease with age ($p = 0.133$). **d** There is a significant positive correlation between cerebellar

volume and MVRD ($r = 0.669$, $p = 0.001$) in PMM2-CDG patients. **e** Decrease of MVRD over time. The points connected by lines show MVRD measurements of the same patient. For eight and five patients, two and three MRI studies per patient, respectively, were available at different ages (31 MRI studies). **f** Decrease of cerebellar volume over time. The points connected by lines show cerebellar volume measurements of the same patient. **g** Graphical representation of the rate of cerebellar atrophy by percentage loss of MVRD (green dots) ($r = -0.578$, $p = 0.012$) and cerebellar volume (red dots) ($r = -0.323$, $p = 0.48$) per year for those patients having more than one MRI. **h** Loss of MVRD is significantly higher before 11 years of age (medium loss per year 5.46%), than after 11 years of age (media loss per year 1.54%) ($p = 0.004$)

negative correlation with the age of the patients ($r = -0.578$, $p = 0.012$, and $r = -0.323$, $p = 0.48$, respectively), as shown in Fig. 2g. Patients younger than 11 years of age showed a more severe percentage decrease in MVRD per year compared to patients older than 11 years ($p = 0.004$) (Fig. 2h).

Discussion

Our study confirmed cerebellar atrophy in patients with PMM2-CDG compared to controls using two quantitative measurements and showed that cerebellar atrophy is progressive over time. The good correlation between MVRD, a measurement of the vermis alone, and global cerebellar volume suggests that atrophy similarly affects the vermis and cerebellar hemispheres in PMM2-CDG.

To our knowledge, this is the first study that applies volumetric analysis to quantify cerebellar atrophy in children with PMM2-CDG. In general terms, volumetric analysis is the gold standard for volume measurement. Although there is no

reference validated method to measure cerebellar volume, due to its complex shape and folding, volumetric analysis have been useful in longitudinal studies, for instance in spinocerebellar atrophy (Lukas et al 2011, Eichler et al 2011). Volumetric analysis, however, requires the availability of 3D-MRI data and a specific software and training, and is rather time consuming. 2D analysis with MVRD measurement is easier, faster, and does not require 3D-MRI data. Our results show a decrease of both MVRD and cerebellar volume with age, and demonstrate a good correlation between cerebellar volume and MVRD suggesting that MVRD is a reliable measurement to assess the size of the cerebellum in children with PMM2-CDG and may be used in clinical routine.

There was a limitation regarding data acquisition: different protocols used in the different hospitals could lead to differences in results. However, this is a bias that clinicians also find in their daily practice. This reinforces the idea of the need of a simple measure as the MVRD, which may help to simplify the neuroimaging follow-up, at least for clinical reasons.

Our study quantifies a progression of cerebellar atrophy in PMM2-CDG patients, and shows that in children with PMM2-CDG, cerebellar atrophy progresses mainly in the first decade of life identifying a point of inflexion around the age of 11 years.

In conclusion, our study shows the feasibility of longitudinal, quantitative measurement of MVRD and cerebellar volume in children with PMM2-CDG, and quantifies the degree and progression of cerebellar atrophy in a large cohort of children with this rare disease. Quantitative measurement of MVRD and cerebellar volume are essential for correlation with phenotype and outcome, natural follow-up, and monitoring in view of potential therapies in children with PMM2-CDG.

Acknowledgments We thank the patients and their families for their kind collaboration in all our projects, and particularly in this study.

We are grateful to the doctors and institutions from the Spanish national network for the study of glycosylation disorders for their collaboration. This work was supported by national grant PI14/00021 from the National Plan on I+D+I, cofinanced by ISC-III (Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación Sanitaria) and FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional) and IPT-2012- 0561-010000 from MINECO.

Compliance with ethical standards

Details of funding The authors report no disclosure relevant to the manuscript. We did not have any sponsor in any phase of the study.

Conflict of interest None.

References

- Antoun H, Villeneuve N, Gelot A, Panisset S, Adamsbaum C (1999) Cerebellar atrophy: an important feature of carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type 1. *Pediatr Radiol* 29:194–198
- Aronica E, van Kempen AA, van der Heide M et al (2005) Congenital disorder of glycosylation type Ia: a clinicopathological report of a newborn infant with cerebellar pathology. *Acta Neuropathol* 109: 433–442
- Barone R, Carrozzi M, Parini R et al (2015) A nationwide survey of PMM2-CDG in Italy: high frequency of a mild neurological variant associated with the L32R mutation. *J Neurol* 262:154–164
- Eichler L, Bellenberg B, Hahn HK, Köster O, Schöls L, Lukas C (2011) Quantitative assessment of brain stem and cerebellar atrophy in spinocerebellar ataxia types 3 and 6: impact on clinical status. *AJNR Am J Neuroradiol* 32:890–897
- Feraco P, Mirabelli-Badenier M, Severino M et al (2012) The shrunken, bright cerebellum: a characteristic MRI finding in congenital disorders of glycosylation type Ia. *AJNR Am J Neuroradiol* 33:2062–2067
- Freeze HH, Eklund EA, Ng BG, Patterson MC (2012) Neurology of inherited glycosylation disorders. *Lancet Neurol* 11:453–466
- Freeze HH, Chong JX, Bamshad MJ, Ng BG (2014) Solving glycosylation disorders: fundamental approaches reveal complicated pathways. *Am J Hum Genet* 94:161–175
- Klockgether T, Skalej M, Wedekind D et al (1998) Autosomal dominant cerebellar ataxia type I. MRI-based volumetry of posterior fossa structures and basal ganglia in spinocerebellar ataxia types 1, 2 and 3. *Brain* 121:1687–1693
- Lukas C, Bellenberg B, Köster O, Greschner S, Hahn HK (2011) A new sulcus-corrected approach for assessing cerebellar volume in spinocerebellar ataxia. *Psychiatry Res* 193:123–130
- Pérez-Dueñas B, García-Cazorla A, Pineda M et al (2009) Long-term evolution of eight Spanish patients with CDG type Ia: typical and atypical manifestations. *Eur J Paediatr Neurol* 13:444–451
- Serrano M, de Diego V, Muchart J et al (2015) Phosphomannomutase deficiency (PMM2-CDG): ataxia and cerebellar assessment. *Orphanet J Rare Dis* 10:138

Collaborators of the CDG Spanish-Consortium

Sergio Aguilera-Albesa, MD PhD,¹ Ramón Cancho Candela, MD PhD,² M^a Llanos Carrasco Marina, MD,³ Francisco Carratalá, MD PhD,⁴ M^a Luz Couce, MD PhD,⁵ Ana Felipe, MD,⁶ Óscar García, MD,⁷ M^a Teresa García-Silva, MD PhD,⁸ Luis G Gutiérrez-Solana, MD PhD,⁹ Alfons Macaya, MD PhD,⁶ M^a Concepción Miranda, MD PhD,¹⁰ Laura López, MD,⁹ Eduardo López-Laso, MD PhD,¹¹ M Pilar Póo, MD PhD,¹² Pilar Quijada-Fraile, MD PhD,⁸ Bernabé Robles, MD, PhD,¹³ Concepción Sierra-Córcoles, MD,¹⁴ Ramón Velázquez-Fragua, MD,¹⁵

1. Pediatric Neurology Unit, Department of Pediatrics, Navarra Hospital, Pamplona, Spain

2. Pediatric Neurology Unit. Pediatrics Department. Hospital Universitario Río Hortega. Valladolid, Spain.

3. Neuropediatric Department, Pediatric Service, Hospital Universitario Severo Ochoa. Leganés, Madrid, Spain.

4. Pediatric Neurology Department, University Hospital Sant Joan d'Alacant, Spain.

5. Unit of Diagnosis and Treatment of Congenital Metabolic Diseases. Department of Pediatrics. Hospital Clínico Universitario de Santiago. CIBERER. Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), Santiago de Compostela, Spain.

6. Grup de Recerca en Neurologia Pediàtrica, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Secció de Neurologia Pediàtrica, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.

7. Pediatric Department, Hospital Virgen de la Salud, Toledo, Spain.

8. Unidad de Enfermedades Mitocondriales-Enfermedades Metabólicas Hereditarias. Dpto. de Pediatría, Instituto de Investigación i+12, Hospital Universitario 12 de Octubre- CIBERER-ISCI, Universidad Complutense de Madrid, Spain.

9. Unit of Child Neurology, Department of Pediatrics, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús de Madrid, Madrid, Spain

10. Pediatric Neurology Unit, H.G.U Gregorio Marañón, Madrid, Spain

11. Maimonides Biomedical Research Institute of Cordoba (IMIBIC), Pediatric Neurology Unit, Reina Sofia University Hospital, CIBERER, Córdoba, Spain.

12. Neuropediatric, Radiology and Clinical Biochemistry Departments, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain. U-703 Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBER-ER), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain.

13. Neurology Department, Hospital General de Sant Boi, Parc Sanitari Sant Joan de Déu, Sant Boi, Barcelona, Spain.

14. Unidad de Neuropediatría, Hospital de Jaén, Jaén, Spain.

15. Pediatric Neurology Department, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain.

Síntesis de los resultados

- El marcador radiológico bidimensional de atrofia cerebelosa, el diámetro relativo medio-sagital del vermis (MVRD), fue significativamente menor en pacientes con PMM2-CDG que en controles emparejados por edad y género. Se observó que los pacientes de mayor edad presentaron unos valores de MVRD menores, a diferencia de los controles que mantuvieron un MVRD estable con el tiempo.
- El volumen cerebeloso, medido en RMN cerebral en secuencias 3D-T1, fue significativamente menor en pacientes comparado con controles. Se observó un incremento del volumen cerebeloso con la edad en controles. Por el contrario, con una única excepción, se observó un descenso del volumen cerebeloso con la edad en pacientes.
- Se apreció una correlación positiva y estadísticamente significativa entre el diámetro relativo medio-sagital del vermis (MVRD) y el volumen cerebeloso, como prueba de validez de dicho indicador bidimensional.
- Dado que para un subgrupo de pacientes dispusimos de RM cerebrales seriadas (pacientes con más de 1 RM cerebral realizada a diferente edad), fue posible realizar un análisis longitudinal de la evolución de la atrofia cerebelosa con las herramientas cuantitativas descritas. Este análisis mostró:
 - Un descenso del MVRD a lo largo del tiempo, es decir, todos los pacientes analizados mostraron un MVRD menor al repetir la RM cerebral a una edad superior. El ritmo de descenso del MRVD calculado mediante el porcentaje de MVRD perdido por año, se correlacionó negativamente con la edad de los pacientes.
 - Una disminución del volumen cerebeloso a lo largo del tiempo, es decir, al repetir la RMc a una edad más avanzada, todos los pacientes exhibieron un volumen cerebeloso menor. El ritmo de descenso del volumen cerebeloso, calculado mediante el porcentaje de volumen cerebeloso perdido por año, se correlacionó negativamente con la edad de los pacientes.
 - Los niños con PMM2-CDG menores de 11 años, mostraron una progresión significativamente más rápida de la atrofia cerebelosa medida mediante el MVRD, con respecto a los pacientes con 11 años o más.

2.3 Evolución del síndrome cerebeloso en niños con PMM2-CDG.

“A quantitative assessment of the evolution of cerebellar syndrome in children with phosphomannanmutase-deficiency (PMM2-CDG)”

Natalia Lourdes Serrano, Víctor De Diego, Daniel Cuadras, Antonio F. Martínez-Monseny, Ramón Velázquez-Fragua, Laura López, Ana Felipe, Luis G. Gutiérrez-Solana, Alfons Macaya, Belén Pérez-Dueñas, Mercedes Serrano, y el Consorcio Español en CDG.

Orphanet Journal of Rare Diseases 2017; 12: 155.

En la PMM2-CDG las imágenes de RM cerebral y los estudios neuropatológicos muestran una afectación predominante del cerebelo. Esta atrofia cerebelosa se inicia a edades muy tempranas y evoluciona al menos durante la primera década de la vida.

Sin embargo, no disponemos de información cuantitativa sobre la progresión del síndrome cerebeloso, el cual constituye el principal síntoma y motivo de discapacidad en los pacientes, y cuyo curso no necesariamente debe ser paralelo o proporcional al de la lesión radiológica.

El tratamiento de la PMM2-CDG se limita en la actualidad a terapias sintomáticas (rehabilitación, fisioterapia, logopedia, tratamiento de trombosis o hemorragias, fármacos antiepilépticos, nutrición por sonda o gastrostomía, antiácidos, levotiroxina, estrógenos, cirugía ortopédica, etc.), las cuales tienen un impacto limitado en la progresión de sus manifestaciones clínicas. Sin embargo, en los últimos años se ha acelerado la investigación sobre tratamientos modificadores de la evolución natural de la enfermedad, con avances prometedores en el campo de las chaperonas farmacológicas, las terapias de suplementación nutricional y los tratamientos genéticos. Por ello, resulta de crucial importancia conocer de la forma más precisa posible la historia natural de esta patología, antes de poder medir el efecto de un tratamiento experimental. Esto constituye un reto en enfermedades minoritarias, en las que el menor número de pacientes, su dispersión geográfica y su heterogeneidad, dificultan la investigación.

En este artículo, se describe por primera vez de forma cuantitativa la evolución de la ataxia cerebelosa en pacientes con PMM2-CDG. Además, se estudia la relación entre el volumen cerebeloso y el grado de ataxia en un subgrupo de niños afectados.

Serrano et al. *Orphanet Journal of Rare Diseases* (2017) 12:155
 DOI 10.1186/s13023-017-0707-0

Orphanet Journal of
 Rare Diseases

RESEARCH

Open Access



A quantitative assessment of the evolution of cerebellar syndrome in children with phosphomannomutase-deficiency (PMM2-CDG)

Natalia Lourdes Serrano^{1,2,3}, Victor De Diego^{1,2}, Daniel Cuadras⁴, Antonio F. Martínez Monseny⁵, Ramón Velázquez-Fragua⁶, Laura López⁷, Ana Felipe⁸, Luis G. Gutiérrez-Solana⁷, Alfons Macaya⁸, Belén Pérez-Dueñas^{1,2}, Mercedes Serrano^{1,2,5,9*} and CDG Spanish-Consortium

Abstract

Background: We aim to delineate the progression of cerebellar syndrome in children with phosphomannomutase-deficiency (PMM2-CDG) using the International Cooperative Ataxia Rating Scale (ICARS). We sought correlation between cerebellar volumetry and clinical situation. We prospectively evaluated PMM2-CDG patients aged from 5 to 18 years through ICARS at two different time points set apart by at least 20 months. We reviewed available MRIs and performed volumetric analysis when it was possible.

Results: From the eligible 24, four patients were excluded due to severe mental disability ($n = 2$) and supratentorial lesions ($n = 2$). Two different ICARS evaluations separated by more than 20 months were available for 14 patients showing an improvement in the cerebellar syndrome: ICARS1: 35.71 versus ICARS2: 30.07 ($p < 0.001$). When we considered time, we saw an improvement of 2.64 points in the ICARS per year with an SD of 1.97 points ($p < 0.001$). The ICARS subscales results improved with time, reaching statistical significance in "Posture and gait" ($p < 0.001$), "Kinetic functions" ($p = 0.04$) and "Speech abnormalities" ($p = 0.045$). We found a negative correlation between the ICARS results and total cerebellar volume ($r = -0.9$, $p = 0.037$) in a group of five patients with available volumetric study, meaning that the higher the ICARS score, the more severe was the cerebellar atrophy.

Conclusions: Our study shows a stabilization or mild improvement in the cerebellar functions of paediatric PMM2-CDG patients despite cerebellar volume loss. ICARS is a valid scale to quantify the evolution of cerebellar syndrome in PMM2-CDG patients. The availability of ICARS and other reliable and sensitive follow-up tools may prove essential for the evaluation of potential therapies.

Keywords: Cerebellum, Congenital disorders of glycosylation, Developmental disorders, Gait disorders/ataxia, ICARS, MRI

Background

Phosphomannomutase deficiency (PMM2-CDG), is caused by mutations in *PMM2* (MIM *#601,785), and is the most frequent congenital disorder of N-linked glycosylation [1]. Patients with PMM2-CDG develop a cerebellar syndrome with axial and peripheral ataxia,

abnormal eye movements, dysarthria, and cognitive deficits which cause long-term disability [2].

Brain MRIs and neuropathological studies show a selective involvement of the cerebellum. The increase in inter-folia spaces and the cortical brightness observed on MRIs are probably the consequence of the neuronal loss and secondary gliosis observed in pathological studies [3–5]. The atrophy is progressive and greater during the first decade of life and is present in the majority of patients, even in those clinically less affected [6, 7]. However, clinicians normally find stabilization or even

* Correspondence: mserrano@hsjdbcn.org

¹Neuropediatric, Radiology and Clinical Biochemistry Departments, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

²U-703 Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBER-ER), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

an amelioration of cerebellar symptoms through the first and second decade of life (personal observation). Recently, the International Cooperative Ataxia Rating Scale (ICARS) has been validated for children suffering from PMM2-CDG [8]. However, no follow-up studies have been published quantifying the evolution of cerebellar syndrome using a clinical scale.

In our study, we aimed to quantify the evolution of cerebellar syndrome in PMM2-CDG patients across the paediatric age span using ICARS. We also analysed cerebellar volume on neuroimaging studies to find a relationship between the severity of the cerebellar syndrome and the cerebellar volumetric evaluation.

Methods

Our study was designed as a prospective and observational study including Spanish patients that were diagnosed with PMM2-CDG and followed in tertiary care hospitals included in the Spanish CDG Network. Patients were recruited and followed from March 2014 to December 2016. The patient's cerebellar syndrome was evaluated using ICARS at two different times of evolution with a minimum interval of 20 months in between evaluations.

The inclusion criteria were as follows: children and adolescents with genetically confirmed PMM2-CDG aged 5 to 18 years, at the time of assessment.

The exclusion criteria were any of the following: severe cognitive impairment or behavioural problems that prevented complete administration of the scale, the co-occurrence of supratentorial processes, the presence of a stroke-like episode during the study period or the intake of any non-validated therapy.

Early physiotherapy intervention programs were not an exclusion criterion. Medical problems which could have modified the results (such as an orthopaedic surgery), were registered.

The same child neurologist rated the PMM2-CDG patients with the ICARS in the different medical centres. The examinations were videotaped following a standardized protocol for educational and revision purposes. ICARS involves a 100-point rating scale with higher scores denoting more evident clinical abnormalities [9]. ICARS includes subscores for posture and gait (0–34), kinetic functions (0–52), speech abnormalities (0–8) and oculomotor function (0–6).

Biochemical and molecular studies were carried out in all the PMM2-CDG patients enrolled. Genetic analysis was performed at the Centre of Diagnosis of Molecular Diseases, Autonomous University of Madrid (CEDEM-UAM) in Spain.

The available MRIs were reviewed, but no new radiological explorations were requested. The brain MRI examinations included T1 and T2-weighted, diffusion-weighted

and FLAIR sequences. For the volumetric analysis, SPGR 3D T1-axial images were transferred to Philips IntelliSpace Portal 4.0 software, [<http://www.mea.philips.com/healthcare/product/HCNOCN281/intellispace-portal-7>] where a 3D brain image was automatically generated, as previously reported [6].

Ethical permission for the study was obtained from the Research & Ethics Committee of the HSJD. Parents gave their written informed consent and children/adolescents gave their assent. Samples were obtained in accordance with the Helsinki Declaration of 1964, as revised in October 2013 in Fortaleza, Brazil.

We performed our statistical analysis using SPSS 19.0 software (Armonk, NY: IBM Corp.) In order to compare the results of ICARS1 (first scale evaluation) to ICARS2 (second scale evaluation), and between the different subscales, we used the T Student Test. *P*-values of less than 0.05 were considered significant. To analyse the correlation between time, age and ICARS results, we used Pearson's correlation. We studied the correlation between ICARS and the cerebellar volumes by calculating Spearman's correlation (non-parametric). All the statistical tests were two-sided.

Results

ICARS assessment over time

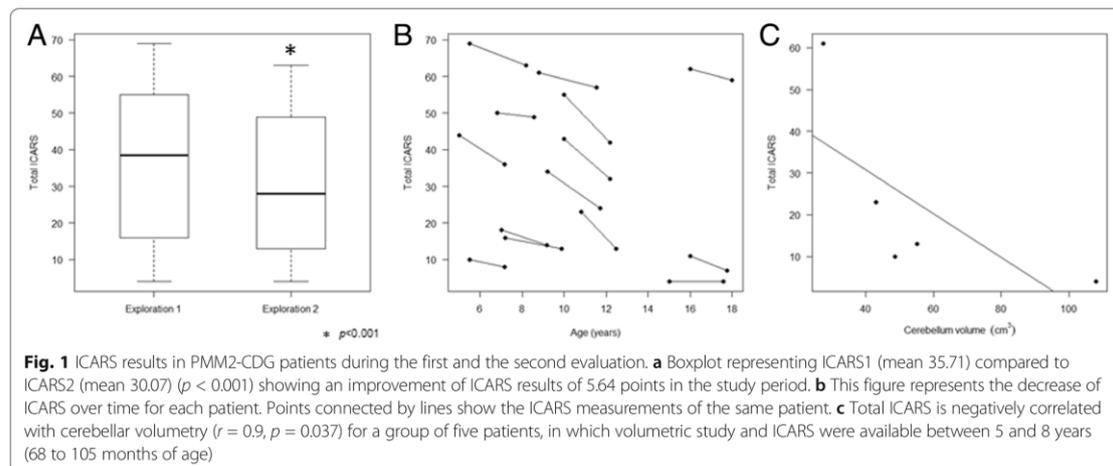
Forty-three PMM2-CDG patients were registered in our data base. From those, nine were older than 18 years and seven were younger than 5 years, at the time of assessment, and were discarded. Three patients from the database died during the first 2 years of life.

From the eligible sample of 24, four (16.7%) were excluded due to severe intellectual disability ($n = 2$) and supratentorial lesions (one due to cranial haemorrhage and the other due to hydrocephaly and ischemic lesions secondary to cardiac arrest).

Of the 20 remaining patients, two different ICARS evaluations separated by more than 20 months were available for 14 patients.

Our final sample included eight girls and six boys, aged 5 years 6 months to 16 years at the time of the first ICARS evaluation (mean age: 9 years 4 months, standard deviation (SD): 3 years 9 months). The time period between ICARS1 and ICARS2 evaluations was 20 to 34 months (mean: 26.3 months, SD: 4.8 months). One patient underwent hip surgery 10 months before the second ICARS evaluation, but she was not excluded from the study.

The ICARS1 values were higher than the ICARS2 (35.71 (SD 21.98) versus 30.07 (SD 21.06), ($p < 0.001$)) which shows an improvement of cerebellar symptoms of 5.64 points in the study period (SD: 4.10) (Fig. 1a and b). All the patients improved their functional cerebellar capabilities with the exception of one case with a very mild



phenotype who retained an ICARS of 4/100 (range of improvement: 0 to 13 points). We show elements of the two ICARS evaluations of one patient in an additional movie file (see Additional file 1). The decrease of ICARS over time for each patient is represented in Fig. 1b. Table 1 shows molecular studies and ICARS results for every patient.

To express the differences in time between both ICARS results, we used “years” as our unit of measurement as the period of time between the two evaluations was not exactly the same in all patients. On average, there was an improvement of 2.64 points per year with a SD of 1.97 points ($p < 0.001$), with a range of improvement from 6.02 (in a girl with an initial ICARS of 55, followed 26 months) to no improvement at all.

No correlations were observed between the annual difference and the age of the patients at assessment. There was no statistically significant correlation between the annual difference and the magnitude of ICARS1 ($r = 0.21, p = 0.48$).

The ICARS subscores (posture and gait (P), kinetic functions (K), speech abnormalities (S) and oculomotor function (O)) were evaluated independently. All the subscales improved with time, and reached statistical significance in posture and gait (ICARS1-P = 13.36 vs ICARS2-P = 10.50; $p < 0.001$), kinetic functions (ICARS1-K = 17.36 vs ICARS2-K = 15.29; $p = 0.04$) and speech abnormalities (ICARS1-S = 3.36 vs ICARS2-S = 3.07; $p = 0.045$), but had a non-statistically significant trend in oculomotor function (ICARS1-O = 1.86 vs ICARS2-O = 1.36; $p = 0.105$).

Neuroimaging assessment

Twenty-three MRI images were available from the 14 patients included our study. All the patients had undergone at least one MRI before the first ICARS evaluation,

generally during the first months or years of life. Nine patients underwent a second MRI that showed cerebellar atrophy progression (Table 1). For six of them, the follow-up MRI was obtained between both ICARS evaluations. The time between the two MRI images was very heterogeneous; therefore no statistical analysis could be drawn comparing radiological and clinical evolution.

For a group of five patients (Patients 1, 2, 3, 5, and 7), conventional MRI and volumetric cerebellar studies were obtained during the period when ICARS were assessed. The correlation for this small group between the cerebellar volumetric analysis and clinical phenotypes is represented in Fig. 1c, and depicts a negative correlation between the ICARS score and total cerebellar volume ($r = -0.9, p = 0.037$). Additional file 2 shows detailed molecular, radiological and clinical characteristics of three of those patients.

Discussion

PMM2-CDG is a rare multisystem disease with an extremely variable phenotype targeting almost every organ in the human body. In the long term, the neurological phenotype is the main cause of disability, cerebellar syndrome being the primary neurological finding [1, 2]. However the natural history of the neurological impairment, including a quantification of the cerebellar syndrome, is largely unknown.

Our study shows a mild global improvement in cerebellar functions at the paediatric age. The improvement is more evident in “posture and gait” and “kinetic functions”. This fact may be explained by two reasons: firstly, fine and gross motor skills change significantly during the neurodevelopment of all children, as evidenced by the greater improvement in these areas in normal developing children [10]; and secondly, the “posture and gait” and “kinetic functions” subscores have more weight on

Table 1 Patients' characteristics and ICARS evolution

ID	Gender/ Age ^a	Molecular findings	Period of evaluation	ICARS1	ICARS2	Improvement	MRI
1	F/ 5 yr. 6 mo	c.368G > A/ c.722G > C	20 mo	10	8	2/100	CA progression
2	M/ 10 yr. 9 mo	c.484C > T/ c.523 + 3A > G	20 mo	23	13	10/100	CA progression
3	F/ 8 yr. 9 mo	c.338C > T/ c.353C > G + c.550C > A	33 mo	61	57	4/100	CA progression
4	F/ 9 yr. 2 mo	c.470 T > C/ c.484C > T	30 mo	34	24	10/100	Only one MRI available. CA.
5	M/ 15 yr	c. 278A > C/ c.422G > A	31 mo	4	4	0/100	CA progression
6	F/ 5 yr. 6 mo	c.338C > T/ c.338C > T	32 mo	69	63	6/100	CA progression
7	F/ 7 yr. 2 mo	c.470 T > C/ c.722G > C	32 mo	16	13	3/100	Only one MRI available. CA
8	F/ 16 yr	c.367C > T/ c.458 T > C	24 mo	62	59	3/100	Only one MRI available. CA.
9	M/ 5 yr. 1 mo	c.415G > A/ c.722G > C	26 mo	44	36	8/100	CA progression
10	M/ 7 yr	c.95 T > G/ c.422G > A	26 mo	18	14	4/100	Only one MRI available. CA.
11	F/ 10 yr	c.710C > T/ c.640-9 T > G	26 mo	55	42	13/100	Only one MRI available. CA.
12	F/ 10 yr. 3 mo	c.338C > T/ c.626A > G	26 mo	43	32	11/100	CA progression
13	M/ 16 yr. 2 mo	c.710 C > G/ c.710 C > G	21 mo	11	7	4/100	CA progression
14	M/ 6 yr. 8 mo	c.422G > A/ c.710C > T	21 mo	50	49	1/100	CA progression
Mean / SD / Range	9 yr. 4mo / 3 yr. 9 mo / 5 yr. 6 mo-16 yr. 2 mo		26.3 mo / 4.8 mo / 20–33 mo	35.71 / 21.98 / 4–69	30.07 / 21.06 / 4–63	5.64 / 4.10 / 0–13	

M male, F female, yr. years, mo months, CA cerebellar atrophy, SD standard deviation
^aAge at ICARS1 evaluation

the global scale, with seven items being scored from one to four points or more, as compared to the “speech abnormalities” and “oculomotor disorder” subscores, which are only evaluated by three items scored from one to three points.

One of the potential limitations in our study is the capability of patients to follow ICARS instructions. As previously reported [8], most PMM2-CDG patients completed the ICARS test despite intellectual disability. Therefore, the use of ICARS in the follow-up of PMM2-CDG paediatric patients is suitable in most of the cases. From the eligible 24, only two were excluded due to severe mental disability. Moreover, facilitating comprehension of the different manoeuvres by training the patient immediately prior to evaluation may help the procedure in younger patients.

Another limitation of our study is the heterogeneity of the sample. Due to the rarity of PMM2-CDG and the sample size, the study group of patients was not stratified following age and clinical severity criteria for the

statistical analysis. The stratification and subgroup analysis of larger samples will raise more specific conclusions in terms of ICARS evolution.

The non-cerebellar aspects of the neurological spectrum of PMM2-CDG patients can act as potential confounders to ICARS assessment (muscle weakness, peripheral neuropathy, extracerebellar muscle hypotonia, and cognitive impairment) [8], however, some of them alter the final result all over the time in subsequent evaluations of the same patient, controlling the bias as the error is present through the examinations. Although, some non-cerebellar aspects can be progressive (such as peripheral neuropathy), and may be considered as a limitation in sequential ICARS evaluations.

Despite the progression of the cerebellar atrophy described previously [6, 7], our clinical experience (personal observation) and this study demonstrate that there is no progression of cerebellar symptoms in children affected by PMM2-CDG. This may be explained partly by the fact that fine and gross motor skills improve during

neurodevelopment, as has been reported in previous studies, evaluating healthy children [9, 10]. In our sample, not only the younger patients but also the older ones, improved clinically. Probably, developmental maturation of motor skills, impact of different rehabilitation strategies, alternative strategies learnt with experience to control ataxia, and brain plasticity events may all account for this unexpected discrepancy.

Lastly, and possibly due to the limited sample size, our study failed to demonstrate greater improvements dependent on the age or severity of the phenotype. An analysis using stratification among ages and clinical severity in a larger sample could investigate whether younger patients or those most severely affected may show greater improvements with time.

Regarding a correlation between neuroimaging and cerebellar phenotype, we were not able to evaluate any MRIs at the exact time of ICARS assessment. Nevertheless, the follow-up MRIs corresponding to nine patients included in the study showed a progression of cerebellar atrophy over time, as it has been previously described [6, 7]. Of note, five patients underwent MRI and ICARS evaluation at similar ages and showed a negative correlation between cerebellar volume and ICARS severity, although, this needs confirmation in a larger sample.

Conclusion

Our study shows a stabilization or mild improvement in cerebellar functions in paediatric PMM2-CDG patients above 5 years of age measured through ICARS, in contrast with cerebellar volume evolution [6, 7]. Our findings reinforce the importance of being cautious with the apparently degenerative processes of central nervous system during childhood. A better knowledge of the course of cerebellar syndrome in paediatric patients suffering from PMM2-CDG, and the availability of sensitive and reliable follow-up tool may prove essential for the evaluation of potential therapies in the future, particularly in younger children where there is no validated scale for cerebellar syndrome.

Additional files

Additional file 1: This video includes elements of the ICARS assessment of Patient 4. The video has four sections including the four ICARS subscales: "Posture and Gait disturbance", "Kinetic functions", "Speech disorders" and "Oculomotor disorders". For every manoeuvre the first and the second explorations are consecutive in the video. (M4V 277427 kb)

Additional file 2: Cerebellar volumetric study, molecular and clinical characteristics of Patients 3, 5 and 7. (TIFF 3555 kb)

Acknowledgements

We thank the patients and their families for their collaboration in this study. The work was supported by national grants P114/00021, P111/01096, P111/01250, and P110/00455 from the National Plan on I + D + I, cofinanced by

ISC-III (Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación Sanitaria) and FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional) and IPT-2012-0561-010000 from MINECO. Three research groups (U-746, U-737 and U703) from the Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBER-ER), Instituto de Salud Carlos III, Spain, have worked together for the present study.

Group authorship: This manuscript involves a collaboration group: **CDG Spanish-Consortium.**

Ma Concepción Miranda, MD PhD¹, Francisco Carratala MD PhD², M Pilar Póo, MD PhD³, Bernabé Robles, MD, PhD⁴, María L. Couce MD, PhD⁵, Marisa Girós MD, PhD⁶, Laura Gort MD, PhD⁶, Raquel Montero PhD³, Rafael Artuch, MD, PhD³, Celia Pérez-Cerdá, PhD⁷, Jordi Muchart MD³, Belén Pérez, PhD⁷.

1. Pediatric Neurology Unit, H.G.U Gregorio Marañón, Madrid, Spain.
2. Pediatric Neurology Department, University Hospital Sant Joan d'Alacant, Spain.
3. Neuropediatric, Radiology and Clinical Biochemistry Departments, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain. U-703 Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBER-ER), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain.
4. Neurology Department, Hospital General de Sant Boi, Parc Sanitari Sant Joan de Déu, Sant Boi, Barcelona, Spain.
5. Unit of Diagnosis and Treatment of Congenital Metabolic Diseases. Department of Pediatrics. Hospital Clínico Universitario de Santiago. CIBERER. Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), Santiago de Compostela, Spain.
6. Inborn Errors of Metabolism, Biochemical and Molecular Genetics Service, Hospital ClínicU-737 Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBER-ER), Instituto de Salud Carlos III, IDIBAPS, Barcelona, Spain.
7. Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares (CEDEM), Universidad Autónoma de Madrid (UAM), U-746 Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBER-ER) Madrid, Instituto de Salud Carlos III, IdiPAZ, Madrid, Spain.

Funding

We did not have any sponsor in any of the phases of the study. None of us, the authors, has received any payment to produce the manuscript. The work was supported by national grants P114/00021, P111/01096, P111/01250, and P110/00455 from the National Plan on I + D + I, cofinanced by ISC-III (Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación Sanitaria) and FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional) and IPT-2012-0561-010000 from MINECO. Three research groups (U-746, U-737 and U703) from the Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBER-ER), Instituto de Salud Carlos III, Spain, have worked together for the present study.

Availability of data and materials

The datasets generated and analyzed during the current study are not publicly available because they are part of medical records but are available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

The work presented here was carried out in collaboration among all authors. Study concept and design, acquisition of data, analysis and interpretation of data: NLS, VDD, AFMM, JM, DC. Acquisition of data and critical revision of manuscript: FC, AF, LGGS, MCM, LL, MPP, BR, RVF, RM, RA, LG, MG, CPC, BP. Study concept and design, analysis and interpretation of data, study supervision and critical revision of manuscript for intellectual content: AM, BPD, MS. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Ethical permission for the study was obtained from the Research & Ethics Committee of the HSJD. Parents gave their written informed consent and children/adolescents gave their assent. Samples were obtained in accordance with the Helsinki Declaration of 1964, as revised in October 2013 in Fortaleza, Brazil.

Consent for publication

All the authors and the parents agree to the submission for publication. A copy of the consent form is available if requested.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interest.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Neuropediatric, Radiology and Clinical Biochemistry Departments, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain. ²U-703 Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBER-ER), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain. ³Pediatrics Department, Hospital Garrahan, Buenos Aires, Argentina. ⁴Statistics Department, Fundació Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain. ⁵Pediatric Institute for Genetic Medicine and Rare Diseases, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain. ⁶Pediatric Neurology Department, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain. ⁷Unit of Child Neurology, Department of Pediatrics, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús de Madrid, Madrid, Spain. ⁸Grup de Recerca en Neurologia Pediàtrica, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Secció de Neurologia Pediàtrica, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain. ⁹Neurology Department, Hospital Sant Joan de Déu, Passeig Sant Joan de Déu, 2, 08950 Esplugues, Barcelona, Spain.

Received: 22 March 2017 Accepted: 6 September 2017

Published online: 15 September 2017

References

- Freeze HH, Chong JX, Bamshad MJ, Ng BG. Solving glycosylation disorders: fundamental approaches reveal complicated pathways. *Am J Hum Genet.* 2014;94:161–75.
- Pérez-Dueñas B, García-Cazorla A, Pineda M, Poo P, Campistol J, Cusi V, et al. Long-term evolution of eight Spanish patients with CDG type Ia: typical and atypical manifestations. *Eur J Paediatr Neurol.* 2009;13:444–51.
- Antoun H, Villeneuve N, Gelot A, Panisset S, Adamsbaum C. Cerebellar atrophy: an important feature of carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type 1. *Pediatr Radiol.* 1999;29:194–8.
- Aronica E, van Kempen AA, van der Heide M, Poll-The BT, van Slooten HJ, Troost D, et al. Congenital disorder of glycosylation type Ia: a clinicopathological report of a newborn infant with cerebellar pathology. *Acta Neuropathol.* 2005;109:433–42.
- Feraco P, Mirabelli-Badenier M, Severino M, Alpigiani MG, Di Rocco M, Biancheri R, et al. The shrunken, bright cerebellum: a characteristic MRI finding in congenital disorders of glycosylation type Ia. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2012;33:2062–7.
- Barone R, Carrozzini M, Parini R, Battini R, Martinelli D, Elia M, et al. A nationwide survey of PMM2-CDG in Italy: high frequency of a mild neurological variant associated with the L32R mutation. *J Neurol.* 2015;262:154–64.
- De Diego V, Martínez-Monseny AF, Muchart J, et al. Longitudinal volumetric and 2D assessment of cerebellar atrophy in a large cohort of children with phosphomannomutase deficiency (PMM2-CDG). *J Inher Metab Dis.* 2017 Mar 24. doi: <https://doi.org/10.1007/s10545-017-0028-4>. [Epub ahead of print].
- Serrano M, de Diego V, Muchart J, Cuadras D, Felipe A, Macaya A, et al. Phosphomannomutase deficiency (PMM2-CDG): ataxia and cerebellar assessment. *Orphanet J Rare Dis.* 2015;10:138.
- Trouillas P, Takayanagi T, Hallett M, Currier RD, Subramony SH, Wessel K, et al. International Cooperative Ataxia Rating Scale for pharmacological assessment of the cerebellar syndrome. The Ataxia Neuropharmacology Committee of the World Federation of Neurology. *J Neurol Sci.* 1997;145:205–11.
- Brandsma R, Spits AH, Kuiper MJ, Lunsing RJ, Burger H, Kremer HP, Sival DA, Childhood Ataxia and Cerebellar Group. Ataxia rating scales are age-dependent in healthy children. *Dev Med Child Neurol.* 2014;56:556–63.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Síntesis de los resultados

- Se evaluó mediante la escala ICARS a 14 pacientes con edades comprendidas entre los 5 y los 16 años, en 2 momentos temporales distintos, con una separación de al menos 20 meses entre ambas valoraciones.
- Se observó un descenso en la puntuación ICARS (es decir, una mejoría de la ataxia cerebelosa) en la segunda evaluación con respecto a la primera, en todos los casos a excepción de uno. Esta mejoría resultó ser de 5,64 puntos de media, para un intervalo temporal promedio entre ambas evaluaciones de 26,3 meses. Esto supuso una mejoría global del ICARS de 2,64 puntos/año, para el grupo de pacientes estudiado.
- No hubo correlación entre el cambio anual del ICARS (cambio en puntos/año) y la edad de los pacientes en el momento de la evaluación. Es decir, los pacientes más jóvenes no mejoraron más.
- Tampoco se encontró una correlación entre el cambio anual del ICARS y la magnitud del ICARS en el momento de la primera evaluación. Es decir, los pacientes más afectados no mejoraron más.
- Al valorar de forma independiente cada una de las subescalas del ICARS (P: postura y marcha; K: funciones cinéticas; S: trastornos del habla; O: función oculomotora) se encontró que todas mejoraron con el transcurso del tiempo, siendo esta mejoría estadísticamente significativa para las subescalas “postural y marcha”, “funciones cinéticas” y “trastornos del habla”, pero no para la subescala “función oculomotora”.
- En 5 de los pacientes participantes, se dispuso de un estudio volumétrico del cerebelo a partir de imágenes de RM cerebral, realizado entre ambas evaluaciones con la escala ICARS. Esto permitió establecer en ellos, una correlación entre la puntuación de ICARS y el volumen cerebeloso total. Esta correlación resultó ser negativa y estadísticamente significativa, mostrando como los pacientes con menor volumen cerebeloso presentaron un mayor grado de ataxia.

3. Protocolos de actuación.

3.1 Protocolo diagnóstico en los defectos congénitos de la glicosilación.

Víctor de Diego, Mercedes Serrano, Bélen Pérez-Dueñas, Paz Briones, Rafael Artuch y el Consorcio Español en CDG.

Nuestro grupo, en colaboración con especialistas en diagnóstico bioquímico en enfermedades congénitas del metabolismo del Hospital Sant Joan de Déu y del Hospital Clínic de Barcelona, desarrolló este protocolo clínico-bioquímico con el objetivo de mejorar los conocimientos sobre el diagnóstico de los CDG entre los profesionales españoles. Consta de: a) una breve introducción sobre los tipos de CDG y su sintomatología; b) una segunda parte que trata de las principales pruebas diagnósticas (perfil de isoformas de la sialotransferrina, perfil de glicosilación de la APOC-III, actividades enzimáticas, y test genéticos), con sus respectivas ventajas y limitaciones; y c) un algoritmo diagnóstico, que pretende servir como guía práctica para elegir la prueba de detección más adecuada dependiendo de las características individuales de cada paciente.

3.2 Manejo de los trastornos de la coagulación en pacientes con PMM2-CDG.

V. de Diego, M. Serrano, B. Pérez-Dueñas, M.T. Toll, J. Corral y el Consorcio Español en CDG.

Se amplió y actualizó el protocolo de uso interno sobre el manejo de las alteraciones hematológicas en la PMM2-CDG del Hospital Necker-Enfants Malades de Paris. El protocolo, fue además revisado por especialistas en hematología del Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona, así como por investigadores en coagulación y defectos de la glicosilación de la Universidad de Murcia. El documento consta de: a) una breve introducción sobre las alteraciones, fisiopatología y epidemiología de los trastornos de la coagulación en la PMM2-CDG; b) los controles hematológicos aconsejados en pacientes asintomáticos con la enfermedad; así como de c) varios apartados con recomendaciones prácticas según la evidencia disponible, sobre el manejo de las principales complicaciones o situaciones de riesgo relacionadas con la coagulación en esta enfermedad (intervenciones quirúrgicas, prevención del riesgo trombotico, episodios *stroke-like*, ACVs hemorrágicos, y coagulación intravascular diseminada).



PROTOCOLO DIAGNÓSTICO EN LOS DEFECTOS CONGÉNITOS DE LA GLICOSILACIÓN

Se denominan genéricamente defectos congénitos de la glicosilación (CDG, del inglés congenital disorders of glycosylation), al grupo de enfermedades genéticas, la mayoría de herencia autosómica recesiva, causadas por defectos de la síntesis de glicanos (cadenas de azúcares) y/o de su unión a proteínas y lípidos. En el momento actual, los CDG son un grupo de enfermedades raras que comprenden más de 70 trastornos genéticos conocidos.

Los mamíferos tienen ocho vías principales de glicosilación localizadas en el citosol, retículo endoplásmico, y aparato de Golgi de la célula. De ellas, son 4 las que hasta el momento, pueden estar afectadas en los trastornos congénitos de la glicosilación: defectos de la N-glicosilación de proteínas, defectos de la O-glicosilación de proteínas, defectos de la glicosilación de lípidos y de glicanos anclados a glicofosfatidilinositol (GPI), y defectos de la glicosilación de múltiples vías y de otras vías.

Actualmente se conocen 76 tipos distintos de CDGs, debidos a mutaciones en 76 genes diferentes. De ellas 27 son defectos puros de la N-glicosilación de proteínas, 18 defectos puros de la O-glicosilación de proteínas, 25 son defectos combinados de la glicosilación y defectos de otras vías (defectos combinados de la N- y O-glicosilación, defectos de la fucosidación, defectos de la síntesis de dolicol, defectos en subunidades del complejo COG, etc.), 2 son defectos en la glicosilación de lípidos, y 4 son defectos en la síntesis del glicano del glicofosfatidilinositol (GPI).

Muchos son trastornos multisistémicos y la gran mayoría (82%) muestran afectación neurológica (cerebro, sistema nervioso periférico, unión neuromuscular, músculo, y/o retina). Sin embargo, el espectro clínico es amplísimo, oscilando desde afectación de un solo órgano a lesión multiorgánica, y desde muerte prenatal hasta adultos asintomáticos.

Una vez establecida la sospecha clínica de CDG (en general sospechar ante toda enfermedad neurológica y multisistémica sin filiar), se dispone de 4 técnicas para establecer el diagnóstico: el perfil de glicosilación de la sialotransferrina, el perfil de glicosilación de apo C-III, las actividades enzimáticas, y las técnicas genéticas. A continuación resumimos en qué consisten estas pruebas y cuál su aplicación en la práctica médica.

1.- PERFIL DE GLICOSILACIÓN DE LA SIALOTRANSFERRINA.

Para el cribado general de los defectos de la glicosilación, se utiliza el estudio de glicosilación de la transferrina (o sialotransferrina) en suero. Ésta es una glicoproteína muy abundante en sangre cuya función es el transporte del hierro. La transferrina tiene por defecto 2 cadenas de azúcares biantenales (en total 4 cadenas de glicanos), que tienen un azúcar con carga negativa (el ácido siálico) en cada extremo. Debido a esas cargas negativas, podemos separar las distintas formas de transferrina si las hacemos correr en un campo eléctrico, por ejemplo mediante isoelectroenfoque (IEF). En el suero de una persona sana, la mayor parte de la transferrina tendrá 4 cadenas de glicanos (será tetrasialo-transferrina), aunque también es posible encontrar pequeñas cantidades de transferrina con ninguna, una, dos, tres, cinco y seis cadenas de glicanos (asialo-TF, monosialo-TF, disialo-TF, trisialo-TF, pentasialo-TF y hexasialo-TF).

Además del IEF contamos con otras técnicas para el estudio de los patrones de transferrina, como el HPLC y el CZE, que son métodos cuantitativos que ofrecen mayor objetividad para interpretar los resultados.



En algunos defectos congénitos de la glicosilación, no encontramos el patrón normal de glicosilación, si no que podemos observar, dependiendo del tipo de defecto, 2 patrones diferentes:

- **Patrón de tipo 1:** Aunque domina la tetrasialo-TF, con respecto al patrón normal observaremos un aumento de asialo-TF y disialo-TF. Aparece en defectos de la formación de la cadena de azúcares o de su unión a la proteína. Normalmente la enzima defectuosa está localizada en el citosol o en el retículo endoplásmico.

Este patrón está presente en:

- 1.- La mayoría de defectos de la N-glicosilación de proteínas: excepto en GMPPA-CDG, GMPPB-CDG Y MOGS-CDG que tienen un patrón normal, y en MGAT2-CDG y MAN1B1-CDG que muestran un patrón de tipo 2.
- 2.- Algunos defectos combinados de la glicosilación: en concreto DPM1-CDG, DPM2-CDG, DPM3-CDG, MPDU1-CDG, DOLK-CDG, SRD5A3-CDG y DHDDS-CDG.

- **Patrón de tipo 2:** Aunque domina la tetrasialo-TF, con respecto al patrón normal observaremos un aumento de asialo-TF, monosialo-TF, disialo-TF, y trisialo-TF. Aparece en defectos del procesamiento posterior de las cadenas de azúcares. Normalmente la enzima defectuosa está localizada en el aparato de Golgi.

Este patrón está presente en:

- 1.- Dos defectos de la N-glicosilación de proteínas: MGAT2-CDG y MAN1B1-CDG.
- 2.- Algunos defectos combinados de la glicosilación: en concreto B4GALT1-CDG, SLC35A1-CDG, SLC35A2-CDG, SLC35A3-CDG, SLC35C1-CDG, COG1-CDG, COG4-CDG, COG5-CDG, COG6-CDG, COG7-CDG, COG8-CDG, ATP6V0A2-CDG, TMEM165-CDG, PGM1-CDG, PGM3-CDG.

- **UTILIDAD CLÍNICA:** Hay que tener en cuenta que **el perfil de sialotransferrina será normal** (y por tanto, no útil para el diagnóstico) **en todos los defectos de la O-glicosilación de proteínas y en todos los defectos de la glicosilación de lípidos y de GPI.** Así, se deduce que **el perfil de sialotransferrina sólo es útil para el cribado de aproximadamente la mitad de los CDG.** Para llegar al diagnóstico en el resto de casos será necesario recurrir directamente a técnicas enzimáticas y sobre todo genéticas.

Por otro lado haya que destacar que es posible encontrarse con resultados **falsos positivos** en el patrón de glicosilación (es decir, con un patrón anormal de glicosilación de sialo-TF en niños y adultos sin CDG) en: recién nacidos y lactantes menores de 3 meses, en la galactosemia clásica, en la intolerancia a la fructosa, en el alcoholismo crónico, así como en personas sanas con variantes en el gen de la transferrina. En el caso de niños menores de 3 meses es posible valorar el patrón de glicosilación de la alfa-1-antitripsina, proteína con una glicosilación completa desde los primeros días de vida.

2.- PERFIL DE GLICOSILACIÓN DE LA APO C-III.

La apolipoproteína C-III o apo C-III es una proteína que forma parte de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) cuya función es el transporte de triglicéridos, colesterol y fosfolípidos desde el hígado hasta los tejidos extra-hepáticos (fundamentalmente el músculo y el tejido adiposo).

Se trata de una proteína O-glicosilada que mediante técnicas de isoelectroenfoque (IEF) puede ser separada en diferentes componentes para observar el patrón de O-glicosilación.

Un patrón alterado de la apo C-III está presente en algunos defectos combinados de la glicosilación, en concreto en: COG1-CDG, COG4-CDG, COG5-CDG, COG6-CDG, COG7-CDG, COG8-CDG, ATP6V0A2-CDG, TMEM165-CDG.



- **UTILIDAD CLÍNICA:** Todos estos CDG previamente han mostrado un patrón de sialo-TF de tipo 2, y no se conoce ningún CDG que muestre únicamente un patrón de apo C-III alterado. Por ello, en la práctica el perfil de glicosilación de apo C-III tiene la utilidad de reducir el número de CDGs posibles cuando previamente nos encontramos con un patrón de sialo-TF de tipo 2.

3.- ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.

En todos los trastornos congénitos de glicosilación la mutación presente da lugar a una proteína anómala, que en muchas ocasiones es una enzima. Habitualmente esta mutación conlleva un descenso de la actividad enzimática, el cual puede medirse con determinadas técnicas de laboratorio. En la mayoría de los casos, la medición se realiza a partir de una biopsia de piel (fibroblastos) del paciente, aunque en algunos CDG también es posible realizarla a partir de una muestra de sangre (leucocitos), como ocurre en la PMM2-CDG (Ia) y en la MPI-CDG (Ib).

En la PMM2-CDG la enzima alterada es la fosfomanomutasa, que como hemos señalado se puede cuantificar en leucocitos o fibroblastos.

- **UTILIDAD CLÍNICA:** Las técnicas enzimáticas tienen como función confirmar el tipo de CDG cuando nos encontramos con un patrón de sialo-TF alterado. Sin embargo, debido a que la mayoría requieren una biopsia de piel del paciente y la técnica no permite evaluar varias CDGs simultáneamente, poco a poco está siendo sustituida por los paneles genéticos.

Sin embargo, si se nos presenta un patrón de sialo-TF de tipo I, sigue siendo útil solicitar una actividad enzimática en la MPI-CDG y la PMM2-CDG, ya que en estos casos la muestra es más sencilla de recoger (leucocitos), y el resultado puede estar disponible en menos tiempo que el estudio genético.

Hasta este momento, en la PMM2-CDG no se ha observado una buena relación entre el grado de descenso de la actividad enzimática de la fosfomanomutasa y la severidad clínica de los pacientes.

4.- DIAGNÓSTICO GENÉTICO.

Con la introducción y mayor disponibilidad del exoma completo/secuenciación genómica y sobre todo de los paneles genéticos específicos para CDGs, el diagnóstico genético está cobrando cada vez mayor relevancia.

La PMM2-CDG es una enfermedad autosómica recesiva que aparece cuando un niño hereda una mutación de ambos progenitores. En la actualidad, se conocen unas 112 mutaciones diferentes en el gen PMM2 que pueden causar la enfermedad. Esta gran variabilidad genética ha impedido hasta este momento establecer correlaciones fenotipo-genotipo fiables.

No obstante, algunas publicaciones han mostrado los siguientes datos:

1.- Fenotipos leves se han relacionado con:

- Mutaciones en extremo C-terminal de PMM2, incluyendo p.His218Leu, p.Thr237Met, y p.Cys241Ser.
- Pacientes heterocigotos compuestos para las mutaciones: [p.Arg141His]+[p.Thr226Ser], [p.Arg141His]+[p.Ile132Thr], y [p.Arg141His]+[p.Glu139Lys]). En concreto asociadas con formas neurológicas "puras", con escasos síntomas multisistémicos.
- La mutación p.L32R (en heterocigosis compuesta con otras mutaciones) se ha relacionado con un fenotipo neurológico leve, con marcha preservada, en un grupo de pacientes italianos.
- El genotipo [p.R123X]+[p.Y205C] se ha encontrado en una paciente adulta con infertilidad como único síntoma, mientras que las mutaciones [p.R123X]+[p.Y205C] se han observado en un adulto de 38 años completamente asintomático.

2.- Fenotipos graves se han relacionado con:

- El genotipo [p.Arg141His]+[p.Phe119Leu], encontrado en pacientes escandinavos con enfermedad multisistémica grave.



- El genotipo [p.Asp188Gly]+[p.Arg141His], concretamente con una forma muy severa con esperanza de vida inferior a los 2 años en la mayoría de casos.
- La mutación p.Val231Met, asociada con fallo multiorgánico y mortalidad precoz.
- Los pacientes homocigotos o heterocigotos compuestos para mutaciones severas sin prácticamente actividad residual de la fosfomanomutasa, como p.Arg141His, son probablemente incompatibles con la vida.
- Un polimorfismo en el gen ALG6 (el concreto, el alelo F304S) presente en un 28% de la población sana, cuando aparece en pacientes PMM2-CDG se ha asociado con mayor severidad y mortalidad.
- En nuestra experiencia, los homocigotos compuestos (la misma mutación heredada de ambos progenitores) tienden a presentar mayor gravedad.

- **UTILIDAD CLÍNICA:** Las técnicas de diagnóstico genético, concretamente los paneles que secuencian múltiples genes relacionado CDGs simultáneamente, están cobrando gran relevancia en el diagnóstico. En la actualidad recomendamos su uso si:

I) Secuenciación de PMM2-CDG y MPI-CDG, conjuntamente con los estudios enzimáticos (consultar con laboratorio de referencia), ante un perfil de sialo-TF de tipo 1.

II) Ante un perfil de sialo-TF de tipo 2 y alteración del perfil de apo C-III, secuenciar (según clínica) para COG1-CDG, COG4-CDG, COG5-CDG, COG6-CDG, COG7-CDG, COG8-CDG, ATP6V0A2-CDG, TMEM165-CDG.

III) Ante un perfil de sialo-TF de tipo 2 y perfil de apo C-III normal, secuenciar (según clínica) para MGAT2-CDG, MAN1B1-CDG, B4GALT1-CDG, SLC35A1-CDG, SLC35A2-CDG, SLC35A3-CDG, SLC35C1-CDG, PGM1-CDG, PGM3-CDG.

IV) Si tenemos un perfil de sialo-TF normal, pero la sospecha clínica de CDG es intensa, solicitar estudios genéticos para uno o varios trastornos según los síntomas del paciente (recordar que el perfil de sialo-TF es normal en algunos defectos de la N-glicosilación y en algunos defectos combinados de la glicosilación, así como en todos los defectos de la O-glicosilación y de la glicosilación de lípidos y de GPI).

5.- ALGORITMO DIAGNÓSTICO.

Ver abajo.

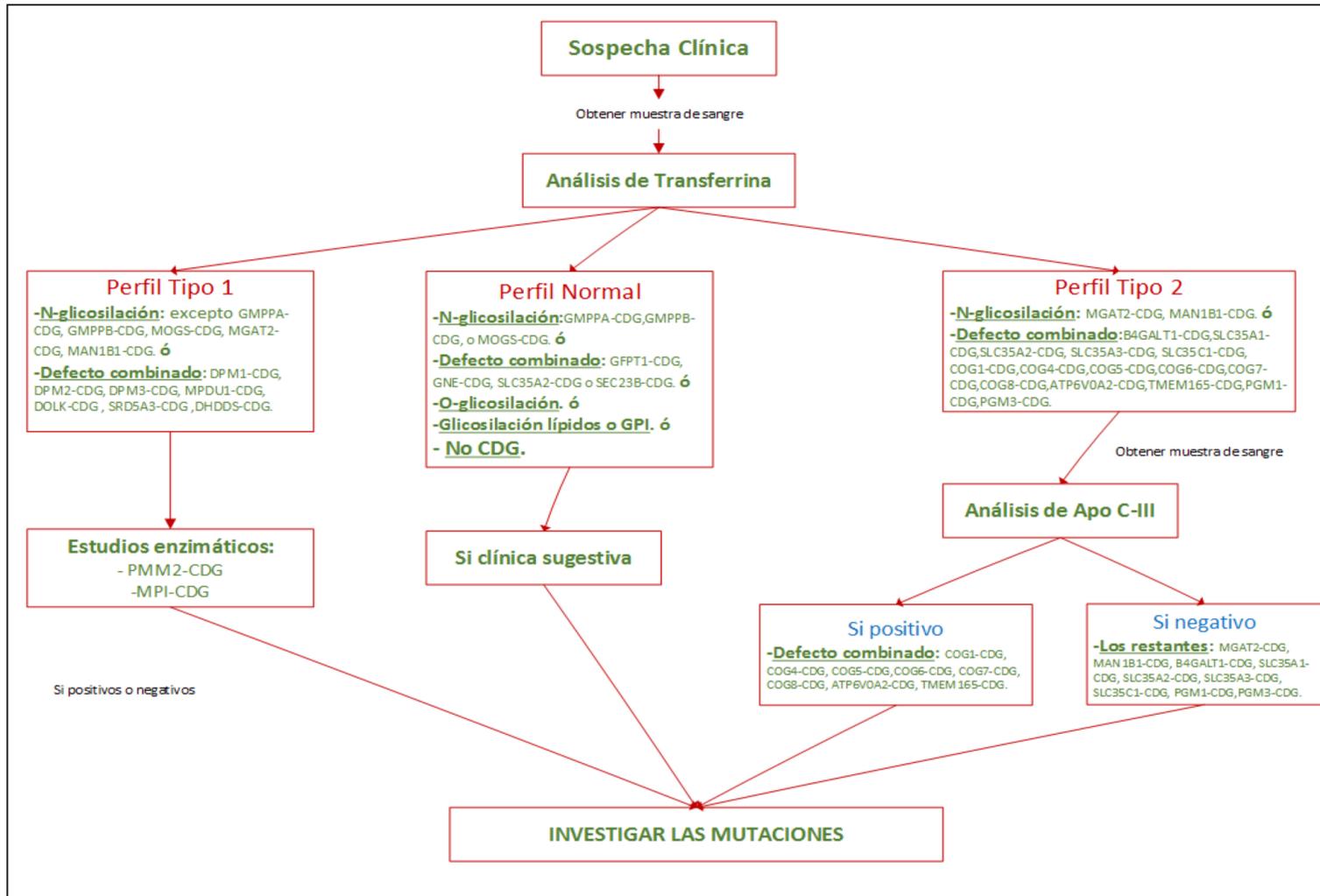
*V. de Diego, M. Serrano, B. Pérez. Servicio de Neurología, H. Sant Joan de Déu. Barcelona.

*P. Briones. Institut de Bioquímica Clínica-Hospital Clínic. Barcelona.

*R. Artuch. Unidad de Bioquímica Clínica, H. Sant Joan de Déu, Barcelona.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Barone R, Fiumara A, Jaeken J. Congenital disorders of glycosylation with emphasis on cerebellar involvement. *Semin Neurol.* 2014 Jul;34(3):357-66.
- [2] Sparks SE, Krasnewich DM. Congenital Disorders of N-linked Glycosylation Pathway Overview. 2005 Aug 15 [updated 2014 Jan 30]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Smith RJH, Stephens K, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2014. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1332/>.
- [3] Westphal V, Kjaergaard S, Schollen E, Martens K, Grunewald S, Schwartz M, Matthijs G, Freeze HH. A frequent mild mutation in ALG6 may exacerbate the clinical severity of patients with congenital disorder of glycosylation Ia (CDG-Ia) caused by phosphomannomutase deficiency. *Hum Mol Genet.* 2002 Mar 1;11(5):599-604.
- [4] Barone R, Carozzi M, Parini R, Battini R, Martinelli D, Elia M, Spada M, Lilliu F, Ciana G, Burlina A, Leuzzi V, Leoni M, Sturiale L, Matthijs G, Jaeken J, Di Rocco M, Garozzo D, Fiumara A. A nationwide survey of PMM2-CDG in Italy: high frequency of a mild neurological variant associated with the L32R mutation. *J Neurol.* 2015 Jan;262(1):154-64.
- [5] Vuillaumier-Barrot S, Isidor B, Dupré T, Le Bizec C, David A, Seta N. Expanding the Spectrum of PMM2-CDG Phenotype. *JIMD Rep.* 2012;5:123-5.
- [6] Thiel C, Meßner-Schmitt D, Hoffmann GF, Körner C. Screening for congenital disorders of glycosylation in the first weeks of life. *J Inher Metab Dis.* 2013 Sep;36(5):887-92.





MANEJO DE LOS TRASTORNOS DE LA COAGULACIÓN EN PACIENTES CON PMM2-CDG

INTRODUCCIÓN.

El déficit de fosfomanomutasa o PMM2-CDG es una enfermedad metabólica congénita, considerada la más frecuente dentro de los trastornos congénitos de la glicosilación de proteínas (CDGs). A pesar de ello se trata de una patología minoritaria con poco más de 700 pacientes descritos en todo el mundo. En ella existe un déficit en la glicosilación que afecta a múltiples proteínas del organismo, dando lugar a una enfermedad multisistémica donde pueden aparecer manifestaciones digestivas, neurológicas, oculares, hematológicas, inmunológicas, etc.

A nivel hematológico, los pacientes con PMM2-CDG tienen un mayor riesgo de presentar accidentes vasculares agudos (AVA) que la población general. Éstos pueden ser de 3 tipos: i) episodios stroke-like (cuadros de somnolencia y/o focalidad neurológica transitorios), ii) hemorragias: equimosis, accidentes cerebrovasculares (ACVs) hemorrágicos, o iii) trombosis (venosas profundas, arteriales, ACVs isquémicos).

Varias proteínas de la coagulación pueden estar disminuidas, particularmente los factores IX y XI (favoreciendo la aparición de hemorragias), así como algunos inhibidores de la coagulación como la antitrombina (AT) o las proteínas C y S (favoreciendo la aparición de trombosis). Sin embargo, no existe una relación directa entre las alteraciones en los estudios de hemostasia y el riesgo de accidentes vasculares (algunos pacientes con valores muy bajos de FIX, FXI, AT, PC o PS pueden no tener nunca un AVA y otros con valores más altos o casi normales, sí presentarlos). Por esto se cree que la causa sería, más que un déficit de estas proteínas, un desequilibrio entre las mismas el cual predispondría a sufrir tanto sangrados como trombosis (incluso en un mismo paciente). En este sentido, se ha sugerido que un ratio Factor IX/AT >1.5-2, y/o un ratio Actividad PC/Antigenicidad PC >1 serían indicativos de un mayor riesgo de sufrir un AVA. Por otro lado, parece que tanto estas alteraciones como los episodios clínicos, son más frecuentes en menores de 15 años y están favorecidos por factores de riesgo como la inmovilidad, la deshidratación o las infecciones.

Dado que se trata de una condición minoritaria no se dispone de información fiable sobre la frecuencia de los distintos tipos de accidentes, pero los datos sugieren que los más prevalentes serían los episodios stroke-like (hasta el 50% de pacientes) seguidos de las trombosis (14%) y las hemorragias (14%). Con respecto a las trombosis parece existir una clara relación entre su aparición y factores como las lesiones tisulares (intervenciones quirúrgicas, traumatismos), la inmovilidad, y los niveles bajos de AT y de proteínas C y S.

En nuestra experiencia en niños españoles con PMM2-CDG, el 26% (5 de 19 pacientes) presentaron un AVA en algún momento de su evolución, siendo en la mayoría de los casos (6 de 10 AVAs) episodios stroke-like con buena recuperación posterior. Un paciente presentó hematomas cutáneos en abdomen e ingles y hemopericardio, llevándole esto último al fallecimiento al mes de vida. Otro paciente presentó un episodio de sospecha de trombosis venosa (frialdad y coloración cutánea violácea de 24h de duración, con Eco-doppler vascular normal, tras un procedimiento invasivo) y meses más tarde un episodio de hemorragia durante una intervención quirúrgica. La mayor parte de los eventos se concentraron en un pequeño número de pacientes (10 AVAs en 5 pacientes), siendo en 4 de ellos recurrentes. En cuanto a las alteraciones analíticas, de forma similar a lo publicado con anterioridad encontramos un déficit en los factores IX y XI, y en las proteínas C y S y AT, pero también un descenso del factor V y del inhibidor del factor tisular (TFPI). La alteración más frecuente fue el déficit de AT (13 de 17 pacientes) y los déficits de factor V y de TFPI.



A continuación presentamos algunas recomendaciones para el manejo y prevención de los accidentes vasculares en pacientes con PMM2-CDG:

1.- CONTROLES EN PACIENTES ASINTOMÁTICOS.

■ En los pacientes con PMM2-CDG sin síntomas de tipo *stroke-like*, hemorragias ni trombosis, recomendamos un **control analítico anual** desde el momento del diagnóstico **al menos hasta los 15 años** de edad, **que incluya**:

- Recuento plaquetario.
- Tiempo de Protrombina e Índice de Quick.
- Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (=T. de Cefalina).
- Factores VIII, IX, XI y XII.
- Antitrombina, Proteínas C y S.

■ **Al menos en una ocasión**, solicitar también:

- Estudio de polimorfismos de Factor V Leiden y Protrombina G20210A.

La realización de estos estudios no debe ir en perjuicio de aquellos otros que se consideren necesarios en caso de aparición de un AVA o en situaciones de riesgo, y que detallamos más abajo.

2.- INTERVENCIONES QUIRÚRGICAS.

■ A partir de la evidencia disponible en el momento de la redacción de este protocolo, recomendamos evitar la cirugía electiva y los procedimientos invasivos en pacientes con PMM2-CDG, especialmente en aquellos menores de 15 años. Si es imprescindible realizarlos, sugerimos:

Antes de la cirugía programada realizar un hemograma (valorar hematíes y plaquetas), así como un estudio de hemostasia que incluya:

- Un Tiempo de Protrombina (TP). En caso de estar prolongado (relación > 1,2 o TP < 70%) solicitar también niveles de factores II, V, VII y X.
- Un tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) y niveles de factor VIII, IX y XI, incluso si el TTPa es normal (en la PMM2-CDG, el TTPa puede no alterarse a pesar del descenso de los factores IX y XI).

Abundante ingesta de líquidos antes de la intervención.

La **administración profiláctica de PFC** se decidirá **de acuerdo a la intensidad del déficit de los factores de la coagulación** (en general administrar PFC si los niveles de factores son < del 20-25%), **y al riesgo de sangrado inherente al tipo de intervención.**

La administración de factores procoagulantes como CCP (Beriplex®) o Factor VIIa recombinante (NovoSeven®) debe evitarse ya que se expone al paciente a un mayor riesgo de trombosis.

3.- PREVENCIÓN DEL RIESGO TROMBÓTICO.

■ **Cuando existe una situación de riesgo de trombosis (cirugía, reposo en cama, yeso, etc), la profilaxis con heparina de bajo peso molecular (HBPM)** debe ser **individualizada**, evaluando el balance entre riesgo trombótico/ riesgo de sangrado en cada paciente.

Recientemente se ha observado una mayor frecuencia de episodios trombóticos en la población general portadora de ciertos polimorfismos genéticos que afectan al Factor V Leiden y a la Protrombina G20210A.



Por ello, cuando sea posible, sugerimos hacer un estudio de los mismos en los pacientes con PMM2-CDG, ya que existe la posibilidad de que su presencia aumente aún más el riesgo de trombosis.

Si se establece una profilaxis con HBPM como **Enoxaparina** (Clexane®; **dosis profiláctica niños: 0,5mg/kg/12h**), se recomienda un **control de la actividad de anti-Xa**. De acuerdo con las recomendaciones del *American College of Chest Physicians (Monagle et al; Chest; 141(2); e737S-e801S)*, la **actividad de Anti-Xa 4-6 horas después de la inyección subcutánea** de HBPM a **dosis profilácticas**, debe estar entre **0,1 – 0,3 UI/mL**. Si hay dificultades para mantener estos niveles de Anti-Xa, considerar la administración de concentrados de Antitrombina (Anbinex®, Atenativ®).

Asimismo recomendamos la **movilización pasiva precoz** del enfermo **tras una intervención quirúrgica**, o tras un reposo prolongado por otros motivos.

4.- EPISODIOS STROKE-LIKE.

■ Los pacientes con PMM2-CDG pueden desarrollar trombosis o hemorragias, pero también episodios neurológicos de tipo *stroke-like*, caracterizados por disminución de consciencia y/o focalidad neurológica transitoria (por ej: debilidad transitoria de un miembro o de un hemicuerpo). Su mecanismo fisiopatológico no se ha aclarado aún. Posibles hipótesis serían: 1) una hipoperfusión metabólica cortical transitoria inducida por los trastornos de la coagulación; 2) una disfunción metabólica cortical secundaria al déficit de la glicosilación neuronal, 3) Crisis epilépticas clínicas y/o subclínicas (fundamentalmente crisis focales motoras inhibitorias). Con respecto a ésta última hipótesis, en algunos pacientes se han observado alteraciones electroencefalográficas durante los episodios "stroke-like", con mejoría clínica y neurofisiológica tras la administración de fármacos antiepilépticos.

Por lo anterior, ante cualquier síntoma neurológico de este tipo, recomendamos hacer lo antes posible una resonancia magnética cerebral (con secuencias de difusión, T1, T2 y FLAIR) y un electroencefalograma.

Aunque algunos autores han propuesto la prevención de los episodios *stroke-like* con antiagregantes como el **ácido acetilsalicílico (dosis: 1-5 mg/kg/día)**, no recomendamos su utilización salvo que existan **antecedentes de trombosis arterial**.

Por otro lado, **en caso de síntomas de tipo *stroke-like*** sugerimos la **administración de fármacos antiepilépticos** según el protocolo habitual de cada centro para el tratamiento agudo de las crisis epilépticas, **especialmente si existen alteraciones en el electroencefalograma**.

5.- ACCIDENTES CEREBROVASCULARES HEMORRÁGICOS.

■ **Para tratar un accidente cerebrovascular hemorrágico**, estaría indicada la **administración de plasma fresco congelado (PFC)** con objeto de corregir el déficit de proteínas procoagulantes, a pesar de que también aporte inhibidores de la coagulación. La administración de factores procoagulantes de tipo concentrado de complejo protrombínico (CCP; Beriplex®) o de factor VIIa recombinante (NovoSeven®) debe evitarse, ya que expone al paciente a un riesgo elevado de trombosis.

Antes de la administración de plasma fresco congelado (PFC) es recomendable realizar un hemograma con recuento plaquetario y un estudio de hemostasia que incluya:

- Un Índice de Quick (IQ).
- Un Tiempo de Cefalina.



Algunos datos sugieren que en estos pacientes la transfusión plasma a las dosis habituales, independientemente de su eficacia clínica, corrige poco o mal las alteraciones de los estudios de hemostasia. A pesar de ello, tras cada transfusión recomendamos la realización de:

- Tiempo de Protrombina (TP).
- Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (TTPA).

6.- COAGULACIÓN INTRAVASCULAR DISEMINADA (CID).

- En caso de Coagulación Intravascular Diseminada (CID) se valorará la administración de PFC y concentrados de Antitrombina.

Adaptado de:

Prise en charge des troubles de la coagulation chez patients atteints de CDG syndrome de type Ia. P. de Lonlay, Lasne, Dautzenberg. Centre de Reference des Maladies Metaboliques de L'enfant et L'adult. Hopital Necker-Enfants Malades. Paris. Mai 2011.

*V. de Diego, M. Serrano, B. Pérez-Dueñas. Servicio de Neurología. Hospital Sant Joan de Déu. Barcelona.

*M.T. Toll. Servicio de Hematología Clínica. Hospital Sant Joan de Déu. Barcelona.

*J. Corral. Centro Regional de Hemodonación. Servicio de Hematología y Oncología Médica. Hospital Universitario Morales Meseguer. Universidad de Murcia. Murcia.

Grupo Español de Trabajo en CDG. Febrero 2015.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] J.B. Arnoux, N. Boddaert, V. Valayannopoulos, S. Romano, N. Bahi-Buisson, I. Desguerre, Y. de Keyzer, A. Munnich, F. Brunelle, N. Seta, M.D. Dautzenberg, P. de Lonlay. Risk assessment of acute vascular events in congenital disorder of glycosylation type Ia. *Mol. Gen. Metab.* 2008; 93 444-449.
- [2] Linssen M1, Mohamed M, Wevers RA, Lefeber DJ, Morava E. Thrombotic complications in patients with PMM2-CDG. *Mol Genet Metab.* 2013; 109(1):107-111.
- [3] Fiumara A1, Barone R, Buttitta P, Musso R, Pavone L, Nigro F, Jaeken J. Haemostatic studies in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *Thromb Haemost.* 1996; 76(4):502-504.
- [4] Dinopoulos A1, Mohamed I, Jones B, Rao S, Franz D, deGrauw T. Radiologic and neurophysiologic aspects of stroke-like episodes in children with congenital disorder of glycosylation type Ia. *Pediatrics.* 2007; 119(3):e768-772.
- [5] de la Morena-Barrio ME, Di Michele M, Lozano ML, Rivera J, Pérez-Dueñas B, Altisent C, Sevivas T, Vicente V, Jaeken J, Freson K, Corral J. Proteomic analysis of platelet N-glycoproteins in PMM2-CDG patients. *Thromb Res.* 2014 Mar;133(3):412-7.

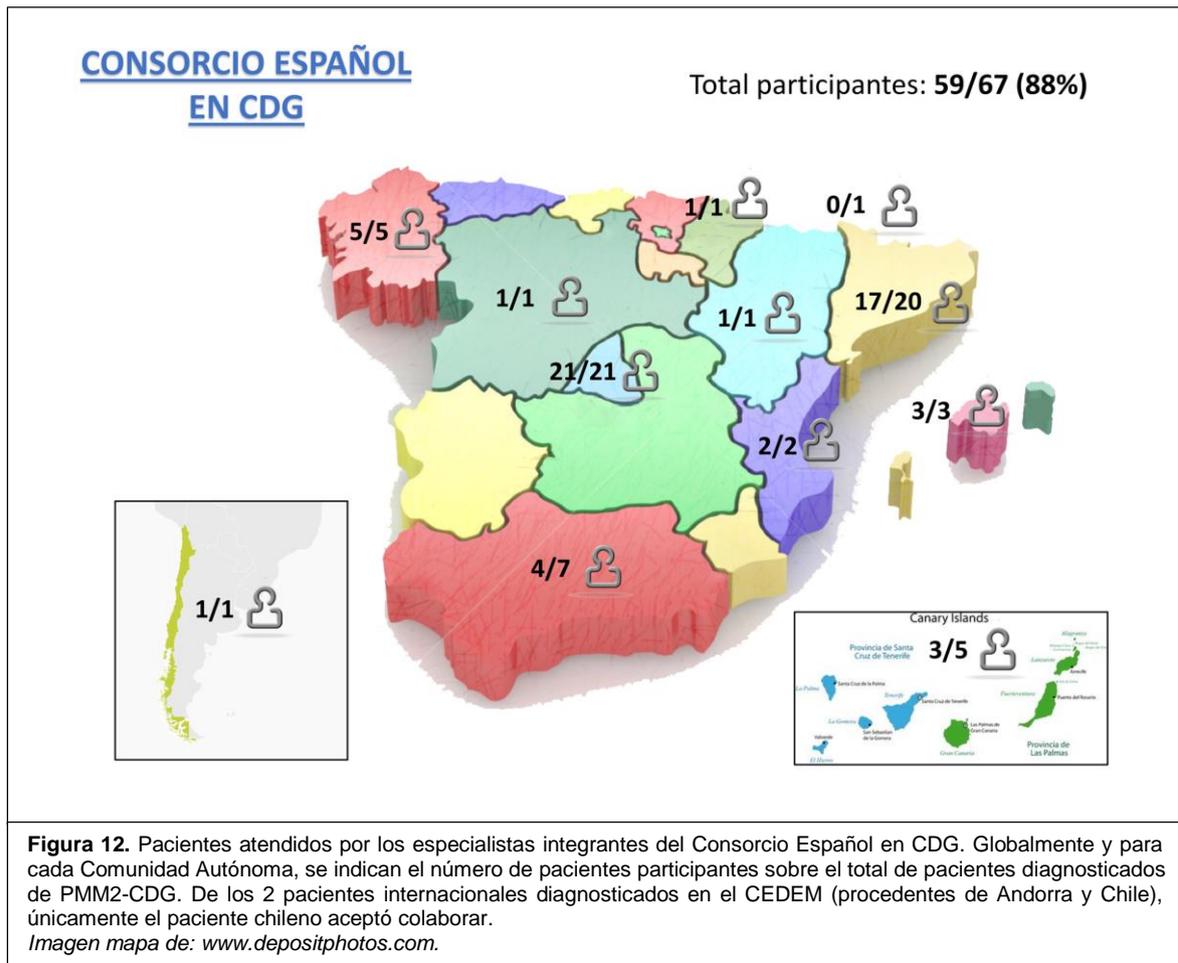
4. Consolidación de un grupo de trabajo multicéntrico en CDG de ámbito nacional, el Consorcio Español en CDG.

Víctor De Diego, Mercedes Serrano, Belén Pérez-Dueñas, y los integrantes del Consorcio Español en CDG.

A principios de 2013, gracias a la colaboración de las doctoras Celia Pérez-Cerdá y Belén Pérez González del Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares (CEDEM) de la Universidad Autónoma de Madrid, así como de la asociación española en síndrome CDGs (AESCDG), fue posible disponer de un listado de los facultativos a cargo de los pacientes nacionales con PMM2-CDG (en su mayor parte neuropediatras o neurólogos).

A partir de ese momento, nuestro equipo remitió correos electrónicos a los diferentes especialistas responsables para ofrecerles formar parte de un grupo de trabajo en trastornos congénitos de la glicosilación de ámbito nacional. Por otro lado, se presentó el proyecto colaborativo en la XXXVII reunión anual de la Sociedad Española de Neuropediatría (2013) lo que aumentó la difusión de esta iniciativa.

Finalmente, tras varios meses de trabajo, se consiguió establecer el consorcio español en trastornos congénitos de la glicosilación. El mismo, agrupó en su inicio a 26 especialistas clínicos de 21 hospitales, a varios investigadores del CEDEM y a la AESCDG, todos ellos bajo la coordinación de las doctoras Mercedes Serrano y Belén Pérez-Dueñas del Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona, como centro con mayor experiencia en este grupo de patologías. Este esfuerzo conjunto permitió reclutar inicialmente a 58 de los 66 pacientes con PMM2-CDG de los que se tenía constancia en España (un 88%), y a 1 de los 2 pacientes internacionales cuyos estudios moleculares se habían realizado en el CEDEM (1 paciente de Andorra con cuyo facultativo no fue posible contactar y que por tanto no fue incluido, y 1 paciente del Hospital Clínico de la Universidad Católica de Santiago de Chile que sí participó), para hacer un total de 59 de 67 participantes (88%).



5. Participación en la red de investigación europea en trastornos congénitos de la glicosilación, “Euro-CDG”.

Mercedes Serrano, Belén Pérez-Dueñas, Víctor De Diego.

“E-Rare” es un proyecto respaldado por la Unión Europea que tiene como finalidad promover la creación de programas regionales, nacionales y comunitarios de investigación en enfermedades raras, y especialmente, estimular la coordinación entre ellos a nivel europeo.

Uno de los proyectos respaldados por el programa “E-Rare”, es la red de investigación europea “EURO-CDG”. Esta colaboración, iniciada en 2011 y activa en la actualidad (ahora bajo el nombre “EUROGLYCAN”), incluye a investigadores clínicos y básicos de toda Europa, y tiene como objetivos principales: i) mejorar la aproximación diagnóstica a los CDG, ii) desarrollar modelos animales para avanzar en el conocimiento sobre su fisiopatología, y iii) mejorar la calidad de vida de los pacientes con CDG y de sus familias, en especial desarrollando tratamientos que modifiquen la historia natural de estas enfermedades. Así mismo, otras metas del proyecto son: la creación de una red de laboratorios de referencia a nivel europeo; y el mantenimiento de un registro y un banco celular de pacientes.

La red EURO-CDG celebra reuniones anuales, cuya sede cambia cada año de país. Sus finalidades son, favorecer el encuentro entre investigadores, el intercambio de ideas y la promoción de proyectos transnacionales en trastornos congénitos de la glicosilación. Por ello, nuestro equipo (como representante del consorcio español en CDG), acude periódicamente a estos encuentros desde 2014, para poder hacer partícipes y trasladar los avances en CDG, a los pacientes y profesionales nacionales.

Fruto de estas reuniones destacamos, en colaboración con el CEDEM, la creación de un registro de pacientes españoles con CDG, facilitando posibilidad de iniciar ensayos clínicos con nuevas terapias (por ej. chaperonas farmacológicas) desarrolladas por los investigadores básicos, en lo que supone un modelo fructífero de investigación traslacional.

6. Creación de contenidos y soporte on-line en CDG para familias y profesionales sanitarios: “RareCommons”.

Begonya Nafría-Escalera, Mercedes Serrano, Víctor De Diego, Belén Pérez-Dueñas.

“RareCommons” (www.rarecommons.org) es una plataforma online creada desde el Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona, con el objetivo de facilitar la interacción entre los pacientes con enfermedades raras, sus familias y los médicos que les atienden.

A través de su página web, los pacientes, sus familias y los facultativos a cargo, pueden acceder a información fiable y rigurosa sobre CDG, y se les ofrece, si así lo desean, cumplimentar una serie de cuestionarios sobre su sintomatología o signos clínicos. De esta manera, es posible generar conocimiento científico sobre esta y otras patologías minoritarias, de una forma más accesible y rápida.

La metodología de trabajo se inicia con el registro de las familias en la página web, tras lo cual tienen acceso a varios capítulos con información contrastada sobre los síntomas principales en las CDG, ordenados por órganos y sistemas. Después, si están de acuerdo, pueden cumplimentar un cuestionario sobre su sintomatología/ la sintomatología de su familiar, para cada órgano o sistema afectado. Finalmente, se les ofrece consultar la información generada por la comunidad (gráficos y tablas comentadas por el equipo científico), así como tener acceso a un foro de comunicación con otros pacientes, familiares y/o especialistas en estos trastornos.

En el caso de los facultativos, son invitados a participar por los pacientes o sus familias. Una vez registrados, pueden cumplimentar varios formularios con información médica sobre dichos pacientes. Entre los beneficios para los médicos se encuentran: el tener acceso a capítulos científicos, bibliografía y documentos de interés sobre CDG; contar con un foro de comunicación directa con otros especialistas; y participar en publicaciones científicas en las que todos los médicos que hayan colaborado serán incluidos como autores (siguiendo el orden recomendado por el comité internacional de editores de revistas médicas, ICMJE: www.icmje.org/recommendations/browse/roles-and-responsibilities/defining-the-role-of-authors-and-contributors.html).

En este contexto, nuestro equipo desarrolló para “RareCommons”, 13 capítulos teóricos resumiendo las manifestaciones más relevantes de los CDG. Estos capítulos incluyeron:

- 1) Los CDG desde el punto de vista celular y molecular.
- 2) Los CDG, la sangre y las alteraciones de la coagulación.
- 3) Los CDG desde el punto de vista neurológico I.
- 4) Los CDG desde el punto de vista neurológico II.
- 5) Gastroenterología y hepatología en el síndrome CDG.
- 6) Problemas endocrinológicos y ginecológicos en el síndrome CDG.
- 7) Problemas renales en el síndrome CDG.
- 8) Problemas osteoarticulares en el síndrome CDG.
- 9) La cardiopatía en los CDG.
- 10) Manifestaciones oftalmológicas en los CDG.
- 11) Trastornos inmunológicos en los CDG.
- 12) Problemas de conducta y aprendizaje en los CDG.
- 13) La piel en los CDG.

Así mismo, para cada órgano o sistema, se desarrollaron 2 tipos de cuestionarios, uno para familias y otro para médicos (en total 24 cuestionarios). El cuestionario en formato para familias y para facultativos fue similar, aunque para los clínicos las preguntas sobre la historia fueron más detalladas (ej. se preguntó con mayor precisión la edad de aparición o características de cada signo/síntoma), técnicas (mayor uso de terminología médica), y complejas (incluyeron cuestiones sobre la exploración física y las pruebas complementarias realizadas).

A continuación, se adjunta el primer capítulo con información para padres: "Los CDG desde el punto de vista celular y molecular"; así como los cuestionarios para pacientes y médicos correspondientes a dicho capítulo.

El resto de capítulos y cuestionarios pueden encontrarse en www.rarecommons.org.

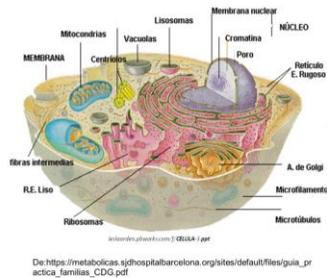
CAPÍTULO 1.

La PMM2-CDG desde el punto de vista celular y molecular.

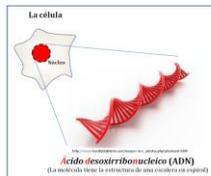
La célula y la glicosilación.

La **célula** es la unidad morfológica y funcional del ser vivo. Esta se compone de 3 partes fundamentales: la **membrana** que la recubre, el **núcleo** dónde se encuentra la mayor parte del ADN, y el **citoplasma**, un fluido que ocupa el espacio entre la membrana y el núcleo en cuyo interior residen las **organelas y estructuras celulares**. Las organelas y estructuras más importantes son las siguientes:

- **Reticulo endoplasmático:** Red de túbulos usada para la síntesis de moléculas complejas y otras reacciones bioquímicas.
- **Aparato de Golgi:** Orgánulo en donde se procesan las proteínas.
- **Lisosoma:** "Departamento" digestivo de la célula.
- **Microtúbulo:** Cilindros que mantienen y dan forma a la célula.
- **Mitocondria:** Responsable de dar la potencia o energía a la célula.
- **Ribosomas:** Orgánulos donde se forman las proteínas de acuerdo con las instrucciones del código genético.



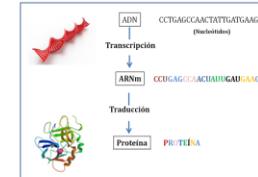
De: https://metabolicas.sjshospitalbarcelona.org/sites/default/files/guia_practica_familias_CDG.pdf



De: https://metabolicas.sjshospitalbarcelona.org/sites/default/files/guia_practica_familias_CDG.pdf

El **ADN** es la molécula que contiene la información necesaria para sintetizar proteínas. ADN significa ácido desoxirribonucleico y es una gran estructura formada por una larga secuencia de **nucleótidos** dispuestos en forma de doble hélice, donde los nucleótidos son como las letras contenidas en una enciclopedia. La secuencia de nucleótidos es la que determina el código genético, es decir, las instrucciones para sintetizar (formar) las proteínas.

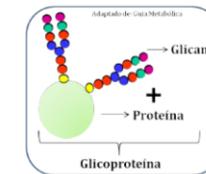
Las **proteínas** forman parte de las células y de los órganos con muy diversas funciones. Cada una está constituida por una cadena de moléculas más pequeñas, los **aminoácidos**. Las proteínas pueden tener diversas funciones dentro del organismo: puede ser un enzima, un transportador, una hormona, una proteína estructural o de membrana, etc... Las proteínas son la forma de expresión de nuestro código genético y son ellas las que se encargan de formar, modificar o eliminar a otras moléculas básicas del organismo: los azúcares (=hidratos de carbono) y las grasas (=lípidos).



De: https://metabolicas.sjshospitalbarcelona.org/sites/default/files/guia_practica_familias_CDG.pdf

Las **proteínas**, una vez formadas a partir de la información de nuestro ADN, necesitan ser **procesadas** para que funcionen adecuadamente. Ese procesamiento consiste fundamentalmente en reacciones químicas para cambiar su forma o añadirles otras moléculas, y tiene lugar en el citoplasma, el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi.

A algunas proteínas, durante su procesamiento se les añaden unas cadenas de azúcares, a modo de "antenas", llamadas **glicanos**. A las proteínas que tienen unidas una o varias cadenas de glicanos se les llama **glicoproteínas**. Estas "antenas" de glicanos actúan sobre todo como señales biológicas para la comunicación entre células, el plegamiento de otras proteínas o la unión a proteínas diana.



De: https://metabolicas.sjshospitalbarcelona.org/sites/default/files/guia_practica_familias_CDG.pdf

Las **glicoproteínas** tienen múltiples funciones en el organismo actuando como anticuerpos, hormonas, enzimas, factores de crecimiento, proteínas transportadoras, grupo sanguíneo, etc. Por ello, no es sorprendente que la alteración de la maquinaria de la glicosilación de lugar a enfermedades multisistémicas y muchas veces graves.

El ADN.

El **ADN** se encuentra dentro del núcleo celular y está organizado de diferentes formas. Por una parte, la información genética se encuentra agrupada en unas estructuras llamadas **cromosomas**. Los seres humanos tenemos 23 parejas de cromosomas, en total 46 cromosomas. De cada pareja de cromosomas, uno lo heredamos de nuestro padre y el otro de nuestra madre (por ej: tenemos dos cromosomas 15, uno heredado del padre y otro de la madre). Los cromosomas se dividen en 2 tipos, los autosomas, numerados del 1 al 22, y los cromosomas sexuales, X e Y. Así, un varón será 46 XY, y una mujer 46 XX.

Cada cromosoma contiene múltiples **genes**. Un gen es una porción del ADN que tiene la información necesaria para sintetizar una proteína. En el ser humano hay unos 20500 genes. El número de genes

en cada cromosoma varía, ya que hay cromosomas muy grandes (como el cromosoma 1, con 4222 genes) y otros más pequeños (como el cromosoma 21, con 582 genes).

En ocasiones los genes de una persona pueden estar alterados. Estas alteraciones pueden aparecer de forma espontánea (muchas veces durante la formación del embrión) o ser heredadas de los progenitores. Una de las formas más frecuentes de alteración genética son las **mutaciones**. Una mutación es un cambio estable en un gen (capaz de ser heredado), que causará una alteración en la síntesis de la proteína que codifica y que por tanto, modificará la función que esta proteína realiza.

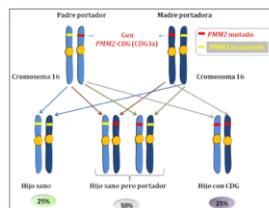
¿Qué ocurre en la PMM2-CDG?

La PMM2-CDG se debe a una mutación en el **gen PMM2**, localizado en el cromosoma 16. Este gen contiene la información para formar la proteína **fosfomanomutasa** (o PMM). La fosfomanomutasa se encarga de añadir la parte inicial de las "antenas" de glicanos a diferentes proteínas del organismo. Cuando hay una cantidad de fosfomanomutasa insuficiente en la célula o la fosfomanomutasa no funciona adecuadamente, no es capaz de glicosilar bien a varias proteínas y estas proteínas no pueden cumplir su función.

Estas proteínas alteradas participan sobre todo en el desarrollo del cerebro (especialmente del cerebelo), en la digestión y absorción de los alimentos a nivel gastrointestinal, en la retina, en el funcionamiento del hígado, en la coagulación sanguínea, en el sistema inmunológico, en la piel y en la formación de los huesos, entre otros.

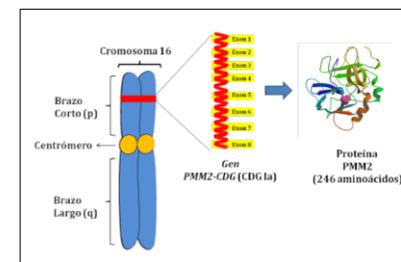
Esto da lugar a que los niños y adultos con PMM2-CDG puedan presentar desequilibrio, dificultades al hablar, problemas de aprendizaje, vómitos, diarrea, problemas de crecimiento, déficit visual, trombosis o hemorragias, infecciones frecuentes, acúmulos de grasa en zonas poco frecuentes, rasgos faciales característicos, etc.

La **PMM2-CDG** se hereda de forma **autosómica recesiva**. Esto significa que para que un niño exprese la enfermedad es necesario que herede 2 copias del gen PMM2 mutadas, una procedente de su padre y otra de su madre (es decir que ambos progenitores sean portadores de la enfermedad). También implica que el riesgo de que un hijo herede la PMM2-CDG es de un 25% en cada embarazo, siempre que ambos padres sean portadores.



De: https://metabolicas.sjhs hospitalbarcelona.org/sites/default/files/guia_practica_familias_CDG.pdf

En la actualidad existen 112 mutaciones diferentes que pueden causar la enfermedad. Esta gran variabilidad genética probablemente explica por qué 2 personas con PMM2-CDG no tienen los mismos síntomas, o que incluso existan casos de adultos con PMM2-CDG confirmada genéticamente completamente asintomáticos.



De: https://metabolicas.sjhs hospitalbarcelona.org/sites/default/files/guia_practica_familias_CDG.pdf

Resumen:

- * La célula es la **unidad morfológica y funcional del ser humano**. Sus **componentes** principales son: la **membrana**, el **citoplasma** y el **núcleo**.
- * El **ADN codifica** fundamentalmente **proteínas**.
- * Las **glicoproteínas** son aquellas **proteínas que tienen unidas cadenas de azúcares**. Éstas cumplen **múltiples funciones en el organismo**: anticuerpos, hormonas, enzimas, factores de crecimiento, etc.
- * En la **PMM2-CDG** algunas glicoproteínas no se sintetizan bien, dando **síntomas neurológicos, digestivos, oculares, hepáticos, sanguíneos**, etc.
- * La **PMM2-CDG** es una enfermedad genética que **se hereda** de forma **autosómica recesiva**.
- * Existen **muchas mutaciones** que **pueden producir** la **PMM2-CDG**, por ello los síntomas a veces son muy diferentes entre pacientes.

CUESTIONARIO MÉDICOS – ANTECEDENTES, CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS Y MOLECULARES

Paciente _____ Fecha: __/__/____ (DD/MM/AAAA)

EMBARAZO Y PARTO

- **Complicaciones durante el embarazo**

- Ninguna
 Infección de orina
 Otras infecciones Especificar: _____
 Serologías alteradas Especificar: _____
 SGB positivo
 Diabetes materna
 HTA materna
 Consumo de tabaco/drogas
 Alteraciones ecográficas Especificar: _____
 Fármacos Especificar: _____
 Otros _____

- **Parto:**

- Eutócico
 Cesárea Motivo: _____
 Distócico por otras causas Especificar: _____

- Edad gestacional _____ semanas
 - Apgar _____
 - Reanimación:
 Tipo _____ (I,II,III,IV o V)
 Motivo (si>II) _____

- **Datos antropométricos al nacimiento**

- a) Peso: _____ g
 b) Longitud: _____ cm
 c) Perímetro craneal: _____ cm

- **Problemas de prematuridad (< 37 semanas):**

- Ninguno
 Distrés respiratorio
 Displasia broncopulmonar
 Hemorragia periventricular
 Enterocolitis necrotizante
 Retinopatía
 Otros: _____

CUESTIONARIO MÉDICOS – ANTECEDENTES, CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS Y MOLECULARES

Paciente _____ Fecha: __/__/____ (DD/MM/AAAA)

PERIODO POSTNATAL INMEDIATO (hasta 28 días de vida)

- **Problemas postnatales:**

- No
 Hipotonía
 Hiporreflexia (Reflejos disminuidos)
 Dificultades de alimentación que precisaran sonda nasogástrica
 Enteropatía (diarrea)
 Reflujo gastroesofágico o vómitos
 Convulsiones
 Rasgos dismórficos
 Problemas renales
 Edemas/Ascitis/ Derrame Pleural Especificar: _____
 Derrame pericárdico
 Problemas osteoarticulares Especificar: _____
 Encefalopatía hipóxico-isquémica
 Ventilación mecánica (incluido CPAP)
 Ictericia que requirió fototerapia
 Sepsis neonatal
 Hipoglucemia
 Otros: _____

DATOS DEL DIAGNÓSTICO

- **Primer síntoma**

- Hipotonía
 Fallo de medro
 Hipotonía y fallo de medro
 Diarrea y/o vómitos Especificar: _____
 Fallo de medro y diarrea y/o vómitos Especificar: _____
 Estrabismo u otros prob. oculares Especificar: _____
 Retraso psicomotor
 Otros _____

- Edad primer síntoma _____ meses/años

- **Diagnóstico etiológico**

- Edad sospecha PMM2-CDG _____ meses/años
 - Edad diagnóstico definitivo PMM2-CDG _____ meses/años
 (estudios enzimáticos o genéticos)

CUESTIONARIO MÉDICOS – ANTECEDENTES, CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS Y MOLECULARES

Paciente _____ Fecha: __/__/____ (DD/MM/AAAA)

PRUEBAS GENÉTICAS Y BIOQUÍMICAS

- ¿En alguna ocasión se le ha solicitado al paciente un estudio genético? Sí/no/no sé

- Si la respuesta es sí, ¿Conoces los resultados? Detallar a continuación.

Nota: Los resultados de los estudios genéticos se pueden expresar de dos formas distintas:

• En formato ADN: ej. Madre: c.374G>A; Padre: c.784C>T.

• En formato proteína: ej. Madre: R132Q; Padre: Y46C.

Si es posible, detallar en ambos formatos.

- El resultado genético incluye información sobre el tipo de mutación (ej: mutación ya descrita, mutación nueva, disomía uniparental, etc.). Sí/no/ no sé (si se conoce, detallar).

- ¿Sabes si le ha realizado un estudio de actividad enzimática? Sí/no/no sé

- Si tiene un estudio de actividad enzimática, ¿cuál fue el porcentaje de actividad?, ¿se realizó en leucocitos o fibroblastos?.

- ¿Se le ha realizado en alguna ocasión una punción lumbar? Sí/no/no sé

- Si la respuesta es sí, ¿Cuáles fueron los resultados?.

ANTECEDENTES FAMILIARES

- ¿La madre presenta alguna enfermedad relevante?

- ¿Se le ha realizado estudio genético a la madre? ¿Cuál fue el resultado?

- No realizado
 Realizado, no portadora
 Realizado, portadora

CUESTIONARIO MÉDICOS – ANTECEDENTES, CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS Y MOLECULARES

Paciente _____ Fecha: __/__/____ (DD/MM/AAAA)

- ¿El padre presenta alguna enfermedad relevante?

- ¿Se le ha realizado estudio genético al padre? ¿Cuál fue el resultado?

- No realizado
 Realizado, no portador
 Realizado, portador

- Por favor, complete la siguiente tabla relacionada con diferente información referente a los hermanos/a de su hijo afectado por CDG-la

Nombre	Sexo	Fecha de nacimiento	Problemas médicos	Test ADN (No realizado / Si portador)

- ¿Hay algún otro antecedente familiar de interés? (ictus en menores de 35 años, epilepsia, dificultades de aprendizaje, síndromes genéticos, abortos de repetición, etc)

OTROS

Dejamos aquí un espacio para que podáis comentar, con la mayor extensión que podáis, otra alteraciones en las pruebas genéticas o enzimáticas, así como adjuntar las analíticas de las que dispongáis escaneadas (como imágenes) o en formato pdf.

CUESTIONARIO PADRES – ANTECEDENTES, CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS Y MOLECULARES

PRIMEROS SÍNTOMAS, EMBARAZO Y PARTO:

- ¿Cuál o cuales fueron los primeros síntomas? (hipotonía, escasa ganancia de peso, estrabismo, retraso psicomotor, vómitos y/o diarrea, etc.) Describir con detalle si es posible.
- ¿A qué edad aparecieron?
- ¿El embarazo fue normal? (detallar cualquier complicación, aunque sea leve, durante la gestación)
- ¿De cuántas semanas nació?
- ¿Cuánto pesó al nacer? (indicar en gramos)
- ¿Cuánto midió al nacer? (indicar en centímetros)
- ¿Cuánto midió su cabeza al nacer (su perímetro craneal o PC)? (indicar en centímetros)
- ¿Hubo alguna complicación durante el parto? (nalgas, cesárea, espátulas o fórceps, necesidad de reanimación, etc). Detallar.
- ¿Hubo alguna complicación durante el primer mes de vida? Detallar.

DATOS DEL DIAGNÓSTICO:

- ¿Con qué edad los médicos sospecharon una enfermedad en su hijo? (indique si su respuesta es en días o meses)

¿Con qué edad los médicos sospecharon del diagnóstico de Defecto Congénito de la Glicosilación Tipo Ia (o PMM2-CDG)? (Indicar si su respuesta es en días o meses)

¿Con qué edad se confirmó el diagnóstico de CDG-Ia (o PMM2-CDG) mediante estudios genéticos/enzimáticos? Detalle si su respuesta es en días o meses.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y GENÉTICAS:

- ¿En alguna ocasión se le ha solicitado al paciente un estudio genético? Sí/no/no sé
- Si la respuesta es sí, ¿Conoces los resultados? Detallar a continuación.
Nota: Los resultados de los estudios genéticos se pueden expresar de dos formas distintas:
 - En formato ADN: ej. Madre: c.374G>A; Padre: c.784C>T.
 - En formato proteína: ej. Madre: R132Q; Padre: Y46C.
- ¿Sabes si le ha realizado un estudio de actividad enzimática? Si/no/no sé
- Si tiene un estudio de actividad enzimática, ¿la actividad era normal o estaba disminuida?.
- ¿Se le ha realizado en alguna ocasión una punción lumbar? Sí/no/no sé
- Si la respuesta es sí, ¿Los resultados fueron normales o estaban alterados?.

ESTUDIOS FAMILIARES:

1.- Nombre de la madre:

Fecha de nacimiento:

Test de ADN: No, realizado / Realizado, no portadora / Realizado, sí portadora

¿Tiene algún síntoma? Si /NO

Por favor, detalle los síntomas:

2.- Nombre del **padre**:

Fecha de nacimiento:

Test de ADN: No, realizado / Realizado, no portadora / Realizado, sí portadora

¿Tiene algún síntoma? Si /NO

Por favor, complete la siguiente tabla relacionada con diferente información referente a los hermanos/a de su hijo afectado por CDG-la

Nombre	Sexo	Fecha de nacimiento	Problemas médicos	Test ADN (No realizado / Si portador)

¿Hay antecedentes de CDG-la en la familia o sospecha de ellos? SI /NO

En caso afirmativo, por favor detallad el parentesco:

¿Su caso ha aparecido en algún artículo médico, del cuál tengáis conocimiento? SI /NO

Si lo conocéis, detallad en qué publicación y con qué fecha de edición:

- ¿Hay algún otro antecedente familiar de interés? (ictus en menores de 35 años, epilepsia, dificultades de aprendizaje, síndromes genéticos, abortos de repetición, etc)

OTROS

Dejamos aquí un espacio para que podáis comentar, con la mayor extensión que podáis, otra alteraciones en las pruebas genéticas o enzimáticas, así como adjuntar las analíticas de las que dispongáis escaneadas (como imágenes) o en formato pdf.

7. Comunicaciones a Congresos.

Mercedes Serrano, Belén Pérez-Dueñas, Víctor De Diego, y el Consorcio Español en CDG.

7.1 - Evaluación Clínico-Radiológica de Pacientes Españoles con PMM2-CDG. V. De Diego, M. Serrano, M. O'Callaghan, A. García-Cazorla, P. Póo, J. Muchart, M. Molero-Ruíz, P. Briones, G.E. de Trabajo en CDG, B. Pérez-Dueñas. Presentación Oral. IX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Neurología Pediátrica (SENEP). Palma de Mallorca. 13 de junio de 2014. Ámbito de impacto: Nacional.

7.2 - Evaluación de la Población Española con PMM2-CDG. V. De Diego. Presentación Oral Beca. XXXVIII Reunión Anual de la Sociedad Española de Neurología Pediátrica (SENEP). Logroño. 22 de mayo 2015. Ámbito de impacto: Nacional.

7.3 - Phosphomannomutase Deficiency (PMM2-CDG): Assessment of Cerebellar Dysfunction through ICARS. V. De Diego, M. Serrano. Presentación Oral. 11th European Paediatric Neurology Society Congress. Viena. 27 de mayo 2015. Ámbito de impacto: Internacional.

7.4 – Investigación Abierta Colaborativa en PMM2-CDG a través de www.rarecommons.org. Nafría-Escalera B, De Diego Almarza V, Serrano M, Pérez-Dueñas B. Presentación Oral. XI Congreso Nacional de Errores Congénitos del Metabolismo. 15 de octubre de 2015. Ámbito de impacto: Nacional.

DISCUSIÓN

- ◆ *Características generales de la población española con PMM2-CDG.*
- ◆ *Descripción del desarrollo psicomotor en niños con PMM2-CDG.*
- ◆ *Validez y utilidad de la escala ICARS en pacientes con PMM2-CDG.*
- ◆ *Validez y utilidad de la volumetría y del diámetro relativo medio-sagital del vermis cerebeloso (MVRD) en la valoración de la atrofia cerebelosa en la PMM2-CDG.*
- ◆ *Evolución neurorradiológica de la PMM2-CDG.*
- ◆ *Evolución del síndrome cerebeloso en la PMM2-CDG.*
- ◆ *Desarrollo de protocolos de actuación en la PMM2-CDG.*
- ◆ *Consolidación de una red nacional de profesionales para los CDG y participación en “Euro-CDG”, como modelos de investigación en enfermedades minoritarias.*
- ◆ *“RareCommons” como plataforma on-line para la investigación colaborativa en enfermedades raras.*

Características generales de la población española con PMM2-CDG

La fosfomanomutasa 2 (PMM2) es una proteína de 246 aminoácidos codificada por el gen *PMM2*, el cual se encuentra en el cromosoma 16p13. Hasta la fecha se han descrito más de 100 mutaciones distintas, siendo la mayor parte mutaciones *missense* (Stenson *et al.* 2017). Los pacientes son en general, heterocigotos compuestos, es decir, portadores de 2 mutaciones distintas en cada uno de los alelos del gen *PMM2*. También existe un pequeño número de homocigotos puros. Probablemente debido a la gran diversidad de mutaciones, que a su vez produce una cantidad mucho mayor de posibles genotipos, y al número bajo de pacientes, no se han establecido aún claras relaciones genotipo-fenotipo para esta entidad (Altassan *et al.* 2019). Sin embargo, algunas mutaciones concretas sí han mostrado cierta asociación con una mayor o menor gravedad clínica (ej. la frecuente mutación R141H se considera incompatible con la vida en homocigosis) (Matthijs *et al.* 1998).

En nuestra serie, las mutaciones p.E93A, p.C241S y p.R162W se relacionaron con una menor puntuación en la escala ICARS y con menor atrofia cerebelosa en la RMN cerebral. De las tres, la mutación p.C241S se había vinculado previamente con un fenotipo leve en pacientes belgas, españoles e italianos (Matthijs *et al.* 1998, Barone *et al.* 2015), reforzando cierta evidencia en este sentido. Por otro lado, la mutación p.L32R había sido descrita como la más frecuente (hasta el 70% de casos) en una serie de pacientes italianos con fenotipo leve (Barone *et al.* 2015). Esta mutación se encontró únicamente en uno de nuestros enfermos, el cual presentó un fenotipo neurológico leve, con ICARS relativamente bajo (ICARS=17), alcanzando la marcha autónoma sobre los 2 años de edad, la carrera sobre los 2 años y medio, y siendo relativamente independiente para las actividades básicas de la vida diaria a los 7 años.

Por el contrario, los 5 pacientes portadores de las mutaciones p.P113L o p.E139K presentaron valores de ICARS elevados, todos por encima de 40 puntos. En concreto, el paciente homocigoto para P113L, mostró un ICARS de 70, el segundo más alto de la serie. Por otro lado, la paciente con el genotipo p.V129M/c.IVS3+2T>C mostró una clínica multisistémica grave falleciendo al mes de vida por taponamiento cardíaco. La mencionada mutación p.V129M se había asociado con anterioridad a mayor afectación clínica (Barone *et al.* 2015). Finalmente, la paciente con el genotipo p.T237M/c.640-9T>G tuvo una puntuación de 60 en la escala ICARS, mostrando un fenotipo neurológico moderado-severo. Esta variante p.T237M se había asociado en un caso anterior con un fenotipo grave, aunque multisistémico (Tayebi *et al.* 2002).

Aún cuando resulta difícil establecer asociaciones consistentes entre la clínica y los genotipos en la PMM2-CDG, más aún considerando que probablemente existen otros genes modulando la actividad enzimática final de la fosfomanomutasa (Bortot *et al.* 2013), la evidencia acumulada de ésta y otras series podría ayudar en el futuro a establecer correlaciones genotipo-fenotipo con impacto en el pronóstico o incluso en la elección del tratamiento óptimo para cada paciente.

Por otro lado, varias publicaciones durante la década de los 90 apuntaron hacia una aparente relación entre la actividad enzimática de la PMM2 y la afectación clínica, apreciando que dicha actividad oscilaba entre el 0% y el 10% para las formas más graves o clásicas/ multisistémicas (Van Schaftingen y Jaeken 1995, Carchon *et al.* 1999). Sin embargo, series posteriores han mostrado una baja asociación entre ambos parámetros, lo que por el momento, limita el valor pronóstico de esta prueba (Matthijs *et al.* 1999, Barone *et al.* 2015, Schiff *et al.* 2017). En el mismo sentido, en nuestros casos no encontramos grandes diferencias en la actividad enzimática entre los pacientes con fenotipo multisistémico y neurológico, así como tampoco una clara correlación entre el grado de afectación neurológica medida mediante ICARS y dicha actividad enzimática (ver **tabla 10**).

Existen varias referencias en la literatura que mencionan la sintomatología de debut en la PMM2-CDG (Funke *et al.* 2013, Monin *et al.* 2014, Barone *et al.* 2015). Dada la importancia clínica de reconocer los síntomas precoces de una enfermedad para orientar adecuada y rápidamente el diagnóstico, analizamos con algo más de detalle estos síntomas iniciales en nuestra cohorte. Resulta interesante que incluso los casos con un fenotipo más leve presentaron algún tipo de síntoma durante los primeros 9 meses de vida (ej. nuestro paciente más leve con un ICARS de 4 a los 15 años y prácticamente asintomático en el momento de la evaluación, presentó varios episodios de diarreas, elevación de transaminasas y 2 eventos de desviación tónica de la mirada durante los primeros meses de vida). Es más, sorprendentemente un 37% de nuestros enfermos debutaron exclusivamente con manifestaciones digestivas (vómitos, diarrea, fallo de medro, necesidad de nutrición mediante sonda nasogástrica). Esto difiere de lo descrito con anterioridad, donde en general se indica que, al comienzo, la sintomatología neurológica es una constante (hipotonía, estrabismo, retraso psicomotor) a la que en ocasiones se asocian problemas digestivos. Aunque es posible que en algunos de nuestros enfermos existiera leve hipotonía que pasara desapercibida, o que fuera considerada consecuencia de la malnutrición (Howell *et al.* 2006), en otros, los síntomas

gastrointestinales aparecieron inicialmente aislados antes de que el cuadro neurológico pudiera apreciarse. Esta observación refuerza nuestra recomendación de solicitar un estudio de isoformas de la transferrina a todos aquellos neonatos o lactantes con dificultades de alimentación, fallo de medro, o signos de malabsorción sin una causa evidente, incluso si no presentan síntomas neurológicos concomitantes inicialmente.

La mayor parte de los pacientes de la cohorte española presentó microcefalia, bien congénita o adquirida, siendo esto último lo más frecuente. Incluso aquellos que mantuvieron en su evolución un perímetro craneal dentro de la normalidad, mostraron tendencia al descenso de su percentil de PC durante el seguimiento. Si bien, las causas del limitado crecimiento craneal no están claras, su origen probablemente reside en el efecto que ejerce el déficit de la glicosilación sobre el crecimiento cerebral, no sólo en las neuronas del cerebelo si no también en aquellas supratentoriales. Este hecho explicaría la atrofia cortical cerebral, las lesiones de sustancia blanca y el retraso de la mielinización a nivel hemisférico que muestran algunos enfermos (Feraco *et al.* 2012, Schiff *et al.* 2017).

Hasta dónde conocemos, únicamente dos publicaciones previas han evaluado la evolución del peso y la talla en niños con PMM2-CDG (Kjaergaard *et al.* 2002, Witters *et al.* 2019). Sus conclusiones son similares a las nuestras, los niños con PMM2-CDG mayoritariamente nacen con una somatometría normal, pero presentan durante su etapa prepuberal una tendencia al estancamiento ponderal evolucionando hacia percentiles menores del p25, y en un porcentaje cercano al 50%, hacia una talla y peso bajos (<p5). Aunque los niveles de hormona del crecimiento que muestran son normales, sus niveles bajos en suero de IGF-1, IGBP3, y subunidad ácido-lábil (ALS) (De Zegher y Jaeken 1995, Pérez-Dueñas *et al.* 2009) parecen estar en el origen del fallo de medro.

Con respecto a la ataxia cerebelosa, aunque es bien sabido que es el síntoma más constante y característico de los pacientes con PMM2-CDG (Monin *et al.* 2014), las particularidades de esta manifestación no se habían analizado con detalle previamente. El uso, por primera vez en esta entidad, de una herramienta cuantitativa como ICARS, nos permitió un análisis pormenorizado de la ataxia. Curiosamente, aunque los estudios de neuroimagen y anatomopatológicos muestran que la afectación cerebelosa es sobre todo vermiana (Akaboshi *et al.* 1995, Antoun *et al.* 1999), nuestra comparación de los resultados de las subescalas del ICARS, puso de manifiesto un patrón de ataxia global. Es más, podría esperarse, dada la afectación preeminente de la línea media cerebelosa,

un mayor impacto sobre el mantenimiento de la postura con menor grado de disartria (Jafar-Nejad *et al.* 2018). En cambio, las funciones más dañadas fueron la marcha (más que la estática), el lenguaje expresivo (disartria) y los movimientos oculomotores. Es probable que las correlaciones clásicas anatómico-clínicas entre regiones del cerebelo y tipos de ataxia (ej. ataxia truncal en lesiones de vermis, ataxia cinética y de extremidades en lesiones de los hemisferios), sean adecuadas para pacientes adultos, pero no tanto en niños, especialmente si el daño cerebeloso se inicia en la etapa prenatal o los primeros meses de vida. El origen de estas diferencias podría encontrarse en fenómenos de plasticidad neuronal que reorganizan las funciones habituales de las regiones del cerebelo, alterando la correlación esperable entre estructura lesionada y expresión clínica.

Un resumen de la comparación entre las características neurológicas de los pacientes españoles y de las principales series publicadas queda reflejado en la **tabla 11**. En general, los resultados de nuestra cohorte son similares a los de las mencionadas publicaciones, a excepción de algunas particularidades que se comentan a continuación:

1.- Un porcentaje menor de entre nuestros pacientes consiguieron caminar sin ayuda (30%) con respecto a los del resto de series (40-45%). Aunque la diferencia no es muy marcada, es posible que se deba a que, la mayoría de los casos en los que dispusimos de información sobre la marcha (habitualmente mediante exploración directa) eran menores de 10 años. Teniendo en cuenta que algunos afectados pueden conseguir andar a edades más avanzadas (por ejemplo, una paciente de nuestro registro logró caminar con 13 años), la menor edad de nuestros enfermos puede haber infraestimado su capacidad para la deambulación autónoma.

2.- Nuestra serie y la de Barone *et al.* 2014, son las únicas que recogieron información sobre la frecuencia de crisis febriles (16% y 11%, respectivamente). Esta fue mayor que la de la población general, donde oscila entre el 2 y el 5% (Verity *et al.* 1985). La frecuencia de epilepsia fue del 9%, también mayor que la global en niños del 0.5%-1% (Aaberg *et al.* 2017), pero menor que la del resto de series (15-48%). En todo caso, la epilepsia no es una característica central en la PMM2-CDG y cuando aparece es leve y suele controlarse con un único fármaco antiepiléptico. La frecuencia de neuropatía periférica, que puede ser

Tabla 11. Comparación de las manifestaciones neurológicas, visuales y auditivas entre la cohorte española de pacientes con PMM2-CDG y otras series publicadas.

Características	Cohorte española*	Witters <i>et al.</i> 2019*	Schiff <i>et al.</i> 2017*	Barone <i>et al.</i> 2014*
Media de edad (años)	11	11	12	20
Microcefalia	4/12 (33%)	12/37 (32%)	N.D.	19/34 (56%)
Ataxia	15/15 (100%)	71/73 (97%)	58/60 (97%)	37/37 (100%)
Hipoplasia/ Atrofia cerebelosa	19/19 (100%)	N.D.	19/19 (100%)	19/19 (100%)
Marcha independiente ¹	6/20 (30%)	29/73 (40%)	22/49 (45%)	14/37 (38%)
Afectación cognitiva/ Problemas aprendizaje	14/17 (82%)	49/70 (70%) ²	89/96 (93%)	35/37 (95%)
Crisis febriles	3/19 (16%)	N.D.	N.D.	4/37 (11%)
Epilepsia	2/22 (9%)	15/75 (20%) ³	32/67 (48%)	5/34 (15%)
Episodios stroke-like	4/20 (20%)	5/75 (6,7%) ⁴	12/24 (50%)	8/32 (25%)
Neuropatía Axonal	6/16 (37%) 2/4 (50%)	39/70 (56%) N.D.	10/23 (43%) 3/10 (30%)	16/37 (43%) N.D.
Desmielinizante	2/4 (50%)	N.D.	7/10 (70%)	N.D.
Afectación visual ⁵	21/22 (95%)	69/74 (93%)	86/88 (98%)	25/36 (69%)
Afectación auditiva ⁶	2/7 (29%)	8/71 (11%)	7/27 (26%)	N.D.

* Excepto para la edad (expresada como edad media en años), el resto de cifras se refieren a: número de afectados/ número de pacientes con datos disponibles (porcentaje de afectados).
N.D.: información no disponible.

1. En la cohorte española únicamente se incluyeron los pacientes con edad \geq a 2 años. Para este ítem, en la serie de Witters *et al.* 2019 se utilizó la información aportada por la familia. En los casos de Schiff *et al.* 2017 sólo se computaron los pacientes que consiguieron caminar antes de los 10 años. En la serie de Barone *et al.* 2014, se contabilizaron los enfermos que podían caminar en el momento de la evaluación.

2. Información aportada por la familia sobre rendimiento académico en las 4 semanas previas.

3. Se refiere únicamente a la presencia o no de crisis epilépticas en los 6 meses previos.

4. No especifica claramente si el número total de pacientes con datos es 75, aunque parece indicarlo así (posible infraestimación del % de episodios stroke-like en esta serie).

5. La cohorte española, Witters *et al.* 2019, y Schiff *et al.* 2017 incluyen cualquier tipo de sintomatología oftalmológica (estrabismo, nistagmus, desviación tónica de la mirada, neuropatía, etc.). Barone *et al.* 2014 sólo contabiliza los pacientes con retinopatía y/o con alteraciones en el electroretinograma o potenciales evocados visuales (posible infraestimación del %).

6. La cohorte española, Schiff *et al.* 2017, y Barone *et al.* 2014 se refieren en general, a afectación auditiva comprobada por PEATC. En Witters *et al.* 2019 se utilizó la información sobre impresión subjetiva de audición aportada por la familia.

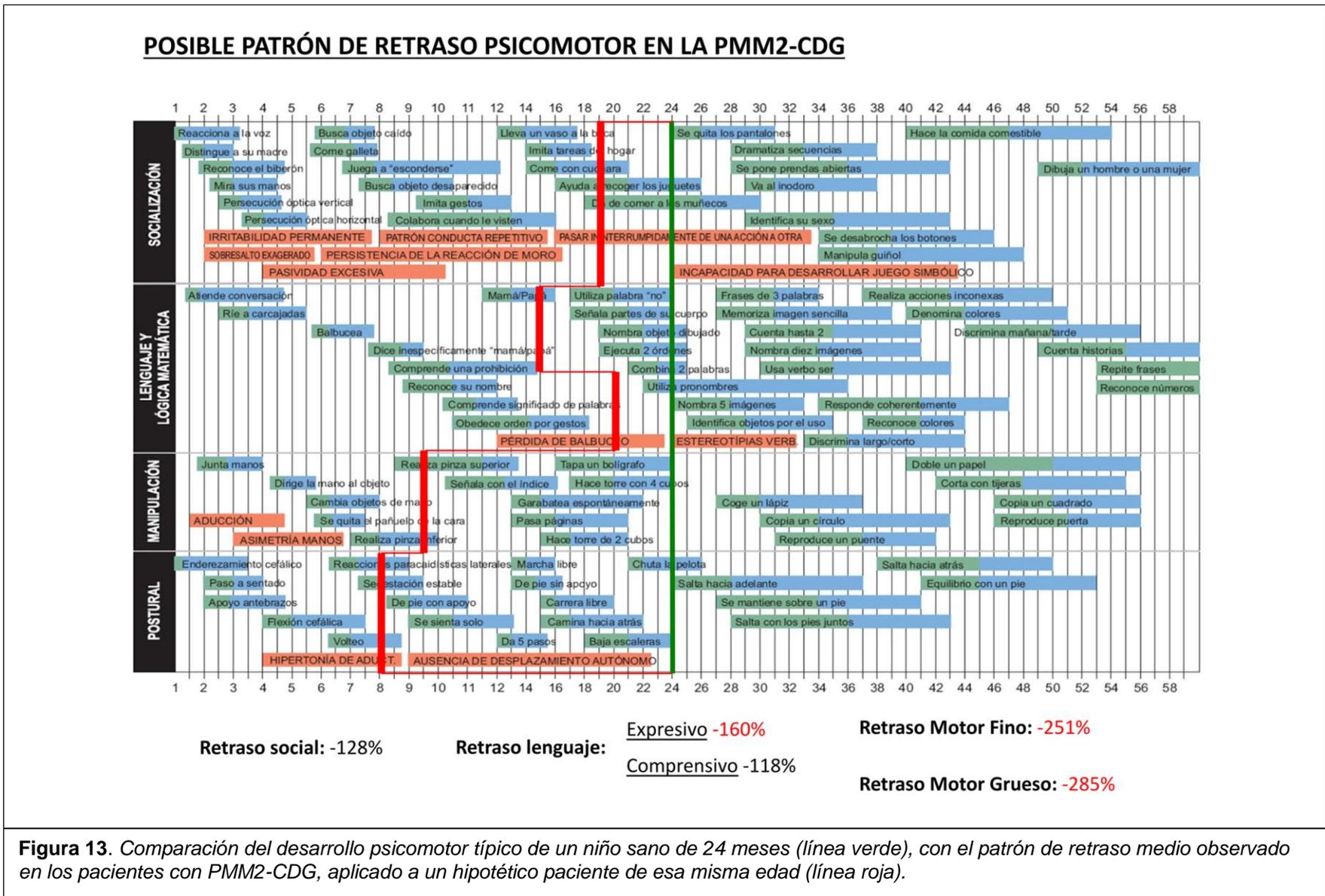
tanto axonal como desmielinizante, también parece ser algo menor con respecto a otras publicaciones (37.5%, frente a 43-56%). Una posible explicación de estas diferencias, residiría en la hipótesis de que los pacientes del sur de Europa son portadores de mutaciones causantes de fenotipos más leves de PMM2-CDG (Pérez *et al.* 2011). Nuestros datos parecen reforzar esta idea, pues al menos para estos síntomas, son más similares a la serie italiana (Barone *et al.* 2014) que a las centroeuropeas (Schiff *et al.* 2017, Witters *et al.* 2019).

3.- Finalmente, cabe mencionar la edad de aparición de los episodios *stroke-like* en la serie española. Estos eventos hasta ahora no se habían informado en adultos, por lo que se consideraban una manifestación exclusiva de los niños con PMM2-CDG (Monin *et al.* 2014). Sin embargo, en nuestra cohorte, una paciente sufrió episodios compatibles con cuadros *stroke-like* hasta los 32 años de edad. Este hallazgo ampliaría el espectro clínico de la entidad, poniendo de manifiesto la necesidad de que los médicos y las familias se mantengan atentos a la aparición de esta manifestación más allá de la adolescencia, y sea valorada individualmente la necesidad de iniciar o continuar tratamiento pasada la pubertad.

Descripción del desarrollo psicomotor en niños con PMM2-CDG

Aunque la presencia de retraso psicomotor se ha descrito en el 96% de más de 500 pacientes con PMM2-CDG repartidos en la literatura médica, las edades de adquisición de los hitos del desarrollo y su patrón de retraso psicomotor no se conocen bien (Altassan *et al.* 2019). Por ello, en nuestro estudio registramos el momento de aparición de los principales hitos del desarrollo, lo que permitió apreciar un patrón de retraso con afectación de más grave a más leve en las áreas: motora gruesa, motora fina, y lenguaje expresivo, respectivamente; mientras que el área social y el lenguaje comprensivo se mantuvieron en rango normal o casi normal.

A pesar de que su diseño retrospectivo implica potenciales sesgos, este es el primer estudio en el que se describe el patrón de retraso psicomotor (ver **figura 13**) en niños con PMM2-CDG. Conocer la evolución madurativa de los pacientes con esta entidad puede tener 2 aplicaciones fundamentales: 1) actuar como herramienta de diagnóstico precoz a edades en las que puede no haber síntomas específicos de ataxia; y 2) servir



de base para la elaboración de una escala de ataxia en lactantes y niños menores de 4 años.

En nuestra experiencia clínica, este patrón de neurodesarrollo pudo observarse en algunos niños desde los primeros meses de vida. Estar atento este tipo de retraso, especialmente si va acompañado de hipotonía, y relacionarlo con una posible ataxia de inicio precoz, puede resultar muy útil en lactantes. Esto es cierto sobretodo en aquellos niños sin síntomas específicos de lesión cerebelosa (ej. nistagmus, temblor intencional), bien porque su fenotipo no los incluye, bien porque su edad temprana no los ha puesto aún de manifiesto (ej. el temblor intencional raramente se observó antes de los 8 meses, edad a la que la mayoría de los pacientes intentaba alcanzar objetos con la mano). De esta manera, ante la presencia combinada de hipotonía y del patrón de retraso psicomotor descrito, recomendamos valorar la realización de estudios genéticos y/o metabólicos para el diagnóstico de formas precoces de ataxia, especialmente de un análisis de isoformas de la transferrina para descartar la PMM2-CDG.

Validez y utilidad de la escala ICARS en pacientes con PMM2-CDG

La escala ICARS está considerada una de las herramientas más completas para la valoración objetiva de la ataxia (Bürk y Sival 2018). Por este motivo, se ha utilizado con anterioridad en múltiples enfermedades en adultos (Cano *et al.* 2005, Schmitz-Hübsch *et al.* 2006) y en algunas patologías cerebelosas en niños (Nissenkorn *et al.* 2016, Bransma *et al.* 2017). En este trabajo, la escala ICARS fue validada por primera vez en pacientes con PMM2-CDG, demostrando que constituye un instrumento fiable para evaluar el grado de lesión cerebelosa en esta entidad. Inicialmente, sin embargo, se consideró utilizar otras escalas como BARS o SARA. Su uso se descartó por diferentes motivos. BARS tiene en cuenta únicamente 5 ítems (1 para marcha, 2 para funciones cinéticas, 1 para trastornos del habla, y 1 para trastornos oculomotores), lo que no permite caracterizar en detalle el tipo de ataxia en los enfermos. Por otro lado, la escala SARA no contempla las funciones oculomotoras. Aunque los movimientos oculares pueden afectar a la validez discriminatoria (por ej. al poder producirse también por afectación tronco-encefálica o por hipotonía) y a la consistencia interna de ICARS (por ser técnicamente más difíciles de medir por el clínico), constituyen una causa frecuente e importante de discapacidad en los pacientes con PMM2-CDG, y su exclusión podría haber afectado a la habilidad de la herramienta para evaluar la gravedad clínica de los mismos.

Una vez demostrada la fiabilidad de ICARS, decidimos compararla con el grado de atrofia del cerebelo. La atrofia cerebelosa es una de las características más constantes y precoces de la enfermedad (Altassan *et al.* 2019). Se detecta habitualmente al realizar una resonancia magnética cerebral en un neonato o lactante con síntomas neurológicos iniciales. Así, conocer si el grado de atrofia se correlacionaba con la gravedad de la ataxia medida con ICARS, era sustancial para concluir si dicha atrofia podía utilizarse como un marcador pronóstico de afectación neurológica en la PMM2-CDG, especialmente a edades tempranas cuando los signos de ataxia son menos prominentes. De ser así, una valoración rápida de la neuroimagen podría ayudar a estimar el estado neurológico futuro del paciente, sin perjuicio de una detallada exploración clínica y de su evolución individual. Sin embargo, no contábamos con un método sencillo, práctico y útil para determinar la afectación del cerebelo en una imagen bi-dimensional de RMN. Para ello, adaptamos una técnica utilizada en la medición ecográfica del cerebelo fetal (Imamoglu *et al.* 2013) con el objetivo de estimar la atrofia en nuestros pacientes. La medición resultante, el diámetro relativo medio-sagital del vermis cerebeloso (MVRD), mostró una buena correlación con la escala ICARS y fue sencilla y rápida de implementar por un clínico no entrenado, haciendo posible su uso incluso durante una consulta médica rutinaria.

En 2011, el grupo de Eva Morava en los Países Bajos, presentó la escala pediátrica de valoración de los CDG de Nijmegen (NPCRS) (Achouitar *et al.* 2011). Este método, basado en la escala pediátrica de enfermedad mitocondrial de Newcastle (NPMDS) (Phoenix *et al.* 2006), mide la afectación en diferentes órganos y sistemas en niños con defectos congénitos de la glicosilación. Lo hace a través de una serie de preguntas que se responden calificando la respuesta de 0 a 3 puntos, según si el grado de afectación es “normal”, “leve”, “moderado”, o “grave”. La escala, aunque constituye una buena herramienta de valoración general de los pacientes con CDG, tiene ciertas limitaciones en cuanto a su uso en la PMM2-CDG. En NPCRS más de la mitad de la puntuación (el 55% del total) corresponde a afectación extraneurológica, sin embargo, en la PMM2-CDG existen formas neurológicas puras o con mínima afectación multisistémica. Por otro lado, incluso en las formas “clásicas” de PMM2-CDG en las que la afectación de otros órganos y sistemas es mayor, estos síntomas extraneurológicos (como la afectación gastrointestinal, o la elevación de transaminasas) con frecuencia predominan en los primeros años de vida para mejorar drásticamente después (Schiff *et al.* 2017, Witters *et al.* 2019). Finalmente, en base a nuestra experiencia clínica, la mayor carga de discapacidad de estos pacientes parece ser debida al síndrome cerebeloso, el cual afecta a su capacidad para la estática, la marcha, el manejo adecuado de las manos

(alimentarse, escribir, etc.) y el habla. Por todo ello, consideramos que, en la PMM2-CDG, ICARS podía ser un reflejo más fiel de la afectación funcional y la gravedad de los pacientes, que NPCRS. Con este objetivo, evaluamos a los casos de nuestra cohorte con NPCRS e ICARS simultáneamente y después comparamos ambas puntuaciones. Encontramos que existía una buena correlación entre ambas escalas (cuánto mayores eran las puntuaciones en ICARS mayores eran también en NPCRS). Sin embargo, 3 de 4 pacientes con puntuaciones en ICARS mayores o iguales a 60 puntos (y gran nivel de dependencia y limitación para sus actividades) puntuaron en la categoría “leve-moderada” en NPCRS. Esto indica que NPCRS puede infraestimar la gravedad de los enfermos con PMM2-CDG, e ICARS parece ser un método más adecuado para evaluar su nivel de funcionalidad.

A pesar del escaso número de pacientes en los que contamos con un estudio de capacidad intelectual (WISC-IV-R o K-BIT), se observó una correlación negativa entre ICARS y CI (a mayor ICARS, menor CI), así como entre el MVRD y CI (a mayor atrofia, menor CI). Este hallazgo podría deberse a la implicación del cerebelo en funciones que previamente se consideraban puramente supratentoriales, en el contexto de un síndrome cognitivo-afectivo cerebeloso (Schmahmann y Sherman 1998), a la afectación directa supratentorial incluso en ausencia de alteraciones a ese nivel en la RMN cerebral, o a ambas cosas. En todo caso, futuras investigaciones podrían aclarar estos aspectos que van más allá de la enfermedad a estudio, y que implican una comprensión más profunda de la fisiología cerebral.

En resumen, la escala ICARS es un instrumento fiable para valorar la afectación cerebelosa en la PMM2-CDG, se correlaciona con la atrofia del cerebelo y la capacidad intelectual, y constituye un método más preciso para determinar la gravedad que NPCRS. Disponer de una herramienta de este tipo resulta imprescindible para evaluar la evolución natural de la ataxia a lo largo del tiempo, así como para medir el efecto de posibles tratamientos en futuros ensayos clínicos.

Validez y utilidad de la volumetría cerebelosa y del diámetro relativo medio-sagital del vermis cerebeloso (MVRD), en la valoración de la atrofia cerebelosa en la PMM2-CDG

En la PMM2-CDG se produce habitualmente una combinación de hipoplasia y atrofia del cerebelo. Es decir, la mayoría de los pacientes nacen con un cerebelo menos desarrollado de lo habitual, a lo que se suma una neurodegeneración cerebelosa variable durante los primeros años de vida (Feraco *et al.* 2012). Uno de nuestros objetivos era desarrollar un método radiológico sencillo con el que medir el grado de atrofia en niños y adultos con PMM2-CDG. Para ello, utilizamos una medida bidimensional, el MVRD, el cual relaciona de manera rápida la altura de la fosa posterior con respecto a la altura del vermis cerebeloso, en el plano medio-sagital de imágenes de RMN cerebral. Como se ha mencionado antes, previamente habíamos comparado el MVRD y el grado de ataxia medido con ICARS, observando que la gravedad de la ataxia y la atrofia del cerebelo se correlacionaban bien. Sin embargo, no habíamos comprobado si esta medida realmente evaluaba el grado de atrofia. Para ello, necesitábamos demostrar que era diferente en nuestros pacientes con respecto a niños y adolescentes sanos, y que se correlacionaba bien con el método de referencia para la valorar el volumen del cerebelo, la volumetría cerebelosa en imágenes de RMN cerebral (Mormina *et al.* 2017).

En niños sanos, el diámetro medio-sagital del vermis se mantuvo estable o aumentó ligeramente con la edad. Esto se explica por la naturaleza del MVRD, el cual refleja el porcentaje de la fosa posterior que ocupa el vermis cerebeloso, por lo que es previsible que el vermis cubra aproximadamente la misma proporción independientemente de la edad. Nuestra observación en niños y adolescentes sanos, es que el vermis abarca un 70-90% de la altura de la fosa posterior. La ligera tendencia al incremento apreciada en nuestra serie es posiblemente debida al escaso número de pacientes, pues estudios posteriores con mayor cantidad de niños sanos, han mostrado una estabilización de la altura del vermis a partir de los 3-4 años de edad (Jandeaux *et al.* 2019). En cambio, en enfermos con PMM2-CDG el MVRD se mantuvo entre el 30 y el 70%, con tendencia a ser menor en los pacientes de mayor edad. Esta diferencia en los resultados del MVRD entre sanos y pacientes con PMM2-CDG constituye la primera evidencia de que el MVRD es un método adecuado para valorar la atrofia del cerebelo en la PMM2-CDG.

La segunda evidencia al respecto que obtuvimos, se basó en la correlación entre el MVRD y la volumetría cerebelosa, considerada *gold standard* en el momento actual. El volumen cerebeloso fue significativamente menor en pacientes con respecto a los controles sanos, y mostró una tendencia a su descenso en los pacientes de mayor edad, tras excluir al paciente con el fenotipo más leve y con menor grado de atrofia, que se consideró un *outsider* o valor atípico. Probablemente, en una muestra mayor de

pacientes el efecto de estas formas leves habría quedado mitigado, al ser menos influyentes. Por otro lado, este hallazgo muestra la correlación entre grado de ataxia y grado de atrofia, pues el paciente con un volumen cerebeloso casi dentro de la normalidad también mostró el ICARS más bajo (4 puntos sobre 100, a los 15 años). Finalmente, el MVRD y el volumen cerebeloso evidenciaron una buena correlación, manifestando la fiabilidad del MVRD como método para evaluar la atrofia del cerebelo en la PMM2-CDG.

Evolución neurorradiológica de la PMM2-CDG

Según se ha postulado, en la PMM2-CDG el déficit del plegamiento proteico de varias glucoproteínas causaría un exceso de actividad del RE al tratar de compensar esta carencia aumentando las reacciones enzimáticas de glicosilación. Al ser las células de Purkinje y granulosas del cerebelo especialmente sensibles a la sobrecarga del RE, se lesionarían y morirían, produciendo en el cerebelo una hipoplasia prenatal y una hipotrofia-atrofia postnatal (Lecca *et al.* 1995, Sun *et al.* 2013). De esta manera, la hipotrofia-atrofia cerebelosa postnatal, podría utilizarse como un marcador evolutivo de la lesión neurológica en la PMM2-CDG.

A partir de esta hipótesis, cuantificamos por primera vez para esta entidad, la evolución de la atrofia del cerebelo, utilizando los datos de RMN cerebral de aquellos pacientes en los que dispusimos de más de un estudio de neuroimagen a diferente edad. El análisis mostró una deceleración de la atrofia del cerebelo a mayor edad. Es decir, según nuestros resultados, en la PMM2-CDG el cerebelo se atrofia más rápido en los pacientes más jóvenes. En concreto, encontramos que los enfermos de 10 años o menos presentaron una tasa de atrofia significativamente mayor (5.46% de pérdida de MVRD/año) que aquellos de 11 años o más (1.54% de pérdida de MVRD/año).

Esta información podría resultar de gran utilidad para evaluar el efecto de futuros tratamientos, especialmente de aquellas terapias dirigidas a revertir etiología de la entidad (ej. terapias genéticas). Así, un tratamiento que demostrase una ralentización, detención o incluso recuperación de la atrofia del cerebelo, sería un buen candidato a ser considerado como terapia curativa (aún recuperando el fenotipo de forma parcial). Más aún, nuestros datos señalan la existencia de una probable ventana terapéutica durante los primeros 10 años de edad, periodo durante el cual estos tratamientos serían más eficaces, y en quienes posiblemente deberían centrarse los ensayos clínicos que se desarrollen en los próximos años.

Evolución del síndrome cerebeloso en la PMM2-CDG

A pesar de que la PMM2-CDG es una entidad multisistémica, a largo plazo, son la sintomatología neurológica, y especialmente el síndrome cerebeloso, los que tienen una mayor influencia sobre el grado de discapacidad y la calidad de vida de los pacientes. Basándonos en nuestra experiencia clínica, la hipótesis inicial fue que, a pesar de la progresión de la atrofia, el síndrome cerebeloso se mantenía estable a lo largo del tiempo.

Con el objetivo de comprobar si esta observación era cierta, evaluamos a varios de nuestros pacientes con la escala ICARS en dos momentos distintos separados por una media de unos 2 años (26,3 meses). Los resultados mostraron que los pacientes mejoraban una media de 2,64 puntos en el ICARS al año, y esta mejoría era independiente de su edad y de su gravedad inicial.

Parece contradictorio el hecho de que una enfermedad neurodegenerativa, en la que además hay evidencia de progresión de la atrofia del cerebelo, muestre una mejoría de la ataxia con el tiempo. Sin embargo, creemos que diferentes factores pueden explicar este hecho. En primer lugar, la misma mejoría de la coordinación y del desarrollo psicomotor que se aprecia en niños sanos (Brandsma *et al.* 2014), probablemente tiene también un efecto compensatorio sobre la lesión neurológica en los pacientes con PMM2-CDG. En segundo lugar, la fisioterapia y los tratamientos de rehabilitación posiblemente resulten beneficiosos y contrarresten parcialmente la evolución natural de la entidad. Finalmente, es probable que diferentes fenómenos de plasticidad neuronal también contribuyan a mitigar el esperable deterioro neurológico.

Aunque actualmente no existen tratamientos específicos aprobados para la PMM2-CDG, desde los años 90, se han intentado diferentes estrategias terapéuticas en el ámbito experimental, con mayor o menor éxito.

Las terapias de suplementación nutricional fueron las primeras en ser probadas, incluso antes del descubrimiento del gen causal. Inicialmente, Panneerselvam y Freeze pusieron de manifiesto una remisión del patrón de hipoglicosilación *in vitro*, al añadir manosa a medios de cultivos de fibroblastos de pacientes con la enfermedad (Panneerselvam y Freeze 1996). Desgraciadamente, al administrar suplementos de manosa directamente a los pacientes, no se observó ninguna mejoría clínica ni bioquímica (Mayatepek *et al.* 1997, Mayatepek y Kohlmuller 1998, Kjaergaard *et al.*

1998). Una de las explicaciones más probables sobre la causa de esta falta de respuesta, es que la manosa sea incapaz de ser transportada a través de la membrana celular *in vivo*, y por tanto sea necesario favorecer este transporte para hacer efectiva la suplementación. En este sentido, se ha demostrado que la metformina puede inducir la absorción de manosa en células con mutaciones en el gen PMM2 mediante la activación de un sistema de transporte selectivo para este azúcar, lo cual corrige la maquinaria de la N-glicosilación celular (Shang y Lehrman 2004). Otro método en estudio para mejorar la absorción celular de manosa consiste en su administración en forma de compuestos hidrofóbicos (ej. liposomas) capaces de atravesar la membrana celular (Rutschow *et al.* 2002, Eklund *et al.* 2005). Algunos de estos compuestos han evidenciado ser eficaces *in vitro* (Eklund *et al.* 2005, Bortot *et al.* 2019) y se prevé que en un futuro cercano sean llevados a ensayos clínicos (<https://www.glycomine.com/>).

Además de la suplementación con manosa, otras dos líneas de investigación han ganado fuerza en los últimos años. Se trata de los tratamientos de potenciación de la actividad residual de la PMM2-CDG mediante chaperonas farmacológicas (Andreotti *et al.* 2014) y reguladores de la proteostasis. La base de estas terapias reside en que la mayoría de las mutaciones causantes de enfermedad son de tipo *missense* y dan lugar a una enzima defectuosa pero que aún mantiene cierta actividad catalítica. Esta función residual puede incrementarse mediante compuestos que mejoren el plegamiento de la proteína mutante (Andreotti *et al.* 2013, Yuste-Checa *et al.* 2015). Varias chaperonas farmacológicas con capacidad para mejorar el plegamiento de la PMM2 se han mostrado prometedoras en estudios de laboratorio (Yuste-Checa *et al.* 2017, Monticelli *et al.* 2019). De forma similar, los reguladores de la proteostasis (moléculas encargadas de mantener el equilibrio en el plegamiento, transporte y degradación de las proteínas intracelulares) también pueden utilizarse para mejorar el plegamiento de enzimas mutadas (Mu *et al.* 2008). Recientemente, un regulador proteico (el celastrol) ha demostrado mejorar la concentración y actividad de la fosfomanomutasa en fibroblastos derivados de pacientes con PMM2-CDG (Vilas *et al.* 2020).

También se ha investigado la posibilidad de tratamiento genético con oligonucleótidos antisentido en ciertas mutaciones causantes de un defecto del *splicing* en el RNA mensajero derivado del gen PMM2 mutado. Aunque este tratamiento sólo sería efectivo para un pequeño grupo de pacientes, parece ser también eficaz *in vitro* (Vega *et al.* 2009).

Por último, recientemente se ha realizado un ensayo clínico con acetazolamida vía oral en pacientes con PMM2-CDG. La acetazolamida es un inhibidor de la anhidrasa carbónica utilizado como diurético. Se cree que reduce el pH intracelular, disminuyendo la conductancia del potasio en la membrana neuronal e inactivando los canales de calcio Cav2.1, cuya función podría estar potenciada en la PMM2-CDG debido a una N-glicosilación deficiente de los mismos (Bain *et al.* 1992). En el ensayo clínico mencionado, el fármaco fue bien tolerado y demostró una mejoría estadísticamente significativa tanto de la ataxia cerebelosa como de algunos parámetros cognitivos (Martínez-Monseny, Bolasell *et al.* 2019). En concreto, los pacientes mostraron una mejoría de media de ICARS de 6,2 puntos en 6 meses, a diferencia de lo observado en nuestro estudio en la que los afectados mejoraron su ICARS sin tratamiento, una media de 1,3 puntos en 6 meses.

Para poder valorar el efecto de un fármaco candidato a tratamiento curativo (aún parcialmente) es esencial establecer puntos sólidos y cuantificables con respecto a la historia natural de la enfermedad a tratar. Debido al escaso número de pacientes que presentan enfermedades minoritarias, esta descripción detallada de su evolución resulta compleja, aunque se ha conseguido en otros casos como, por ejemplo, en la enfermedad de Duchenne (Bello *et al.* 2016).

El trabajo de investigación que presentamos cumple en parte este cometido, al ser el primer estudio que cuantifica la evolución del cuadro cerebeloso en la PMM2-CDG. Aún cuando se requieren investigaciones más completas sobre la progresión natural neurológica y multisistémica de la PMM2-CDG, los datos que aportamos ya han contribuido a demostrar los beneficios iniciales de la acetazolamida en esta entidad y esperamos puedan ser de utilidad en alguna de las restantes terapias en desarrollo.

Desarrollo de protocolos de actuación en la PMM2-CDG

A principios de 2015 se habían descrito más de 70 defectos congénitos de la glicosilación distintos. Sin embargo, la secuencia de pruebas óptimas para diagnosticarlos era poco conocida entre los clínicos y con frecuencia se limitaba al concepto de que “si se sospecha un CDG, debe solicitarse un estudio de isoformas de la transferrina”. Esta idea, aunque totalmente válida para muchos defectos de la N-glicosilación y algunos defectos combinados de la N y O-glicosilación, dejaba fuera alrededor 50% de los CDGs (que tienen un perfil de transferrina normal), así como

tampoco profundizaba en las implicaciones diagnósticas de encontrar un perfil de tipo 1 o de tipo 2.

A pesar de que las rutas diagnósticas correctas eran más o menos conocidas y utilizadas por los especialistas de laboratorio, su difusión entre los clínicos era escasa, lo cual derivaba en ocasiones en un infradiagnóstico de estos trastornos (por ej. al descartar un CDG con síntomas compatibles cuando el perfil de sialotransferrina era normal, o no solicitar un estudio de APOC-III al encontrar un perfil de tipo 2). Según nuestro conocimiento, el protocolo diagnóstico en defectos congénitos de la glicosilación que desarrollamos, fue uno de los primeros orientado a facultativos y el primero en lengua castellana que integraba de forma práctica aspectos clínicos y de laboratorio.

Por otro lado, una de las principales preocupaciones de los pacientes, sus familiares y los especialistas, es el manejo de las alteraciones de la coagulación y el subsecuente riesgo de sangrado, trombosis y episodios *stroke-like*, que manifiestan los niños y adultos con PMM2-CDG. Esta inquietud a menudo se acrecienta cuando deben someterse a intervenciones quirúrgicas o a encamamientos prolongados al ingresar en el hospital (lo cual no es infrecuente). Sin embargo, en el momento de la redacción del protocolo para el manejo de los trastornos de la coagulación (febrero de 2015), y aún hoy, no existían ni existen guías oficiales publicadas para el tratamiento de estas complicaciones.

Con el objetivo de cubrir esta necesidad, se amplió, actualizó y adaptó el documento de actuación en trastornos hematológicos en la PMM2-CDG, del Hospital Necker-Enfants Malades de Paris. Hasta dónde conocemos, el protocolo que presentamos es el único disponible en lengua castellana para la prevención y manejo de las trombosis, hemorragias, y episodios *stroke-like*, en niños y adultos con PMM2-CDG.

Ambos protocolos fueron distribuidos a través del consorcio español en CDG, con la finalidad de tener un impacto positivo sobre la calidad de vida de los pacientes nacionales con este grupo de entidades.

Consolidación de una red nacional de profesionales para los CDG y participación en “Euro-CDG”, como modelos de investigación en enfermedades minoritarias

Los defectos congénitos de la glicosilación, con una prevalencia total estimada de 1/10.000, son considerados enfermedades raras, y por ello, comparten los retos inherentes a este tipo de entidades con frecuencias tan bajas.

Por un lado, suponen un desafío para los pacientes y sus familiares, los cuales suelen sufrir retrasos diagnósticos, tener dificultades para encontrar un médico especializado, y no disponer de tratamientos específicos. Por otro lado, constituyen un reto para los clínicos, para quienes es complicado atender a un número suficiente de enfermos para ganar la necesaria experiencia, disponer de información científica fiable, y contactar con otros colegas interesados en estas patologías. Finalmente, son una dura prueba para los investigadores, debido a lo arduo que resulta reunir cohortes suficientemente grandes y conseguir financiación para proyectos científicos relacionados.

A inicios de 2013, los pacientes, médicos e investigadores en trastornos congénitos de la glicosilación debían hacer frente a muchos de estos retos. Los pacientes eran atendidos en múltiples centros hospitalarios repartidos por todo el territorio del país, y no existía una estructura clínico-científica única que vinculara a los casos o a los profesionales que les trataban, y que permitiese avanzar en el conocimiento sobre la enfermedad.

Los únicos, pero importantes, nexos de unión existentes en ese momento, eran la asociación española en síndrome CDGs (AESCDG), que aglutinaba a una parte de los pacientes con trastornos congénitos de la glicosilación en España, y los centros de diagnóstico de Madrid y Barcelona (el Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares de la Universidad Autónoma de Madrid y el Institut de Bioquímica Clínica del Hospital Clínic de Barcelona), dónde se realizaban prácticamente todos los diagnósticos enzimáticos y genéticos de confirmación de los casos sospechosos de CDG en nuestro país.

Gracias a esa información inicial y a los esfuerzos y colaboración posteriores de los profesionales implicados, se pudo consolidar el Consorcio Español en CDG, bajo la coordinación de especialistas del Servicio de Neuropediatría del Hospital Sant Joan de Déu.

El consorcio continúa en vigor a día de hoy y como consecuencia de ello ha mejorado la divulgación de novedades en CDG entre los especialistas implicados, se han desarrollado protocolos clínicos, y se han realizado diversas publicaciones científicas

(además de las presentadas en esta tesis doctoral) incluyendo la ya mencionada prometedora terapia farmacológica para la ataxia cerebelosa en la PMM2-CDG (Itzep *et al.* 2018, Martínez-Monseny, Cuadras, *et al.* 2019, Martínez-Monseny, Bolasell *et al.* 2019).

Sin embargo, aunque el establecimiento de una red nacional en CDG era un paso necesario, el bajo número de casos hace que sea, en parte, insuficiente. Para superar esta limitación, nuestro equipo se integró como colaborador en la red EURO-CDG, un proyecto de colaboración a nivel europeo en defectos congénitos de la glicosilación que forma parte de la iniciativa de investigación en enfermedades raras de la Comisión Europea, E-Rare. Gracias a ello, los especialistas españoles nos hemos mantenido actualizados sobre los avances europeos en CDG, diversos autores internacionales han colaborado en las investigaciones del consorcio español, y se han establecido las bases para futuros registros de pacientes o ensayos clínicos europeos que incluyan a los afectados en nuestro territorio.

“RareCommons” como plataforma *on-line* para la investigación colaborativa en enfermedades raras

La creación de redes clínico-científicas nacionales e internacionales resulta fundamental para progresar en el conocimiento de las enfermedades minoritarias, pero tiene, sin embargo, algunas limitaciones.

A los profesionales que tratan a estos pacientes (ej. neurólogos o neuropediatras generales) les resulta difícil acudir a todas las ponencias o reuniones sobre CDG o disponer del tiempo necesario para estar al día sobre los últimos avances. Algo similar ocurre con los pacientes, quienes habitualmente no tienen a su alcance información fiable y adaptada sobre su enfermedad.

Por otro lado, a pesar de que herramientas como el correo-electrónico, facilitan remitir y enviar información clínica o para la investigación (ej. cuestionarios sobre sintomatología o pruebas complementarias), resulta mucho más sencillo y rápido disponer de una plataforma *on-line* dedicada dónde introducir directamente estos datos evitando pasos intermedios (impresión de cuestionarios, escaneado de los mismos, etc.), y que además permita volcarlos automáticamente a hojas de cálculo o programas estadísticos.

Finalmente, algunos pacientes no tienen la posibilidad (por motivos económicos o personales diversos) de desplazarse hasta el centro de referencia nacional para la enfermedad que padecen y poder realizar sus consultas directamente a los especialistas en estos raros trastornos.

La plataforma “RareCommons” intenta solventar estos problemas utilizando la metodología de los “*crowdsourced health research studies*”. Este término en inglés hace referencia a una forma de investigación que consiste en la unión de dos tendencias contemporáneas: el “*crowdsourcing*” o uso de tecnologías basadas en internet para reclutar pacientes en proyectos científicos, y la “medicina 2.0” o la participación activa de los individuos en su salud utilizando las herramientas de la web 2.0 (ej. redes sociales, blogs, podcasts, wikis, vídeo, etc.).

De esta manera “RareCommons” ofrece información fidedigna a los pacientes sobre los CDG, permite intercambiar experiencias y conocimientos entre pacientes y médicos a través de foros dedicados (un foro para pacientes y otro profesional), posibilita a los enfermos hacer preguntas directas a los especialistas del Hospital Sant Joan de Déu utilizando la plataforma, y facilita enormemente la recogida de información para estudios científicos.

Herramientas como estas serán sin duda empleadas cada vez más en investigación biomédica y ofrecen nuevas posibilidades para acelerar el conocimiento en patologías minoritarias.

The image shows the homepage of the Rare Commons website, which is a platform for rare diseases research and patient support. The page is organized into several key sections:

- Header:** Includes the logo for Hospital Sant Joan de Déu (SJD) and the 'Rare Commons' logo. It features the tagline 'Compartir para avanzar' and a user count of 'Ya somos 993 usuarios'. There are buttons for '¡ÚNETE!' and 'ACCEDER', and language selection options for ES, EN, FR, and IT.
- Navigation Menu:** A dark bar with white text containing links for 'INVESTIGACIÓN EN ENFERMEADES RARAS', 'FAMILIAS', 'CLÍNICOS', 'INFORMACIÓN', and 'RESULTADOS'.
- Noticias (News):** A section titled 'Noticias' with a 'más noticias' link. It contains two news items:
 - Pautas para afrontar el duelo en la infancia y la adolescencia en el contexto de pandemia por la COVID-19** (06/05/2020): A short article about coping with grief during the COVID-19 pandemic.
 - Crean un nuevo modelo de nematodo para estudiar la adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma** (23/03/2020): A news item about a new nematode model for studying adrenoleukodystrophy.
- ÚNETE (Join Us):** A section titled 'ÚNETE' with the subtext 'Estamos investigando Defectos congénitos de la glicosidosis'. It features a prominent 'RELLENA EL FORMULARIO' button.
- Inicio de sesión (Login):** A light blue section for user login, including fields for 'Nombre de usuario' and 'Contraseña', and buttons for 'INICIAR SESIÓN', 'Crear nueva cuenta', and 'Solicitar una nueva contraseña'.
- EQUIPO CIENTÍFICO (Scientific Team):** A blue-tinted tile with a molecular structure image, stating 'Un proyecto coordinado por el Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona.'
- FAMILIAS (Families):** A light blue tile with a family icon and the text 'FAMILIAS Vosotros hacéis posible la investigación.'
- CLÍNICOS (Clinicians):** A light blue tile with a stethoscope icon and the text 'CLÍNICOS Trabajamos juntos para conocer más y atender mejor.'
- Resultados (Results):** A dark blue tile titled 'Resultados' with a bar chart icon. It highlights 'PMM2-CDG' and states 'El cerebelo es la principal estructura neurológica afectada en PMM2-CDG.' It includes a 'ver todos' link.
- CONTACTA y sugiere una enfermedad (Contact and suggest a disease):** A light blue tile with an '@' icon and a call to action.
- ¡AYÚDANOS! (Help us!):** A light blue tile with a heart icon and a call to action.

Figura 14. Imagen de la página web: www.rarecommons.org

CONCLUSIONES

- La escala ICARS es una herramienta fiable para valorar el síndrome cerebeloso en niños de más de 4 años con PMM2-CDG, se correlaciona con la atrofia del cerebelo y con la capacidad intelectual, y evalúa la gravedad de forma más precisa que la escala utilizada hasta ahora, NPCRS.
- El diámetro relativo medio-sagital del vermis (MVRD) constituye un método eficaz, sencillo y rápido para medir el grado de atrofia cerebelosa en la PMM2-CDG, el cual además puede ser utilizado durante la consulta médica.
- En los pacientes con PMM2-CDG existe una atrofia progresiva del cerebelo, especialmente durante los primeros 10 años de edad. Futuros tratamientos deberán aplicarse precozmente durante la primera década de la vida antes de que progrese la atrofia y las secuelas neurológicas sean irreversibles.
- Con los cuidados y tratamientos actuales, el síndrome cerebeloso en la PMM2-CDG mejora ligeramente con el tiempo, en concreto ICARS desciende una media de 2,64 puntos al año. Esta información resultará de vital importancia para la evaluación de la eficacia de las terapias modificadoras de la historia natural que se desarrollen en los próximos años.
- En la nuestra cohorte de pacientes con PMM2-CDG, las mutaciones p.E93A, p.C241S, p.R162W y p.L32R se relacionaron con un fenotipo leve, mientras que las mutaciones p.P113L, p.E139K, p.V129M y p.T237M se asociaron con manifestaciones más graves de la enfermedad.
- El desarrollo de protocolos, la creación del Consorcio Español en CDG, la participación en “Euro-CDG” y la implementación de “RareCommons” como plataforma *online* de investigación colaborativa, han establecido las bases en nuestro país para mejorar el manejo, avanzar en el conocimiento, y acelerar el desarrollo de tratamientos curativos, para los defectos congénitos de la glicosilación.

BIBLIOGRAFÍA

A

1. -. Aaberg KM, Gunnes N, Bakken IJ, et al. Incidence and Prevalence of Childhood Epilepsy: A Nationwide Cohort Study. *Pediatrics* 2017; 139 (5): e20163908.
2. -. Abu Bakar N, Lefeber DJ, van Scherpenzeel M. Clinical glycomics for the diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *J Inherit Metab Dis* 2018; 41 (3): 499-513.
3. -. Achouitar S, Mohamed M, Gardeitchik T, et al. Nijmegen paediatric CDG rating scale: a novel tool to assess disease progression. *J Inherit Metab Dis* 2011; 34 (4): 923-927.
4. -. Aebi M, Hennet T. Congenital disorders of glycosylation: genetic models systems lead the way. *Trends Cell Biol* 2001; 11: 136-141.
5. -. Akaboshi S, Ohno K, Takeshita K. Neuroradiological findings in the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *Neuroradiology* 1995; 37 (6): 491-495.
6. -. Almeida A, Layton M, Karadimitris A. Inherited glycosylphosphatidyl inositol deficiency: a treatable CDG. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792: 874-80.
7. -. Almeida AM, Murakami Y, Baker A, et al. Targeted therapy for inherited GPI deficiency. *N Engl J Med* 2007; 356: 1641-7.
8. -. Altassan R, Péanne R, Jaeken J, et al. International clinical guidelines for the management of phosphomannomutase 2-congenital disorders of glycosylation: Diagnosis, treatment and follow up. *J Inherit Metab Dis* 2019; 42 (1): 5-28.
9. -. Altassan R, Witters P, Saifudeen Z, et al. Renal involvement in PMM2-CDG, a mini-review. *Mol Genet Metab* 2018; 123 (3): 292-296.
10. -. Allen G, Buxton RB, Wong EC, Courchesne E. Attentional activation of the cerebellum independent of motor involvement. *Science* 1997; 275 (5308): 1940-3.
11. -. Andreotti G, Cabeza de Vaca I, Poziello A, Monti MC, Guallar V, Cubellis MV. Conformational response to ligand binding in phosphomannomutase2: insights into inborn glycosylation disorder. *J Biol Chem* 2014; 289 (50): 34900-34910.
12. -. Andreotti G, Pedone E, Giordano A, Cubellis MV. Biochemical phenotype of a common disease-causing mutation and a possible therapeutic approach for the phosphomannomutase 2-associated disorder of glycosylation. *Mol Genet Genomic Med* 2013; 1 (1): 32-44.
13. -. Antoun H, Villeneuve N, Gelot A, Panisset S, Adamsbaum C. Cerebellar atrophy: an important feature of carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type 1. *Pediatr Radiol* 1999; 29 (3): 194-198.
14. -. Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1473(1): 4-8.
15. -. Armengol JA. Centros y vías nerviosas II. Médula espinal, tronco del encéfalo y cerebelo. In: Delgado García JM, Ferrús A, Mora F, Rubia F, eds. *Manual de neurociencia*. Ed. Síntesis 1998. p. 380-92.
16. -. Aronica E, van Kempen AA, van der Heide M, Poll-The BT, van Slooten HJ, Troost D, Rozemuller-Kwakkel JM. Congenital disorder of glycosylation type Ia: a clinicopathological report of a newborn infant with cerebellar pathology. *Acta Neuropathol* 2005 Apr; 109 (4): 433-42.

B

17. -. Bain PG, O'Brien MD, Keevil SF, Porter DA. Familial periodic cerebellar ataxia: a problem of cerebellar intracellular pH homeostasis. *Ann Neurol* 1992; 31 (2): 147–154.
18. -. Barkovich AJ, Millen KJ, Dobyns WB. A developmental classification of malformations of the brainstem. *Ann Neurol* 2007; 62 (6): 625–639.
19. -. Barone R, Carrozzi M, Parini R, et al. A nationwide survey of PMM2-CDG in Italy: high frequency of a mild neurological variant associated with the L32R mutation. *J Neurol* 2015; 262 (1): 154–164.
20. -. Barone R, Fiumara A, Jaeken J. Congenital disorders of glycosylation with emphasis on cerebellar involvement. *Semin Neurol* 2014; 34 (3): 357–366.
21. -. Barone R, Sturiale L, Fiumara A, Uziel G, Garozzo D, Jaeken J. Borderline mental development in a congenital disorder of glycosylation (CDG) type Ia patient with multisystemic involvement (intermediate phenotype). *J Inherit Metab Dis* 2007; 30 (1): 107.
22. -. Barone R, Sturiale L, Sofia V, et al. Clinical phenotype correlates to glycoprotein phenotype in a sib pair with CDG-Ia. *Am J Med Genet A* 2008; 146A (16): 2103–2108.
23. -. Bastaki F, Bizzari S, Hamici S, et al. Single-center experience of N-linked Congenital Disorders of Glycosylation with a Summary of Molecularly Characterized Cases in Arabs. *Ann Hum Genet* 2018; 82 (1): 35–47.
24. -. Bello L, Morgenroth LP, Gordish-Dressman H, et al. DMD genotypes and loss of ambulation in the CINRG Duchenne Natural History Study. *Neurology* 2016; 87 (4): 401–409.
25. -. Bernard JA, Leopold DR, Calhoun VD, Mittal VA. Regional cerebellar volume and cognitive function from adolescence to late middle age. *Hum Brain Mapp* 2015; 36 (3): 1102–1120.
26. -. Bertozzi CR, Rabuka D. Structural Basis of Glycan Diversity. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., eds. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2009. p. 23-36.
27. -. Birnholz JC. Newborn cerebellar size. *Pediatrics* 1982; 70 (2): 284–287.
28. -. Bjursell C, Wahlström J, Berg K, et al. Detailed mapping of the phosphomannomutase 2 (PMM2) gene and mutation detection enable improved analysis for Scandinavian CDG type I families. *Eur J Hum Genet* 1998; 6 (6): 603–611.
29. -. Blank C, Smith LA, Hammer DA, Fehrenbach M, Delisser HM, Perez E, Sullivan KE. Recurrent infections and immunological dysfunction in congenital disorder of glycosylation Ia (CDG Ia). *J Inherit Metab Dis* 2006 Aug; 29 (4): 592.
30. -. Böhles H, Sewell AA, Gebhardt B, Reinecke-Lüthge A, Klöppel G, Marquardt T. Hyperinsulinaemic hypoglycaemia--leading symptom in a patient with congenital disorder of glycosylation Ia (phosphomannomutase deficiency). *J Inherit Metab Dis* 2001; 24 (8): 858–862.
31. -. Bortot B, Cosentini D, Faletra F, Biffi S, De Martino E, Carrozzi M, Severini GM. PMM2-CDG: phenotype and genotype in four affected family members. *Gene* 2013; 531 (2): 506-9.
32. -. Bortot B, De Martino E, Tesser A, et al. In vitro treatment of congenital disorder of glycosylation type Ia using PLGA nanoparticles loaded with GDP-Man. *Int J Mol Med* 2019; 44 (1): 262–272.
33. -. Brain Development Cooperative Group. Total and regional brain volumes in a population-based normative sample from 4 to 18 years: the NIH MRI Study of Normal Brain Development. *Cereb Cortex* 2012; 22 (1): 1–12.
34. -. Brandsma R, Lawerman TF, Kuiper MJ, Lunsing RJ, Burger H, Sival DA. Reliability and discriminant validity of ataxia rating scales in early onset ataxia. *Dev Med Child Neurol* 2017; 59 (4): 427-432.

35. -. Brandsma R, Spits AH, Kuiper MJ, Lunsing RJ, Burger H, Kremer HP, Sival DA. Childhood Ataxia and Cerebellar Group. Ataxia rating scales are age-dependent in healthy children. *Dev Med Child Neurol* 2014; 56 (6): 556-63.
36. -. Brandsma R, Verschuuren-Bemelmans CC, Amrom D, et al. A clinical diagnostic algorithm for early onset cerebellar ataxia. *Eur J Paediatr Neurol* 2019; pii:S1090-3798(19)30027-3.
37. -. Brasil S, Pascoal C, Francisco R, et al. CDG Therapies: From Bench to Bedside. *Int J Mol Sci* 2018; 19 (5).
38. -. Brewer JB. Fully-automated volumetric MRI with normative ranges: translation to clinical practice. *Behav Neurol* 2009; 21 (1): 21–28.
39. -. Briones P, Vilaseca MA, Schollen E, et al. Biochemical and molecular studies in 26 Spanish patients with congenital disorder of glycosylation type Ia. *J Inherit Metab Dis* 2002; 25 (8): 635–646.
40. -. Broussard AC, Boyce M. Life is sweet: the cell biology of glycoconjugates. *Mol Biol Cell* 2019; 30(5): 525-529.
41. -. Bürk K, Sival DA. Scales for the clinical evaluation of cerebellar disorders. *Handb Clin Neurol* 2018; 154: 329-339.

C

42. -. Calandrelli R, D'Apolito G, Marco P, Zampino G, Tartaglione T, Colosimo C. Costello syndrome: Analysis of the posterior cranial fossa in children with posterior fossa crowding. *Neuroradiol J* 2015; 28 (3): 254–258.
43. -. Calandrelli R, Panfili M, D'Apolito G, et al. Quantitative approach to the posterior cranial fossa and craniocervical junction in asymptomatic children with achondroplasia. *Neuroradiology* 2017; 59 (10): 1031–1041.
44. -. Cano SJ, Hobart JC, Hart PE, Korlipara LV, Schapira AH, Cooper JM. International Cooperative Ataxia Rating Scale (ICARS): appropriate for studies of Friedreich's ataxia?. *Mov Disord* 2005; 20 (12): 1585–1591.
45. -. Carchon H, Van Schaftingen E, Matthijs G, Jaeken J. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type IA (phosphomannomutase-deficiency). *Biochim Biophys Acta* 1999; 1455 (2-3): 155–165.
46. -. Casado M, O'Callaghan MM, Montero R, et al. Mild clinical and biochemical phenotype in two patients with PMM2-CDG (congenital disorder of glycosylation Ia). *Cerebellum* 2012; 11 (2): 557–563.
47. -. Casey CA, Bhat G, Holzapfel MS, Petrosyan A. Study of Ethanol-Induced Golgi Disorganization Reveals the Potential Mechanism of Alcohol-Impaired N-Glycosylation. *Alcohol Clin Exp Res*. 2016; 40(12): 2573-2590.
48. -. Chang IJ, He M, Lam CT. Congenital disorders of glycosylation. *Ann Transl Med*. 2018; 6 (24): 477.
49. -. Chen J, Li X, Edmondson A, et al. Increased Clinical Sensitivity and Specificity of Plasma Protein N-Glycan Profiling for Diagnosing Congenital Disorders of Glycosylation by Use of Flow Injection-Electrospray Ionization-Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clin Chem* 2019; 65 (5): 653-663.
50. -. Chio A, Orsi L, Mortara P, Schiffer D. Early onset cerebellar ataxia with retained tendon reflexes: prevalence and gene frequency in an Italian population. *Clin Genet* 1993; 43: 207–11.
51. -. Choi R, Woo HI, Choe BH, et al. Application of whole exome sequencing to a rare inherited metabolic disease with neurological and gastrointestinal manifestations: a congenital disorder of glycosylation mimicking glycogen storage disease. *Clin Chim Acta* 2015; 444: 50–53.
52. -. Clayton PT, Winchester BG, Keir G. Hypertrophic obstructive cardiomyopathy in a neonate with the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *J Inherit Metab Dis* 1992; 15 (6): 857–861.

53. -. Colomé C, Ferrer I, Artuch R, Vilaseca MA, Pineda M, Briones P. Personal experience with the application of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) assays to the detection of congenital disorders of glycosylation. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38 (10): 965–969.
54. -. Coman D, Irving M, Kannu P, Jaeken J, Savarirayan R. The skeletal manifestations of the congenital disorders of glycosylation. *Clin Genet* 2008; 73 (6): 507–515.
55. -. Coman D, McGill J, MacDonald R, et al. Congenital disorder of glycosylation type 1a: three siblings with a mild neurological phenotype. *J Clin Neurosci* 2007; 14 (7): 668–672.
56. -. Crick F. Central dogma of molecular biology. *Nature* 1970; 227: 561-563.

D

57. -. Delgado MR, Albright AL. Movement disorders in children: definitions, classifications, and grading systems. *J Child Neurol.* 2003; 18 (Supplement 1): S1-8.
58. -. de la Morena-Barrio ME, Sevivas TS, Martinez-Martinez I, et al. Congenital disorder of glycosylation (PMM2-CDG) in a patient with antithrombin deficiency and severe thrombophilia. *J Thromb Haemost* 2012; 10 (12): 2625–2627.
59. -. de Lonlay P, Seta N. The clinical spectrum of phosphomannose isomerase deficiency, with an evaluation of mannose treatment for CDG-Ib. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792 (9): 841-3.
60. -. de Lonlay P, Seta N, Barrot S, et al. A broad spectrum of clinical presentations in congenital disorders of glycosylation I: a series of 26 cases. *J Med Genet* 2001; 38 (1): 14–19.
61. -. de Zegher F, Jaeken J. Endocrinology of the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1 from birth through adolescence. *Pediatr Res* 1995; 37 (4 Pt 1): 395–401.
62. -. Diedrichsen J. A spatially unbiased atlas template of the human cerebellum. *Neuroimage* 2006; 33 (1): 127–138.
63. -. Drouin-Garraud V, Belgrand M, Grünewald S, et al. Neurological presentation of a congenital disorder of glycosylation CDG-Ia: implications for diagnosis and genetic counseling. *Am J Med Genet* 2001; 101 (1): 46–49.

E

64. -. Edwards M, McKenzie F, O'callaghan S, et al. Prenatal diagnosis of congenital disorder of glycosylation type Ia (CDG-Ia) by cordocentesis and transferrin isoelectric focussing of serum of a 27-week fetus with non-immune hydrops. *Prenat Diagn* 2006; 26 (10): 985–988.
65. -. Eklund EA, Merbouh N, Ichikawa M, et al. Hydrophobic Man-1-P derivatives correct abnormal glycosylation in Type I congenital disorder of glycosylation fibroblasts. *Glycobiology* 2005;15 (11): 1084-93.
66. -. Etzioni A, Tonetti M. Fucose supplementation in leukocyte adhesion deficiency type II. *Blood* 2000; 95: 3641-3.
67. -. European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) Guideline Group on POI, Webber L, Davies M, et al. ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency. *Hum Reprod* 2016; 31 (5): 926–937.
68. -. Everest-Dass AV, Moh ESX, Ashwood C, Shathili AMM, Packer NH. Human disease glycomics: technology advances enabling protein glycosylation analysis – part 1. *Expert Rev Proteomics* 2018; 15(2): 165-182.

F

69. -. Feraco P, Mirabelli-Badenier M, Severino M, Alpigiani MG, Di Rocco M, Biancheri R, Rossi A. The shrunken, bright cerebellum: a characteristic MRI finding in congenital disorders of glycosylation type 1a. *AJNR Am J Neuroradiol* 2012 Dec; 33 (11): 2062-7.
70. -. Fernández, E. Escala Haizea-Llevant. Tabla de desarrollo de 0 a 5 años. Vitoria: Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco, 1991.
71. -. Fischl B, Salat DH, Busa E, et al. Whole brain segmentation: automated labeling of neuroanatomical structures in the human brain. *Neuron* 2002 Jan 31; 33 (3): 341-55.
72. -. Fiumara A, Barone R, Nigro F, Sorge G, Pavone L. Familial Dandy-Walker variant in CDG syndrome. *Am J Med Genet* 1996; 63 (2): 412–413.
73. -. Fletcher JM, Matthijs G, Jaeken J, Van Schaftingen E, Nelson PV. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome: beyond the screen. *J Inherit Metab Dis* 2000; 23 (4): 396-8.
74. -. Forssberg H, Nashner LM. Ontogenetic development of postural control in man: adaptation to altered support and visual conditions during stance. *J Neurosci* 1982; 2: 545–52.
75. -. Francisco R, Marques-da-Silva D, Brasil S, Pascoal C, Dos Reis Ferreira V, Morava E, Jaeken J. The challenge of CDG diagnosis. *Mol Genet Metab*. 2019; 126 (1): 1-5.
76. -. Freeze HH, Chong JX, Bamshad MJ, Ng BG. Solving glycosylation disorders: fundamental approaches reveal complicated pathways. *Am J Hum Genet* 2014; 94 (2): 161-75.
77. -. Freeze HH, Kinoshita T, Schnaar RL. Genetic Disorders of Glycan Degradation. 2017. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., eds. *Essentials of Glycobiology* [Internet]. 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press 2015-2017. Chapter 44.
78. -. Funke S, Gardeitchik T, Kouwenberg D, et al. Perinatal and early infantile symptoms in congenital disorders of glycosylation. *Am J Med Genet A* 2013; 161A (3): 578–584.
79. -. Fuster MM, Esko JD. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* 2005; 5 (7): 526-42.

G

80. -. García-López R, de la Morena-Barrio ME, Alsina L, et al. Natural Killer Cell Receptors and Cytotoxic Activity in Phosphomannomutase 2 Deficiency (PMM2-CDG). *PLoS One* 2016; 11 (7): e0158863.
81. -. Garel C. Fetal cerebral biometry: normal parenchymal findings and ventricular size. *Eur Radiol* 2005; 15 (4): 809–813.
82. -. Garel C. Methodology (chap. 3). In: Garel C, ed. *MRI of the fetal brain. Normal development and cerebral pathologies*. Springer 2004. p. 13–33.
83. -. Ghez C, Thach WT. Chapter 42. Cerebellum. In: Kandel E, Schwartz J, Jessell TM, eds. *Principles of Neural Sciences*, 4th edition. Ed. McGraw Hill 2000. p. 832–50.
84. -. Gilfix BM. Congenital disorders of glycosylation and the challenge of rare diseases. *Hum Mutat*. 2019; 40 (8): 1010-1012.
85. -. Gilman S. Primate models of postural disorders. *Adv Neurol* 1975; 10 :55-76.
86. -. Giurgea I, Michel A, Le Merrer M, Seta N, de Lonlay P. Underdiagnosis of mild congenital disorders of glycosylation type 1a. *Pediatr Neurol* 2005; 32 (2): 121–123.
87. -. Gravel P, Walzer C, Aubry C, Balant LP, Yersin B, Hochstrasser DF, Guimon J. New alterations of serum glycoproteins in alcoholic and cirrhotic patients

revealed by high resolution two-dimensional gel electrophoresis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 220 (1): 78-85.

88. -. Grünewald S, Schollen E, Van Schaftingen E, Jaeken J, Matthijs G. High residual activity of PMM2 in patients' fibroblasts: possible pitfall in the diagnosis of CDG-Ia (phosphomannomutase deficiency). *Am J Hum Genet* 2001; 68 (2): 347–354.

H

89. -. Haeuptle MA, Hennet T. Congenital disorders of glycosylation: an update on defects affecting the biosynthesis of dolichol-linked oligosaccharides. *Hum Mutat* 2009; 30 (12): 1628-41.
90. -. Hahn SH, Minnich SJ, O'Brien JF. Stabilization of hypoglycosylation in a patient with congenital disorder of glycosylation type Ia. *J Inherit Metab Dis* 2006; 29 (1): 235–237.
91. -. Haines DE, Patrick GW, Satrulle P. Organization of cerebellar corticonuclear fiber systems. *Exp Brain Res Suppl* 1982; 6: 320–371.
92. -. Hansson GC. Role of mucus layers in gut infection and inflammation. *Curr Opin Microbiol.* 2012; 15 (1): 57-62.
93. -. Hara D, Maki F, Tanaka S, Sasaki R, Hasegawa Y. MRI-based cerebellar volume measurements correlate with the International Cooperative Ataxia Rating Scale score in patients with spinocerebellar degeneration or multiple system atrophy. *Cerebellum Ataxias* 2016; 3:14.
94. -. Harding AE. Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet* 1983; i: 1151–5.
95. -. Hardré R, Khaled A, Willemetz A, Dupré T, Moore S, Gravier-Pelletier C, Le Merrer Y. Mono, di and tri-mannopyranosyl phosphates as mannose-1-phosphate prodrugs for potential CDG-Ia therapy. *Bioorg Med Chem Lett* 2007; 17 (1): 152-5.
96. -. Hartley H, Pizer B, Lane S, Sneade C, Pratt R, Bishop A, Kumar R. Inter-rater reliability and validity of two ataxia rating scales in children with brain tumours. *Childs Nerv Syst* 2015; 31 (5): 693-7.
97. -. Holzbach U, Hanefeld F, Helms G, Hänicke W, Frahm J. Localized proton magnetic resonance spectroscopy of cerebral abnormalities in children with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *Acta Paediatr* 1995; 84 (7): 781–786.
98. -. Horslen SP, Clayton PT, Harding BN, Hall NA, Keir G, Winchester B. Olivopontocerebellar atrophy of neonatal onset and disialotransferrin developmental deficiency syndrome. *Arch Dis Child* 1991; 66 (9): 1027–1032.
99. -. Howell RR, Byrne B, Darras BT, Kishnani P, Nicolino M, van der Ploeg A. Diagnostic challenges for Pompe disease: an under-recognized cause of floppy baby syndrome. *Genet Med* 2006; 8(5): 289–296.
100. -. Huang CC, Liu CC. The differences in growth of cerebellar vermis between appropriate-for-gestational-age and small-for-gestational-age newborns. *Early Hum Dev* 1993; 33 (1): 9–19.
101. -. Huang IC, Li W, Sui J, Marasco W, Choe H, Farzan M. Influenza A virus neuraminidase limits viral superinfection. *J Virol.* 2008; 82 (10): 4834-43.

I

102. -. Imamoglu EY, Gursoy T, Ovali F, Hayran M, Karatekin G. Nomograms of cerebellar vermis height and transverse cerebellar diameter in appropriate-for-gestational-age neonates. *Early Hum Dev* 2013; 89 (12): 919–923.

103. -. Itzep D, Martínez-Monseny AF, Bolasell M, et al. Clinical Assessment of Dysarthria in Children with Cerebellar Syndrome Associated with PMM2-CDG. *Neuropediatrics* 2018; 49 (6): 408-413.
104. -. Izquierdo-Serra M, Martínez-Monseny AF, López L, et al. Stroke-Like Episodes and Cerebellar Syndrome in Phosphomannomutase Deficiency (PMM2-CDG): Evidence for Hypoglycosylation-Driven Channelopathy. *Int J Mol Sci* 2018; 19 (2): 619.

J

105. -. Jaeken J. Congenital disorders of glycosylation (CDG): it's (nearly) all in it! *J Inherit Metab Dis.* 2011; 34 (4): 853-8.
106. -. Jaeken J. Congenital disorders of glycosylation. *Handb Clin Neurol* 2013; 113: 1737-43.
107. -. Jaeken J, Carchon H. Congenital disorders of glycosylation: the rapidly growing tip of the iceberg. *Curr Opin Neurol* 2001; 14 (6): 811–815.
108. -. Jaeken J, Hennet T, Matthijs G, Freeze HH. CDG nomenclature: time for a change! *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1792 (9): 825-6.
109. -. Jaeken J, Matthijs G. Congenital disorders of glycosylation: a rapidly expanding disease family. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2007; 8: 261-78.
110. -. Jaeken J, Matthijs G. Congenital disorders of glycosylation. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2001; 2: 129-51.
111. -. Jaeken J, Péanne R. What is new in CDG?. *J Inherit Metab Dis.* 2017; 40 (4): 569-586.
112. -. Jaeken J, Pirard M, Adamowicz M, Pronicka E, van Schaftingen E. Inhibition of phosphomannose isomerase by fructose 1-phosphate: an explanation for defective N-glycosylation in hereditary fructose intolerance. *Pediatr Res* 1996 ;40 (5): 764-6.
113. -. Jaeken J, Schachter H, Carchon H, De Cock P, Coddeville B, Spik G. Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type II: a deficiency in Golgi localised N-acetyl glucosaminyltransferase II. *Arch Dis Child.* 1994; 71 (2): 123-7.
114. -. Jaeken, J, Vanderschueren-Lodeweyckx M, Casaer P, et al. Familial psychomotor retardation with markedly fluctuating serum proteins, FSH and GH levels, partial TBG deficiency, increased serum arylsulphatase A and increased CSF protein: a new syndrome? *Pediatr. Res* 1980. 14: 179.
115. -. Jaeken J, van Eijk HG, van der Heul C, Corbeel L, Eeckels R, Eggermont E. Sialic acid-deficient serum and cerebrospinal fluid transferrin in a newly recognized genetic syndrome. *Clin Chim Acta.* 1984; 144 (2-3): 245-7.
116. -. Jafar-Nejad P, Maricich SM, Zoghbi HY. The cerebellum and the hereditary ataxias. In: Swaiman KF, Ashwal S, Ferriero DM, et al., eds. *Swaiman's Pediatric Neurology*. 6th edition. Ed. Elsevier 2018. p. 689-700.
117. -. Jandeaux C, Kuchcinski G, Ternynck C, Riquet A, Leclerc X, Pruvo JP, Soto-Ares G. Biometry of the Cerebellar Vermis and Brain Stem in Children: MR Imaging Reference Data from Measurements in 718 Children. *AJNR Am J Neuroradiol* 2019; 40 (11): 1835–1841.
118. -. Jansen JC, Cirak S, van Scherpenzeel M, et al. CCDC115 Deficiency Causes a Disorder of Golgi Homeostasis with Abnormal Protein Glycosylation. *Am J Hum Genet.* 2016; 98 (2): 310-21.
119. -. Janssen MC, de Kleine RH, van den Berg AP, Heijdra Y, van Scherpenzeel M, Lefeber DJ, Morava E. Successful liver transplantation and long-term follow-up in a patient with MPI-CDG. *Pediatrics* 2014; 134(1): e279-83.
120. -. Joshi C, Kolbe DL, Mansilla MA, et al. Ketogenic diet - A novel treatment for early epileptic encephalopathy due to PIGA deficiency. *Brain Dev* 2016; 38: 848-51.

K

121. -. Kearon C, Akl EA, Ornelas J, et al. Antithrombotic Therapy for VTE Disease: CHEST Guideline and Expert Panel Report. *Chest* 2016; 149 (2): 315–352.
122. -. Kjaergaard S, Kristiansson B, Stibler H, Freeze HH, Schwartz M, Martinsson T, Skovby F. Failure of short-term mannose therapy of patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1A. *Acta Paediatr* 1998; 87 (8): 884-8.
123. -. Kjaergaard S, Müller J, Skovby F. Prepubertal growth in congenital disorder of glycosylation type Ia (CDG-Ia). *Arch Dis Child* 2002; 87 (4): 324–327.
124. -. Kjaergaard S, Schwartz M, Skovby F. Congenital disorder of glycosylation type Ia (CDG-Ia): phenotypic spectrum of the R141H/F119L genotype. *Arch Dis Child* 2001; 85 (3): 236–239.
125. -. Klcovansky J, Mørkrid L, Möller T. Heart transplantation in a child with congenital disorder of glycosylation. *J Heart Lung Transplant* 2016; 35 (8): 1048-9.
126. -. Korneliussen HK. Cerebellar organization in the light of cerebellar nuclear morphology and cerebellar corticogenesis. In: Llinás R, ed. *Neurobiology of Cerebellar Evolution and Development*. Ed. American Medical Association 1969. p. 515–523.
127. -. Kristiansson B, Borulf S, Conradi N, Erlanson-Albertsson C, Ryd W, Stibler H. Intestinal, pancreatic and hepatic involvement in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998 Jul; 27 (1): 23-9.
128. -. Kuki I, Takahashi Y, Okazaki S, et al. Vitamin B6-responsive epilepsy due to inherited GPI deficiency. *Neurology* 2015; 81 (16): 1467-9.
129. -. Kusa J, Pyrkosz A, Skiba A, Szkutnik M. Cardiac manifestations of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *Pediatr Cardiol* 2003; 24 (5): 493–494.

L

130. -. Lai K, Langley SD, Khwaja FW, Schmitt EW, Elsas LJ. GALT deficiency causes UDP-hexose deficit in human galactosemic cells. *Glycobiology* 2003; 13 (4): 285-94.
131. -. Lam C, Ferreira C, Krasnewich D, et al. Prospective phenotyping of NGLY1-CDDG, the first congenital disorder of deglycosylation. *Genet Med* 2017;19 (2): 160-168.
132. -. Lange N, Travers BG, Bigler ED, et al. Longitudinal volumetric brain changes in autism spectrum disorder ages 6-35 years. *Autism Res* 2015; 8 (1): 82–93.
133. -. Larsell O. *The comparative anatomy and histology of the cerebellum*. Ed. University of Minnesota Press 1951.
134. -. Lawerman TF, Brandsma R, Burger H, Burgerhof JGM, Sival DA. Age-related reference values for the pediatric Scale for Assessment and Rating of Ataxia: a multicentre study. *Dev Med Child Neurol* 2017a; 59 (10): 1077-1082.
135. -. Lawerman TF, Brandsma R, van Geffen JT, et al. Reliability of phenotypic early-onset ataxia assessment: a pilot study. *Dev Med Child Neurol* 2016; 58 (1): 70-6.
136. -. Lawerman TF, Brandsma R, Verbeek RJ, van der Hoeven JH, Lunsing RJ, Kremer HPH, Sival DA. Construct Validity and Reliability of the SARA Gait and Posture Sub-scale in Early Onset Ataxia. *Front Hum Neurosci* 2017b; 11: 605.
137. -. Lecca MR, Wagner U, Patrignani A, Berger EG, Hennet T. Genome-wide analysis of the unfolded protein response in fibroblasts from congenital disorders of glycosylation type-I patients. *FASEB J* 2005; 19 (2): 240–242.
138. -. Lefeber DJ, Morava E, Jaeken J. How to find and diagnose a CDG due to defective N-glycosylation. *J Inherit Metab Dis* 2011; 34 (4): 849-52.

139. -. Leijser LM, Srinivasan L, Rutherford MA, Counsell SJ, Allsop JM, Cowan FM. Structural linear measurements in the newborn brain: accuracy of cranial ultrasound compared to MRI. *Pediatr Radiol* 2007; 37 (7): 640–648.
140. -. Leiner HC, Leiner AL, Dow RS. The human cerebro-cerebellar system: its computing, cognitive, and language skills. *Behav Brain Res* 1991; 44 (2): 113-28.
141. -. Lindberg Bonne N, Evald L, Hansen JK. A case of the cerebellar cognitive affective syndrome in a 12-year-old boy with acute post-infectious cerebellar ataxia. *Eur J Paediatr Neurol* 2016; 20 (3): 480-2.
142. -. Live D, Wells L, Boons GJ. Dissecting the molecular basis of the role of the O-mannosylation pathway in disease: α -dystroglycan and forms of muscular dystrophy. *Chembiochem*. 2013; 14 (18): 2392-402.
143. -. Loeber RT, Cintron CM, Yurgelun-Todd DA. Morphometry of individual cerebellar lobules in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2001; 158 (6): 952–954.
144. -. Luft AR, Skalej M, Schulz JB, et al. Patterns of age-related shrinkage in cerebellum and brainstem observed in vivo using three-dimensional MRI volumetry. *Cereb Cortex* 1999; 9 (7): 712–721.

LL

145. -. Llinás R, Sotelo C. *The Cerebellum Revisited*. Ed. Springer-Verlag 1992.

M

146. -. Macauley MS, Crocker PR, Paulson JC. Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. *Nat Rev Immunol*. 2014; 14 (10): 653-66.
147. -. MacGillivray RT, Mendez E, Shewale JG, Sinha SK, Lineback-Zins J, Brew K. The primary structure of human serum transferrin. The structures of seven cyanogen bromide fragments and the assembly of the complete structure. *J Biol Chem* 1983; 258 (6): 3543–3553.
148. -. Malinger G, Ginath S, Lerman-Sagie T, Watemberg N, Lev D, Glezerman M. The fetal cerebellar vermis: normal development as shown by transvaginal ultrasound. *Prenat Diagn* 2001; 21 (8): 687–692.
149. -. Marquardt T, Denecke J. Congenital disorders of glycosylation: review of their molecular bases, clinical presentations and specific therapies. *Eur J Pediatr* 2003; 162 (6): 359–379.
150. -. Marques-da-Silva D, Dos Reis Ferreira V, Monticelli M, et al. Liver involvement in congenital disorders of glycosylation (CDG). A systematic review of the literature. *J Inher Metab Dis* 2017; 40 (2): 195–207.
151. -. Martínez-Monseny AF, Bolasell M, Callejón-Póo L, et al. AZATAX: Acetazolamide safety and efficacy in cerebellar syndrome in PMM2 congenital disorder of glycosylation (PMM2-CDG). *Ann Neurol* 2019; 85 (5): 740-751.
152. -. Martinez-Monseny A, Cuadras D, Bolasell M, et al. From gestalt to gene: early predictive dysmorphic features of PMM2-CDG. *J Med Genet* 2019; 56 (4): 236–245.
153. -. Mascalchi M, Mari F, Berti B, et al. Fast Progression of Cerebellar Atrophy in PLA2G6-Associated Infantile Neuronal Axonal Dystrophy. *Cerebellum* 2017; 16 (3): 742–745.
154. -. Matthijs G, Schollen E, Bjursell C, et al. Mutations in PMM2 that cause congenital disorders of glycosylation, type Ia (CDG-Ia). *Hum Mutat*. 2000; 16 (5): 386-94.
155. -. Matthijs G, Schollen E, Cassiman JJ, Cormier-Daire V, Jaeken J, van Schaftingen E. Prenatal diagnosis in CDG1 families: beware of heterogeneity. *Eur J Hum Genet* 1998; 6 (2): 99–104.

156. -. Matthijs G, Schollen E, Heykants L, Grünewald S. Phosphomannomutase deficiency: the molecular basis of the classical Jaeken syndrome (CDGS type Ia). *Mol Genet Metab*. 1999; 68 (2): 220–226.
157. -. Matthijs G, Schollen E, Pardon E, Veiga-Da-Cunha M, Jaeken J, Cassiman JJ, Van Schaftingen E. Mutations in PMM2, a phosphomannomutase gene on chromosome 16p13, in carbohydrate-deficient glycoprotein type I syndrome (Jaeken syndrome). *Nat Genet* 1997; 16 (1): 88–92.
158. -. Mayatepek E, Kohlmüller D. Mannose supplementation in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I and phosphomannomutase deficiency. *Eur J Pediatr* 1998; 157 (7): 605–606.
159. -. Mayatepek E, Schröder M, Kohlmüller D, Bieger WP, Nützenadel W. Continuous mannose infusion in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *Acta Paediatr* 1997; 86 (10): 1138–1140.
160. -. Mayer KN, Latal B, Knirsch W, et al. Comparison of automated brain volumetry methods with stereology in children aged 2 to 3 years. *Neuroradiology* 2016; 58 (9): 901-910.
161. -. McCormick EM, Muraresku CC, Falk MJ. Mitochondrial Genomics: A complex field now coming of age. *Curr Genet Med Rep* 2018; 6(2): 52-61.
162. -. Meaudre E, Meyrieux V, Suprano I, Camboulives J, Paut O. Anesthesia considerations in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *Paediatr Anaesth* 2005; 15 (10): 905–906.
163. -. Melberg A, Orlén H, Raininko R, Entesarian M, Dahlqvist J, Gustavson KH, Dahl N. Re-evaluation of the dysequilibrium syndrome. *Acta Neurol Scand* 2011; Jan; 123 (1): 28-33.
164. -. Mention K, Lacaille F, Valayannopoulos V, et al. Development of liver disease despite mannose treatment in two patients with CDG-Ib. *Mol Genet Metab* 2008; 93 (1): 40-3.
165. -. Mi Y, Lin A, Fiete D, Steirer L, Baenziger JU. Modulation of mannose and asialoglycoprotein receptor expression determines glycoprotein hormone half-life at critical points in the reproductive cycle. *J Biol Chem*. 2014; 289 (17): 12157-67.
166. -. Middleton FA, Strick PL. Anatomical evidence for cerebellar and basal ganglia involvement in higher cognitive function. *Science*. 1994; 266 (5184): 458-61.
167. -. Miller BS, Duffy MM, Addo OY, Sarafoglou K. rhIGF-1 Therapy for Growth Failure and IGF-1 Deficiency in Congenital Disorder of Glycosylation Ia (PMM2 Deficiency). *J Investig Med High Impact Case Rep* 2013; 1 (3): 2324709613503316.
168. -. Miller BS, Khosravi MJ, Patterson MC, Conover CA. IGF system in children with congenital disorders of glycosylation. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009; 70 (6): 892–897.
169. -. Miossec-Chauvet E, Mikaeloff Y, Heron D, et al. Neurological presentation in pediatric patients with congenital disorders of glycosylation type Ia. *Neuropediatrics*. 2003; 34(1): 1–6.
170. -. Monagle P. Diagnosis and management of deep venous thrombosis and pulmonary embolism in neonates and children. *Semin Thromb Hemost* 2012; 38 (7): 683–690.
171. -. Monin ML, Mignot C, De Lonlay P, et al. 29 French adult patients with PMM2-congenital disorder of glycosylation: outcome of the classical pediatric phenotype and depiction of a late-onset phenotype. *Orphanet J Rare Dis* 2014; 9: 207.
172. -. Monticelli M, Liguori L, Allocca M, Andreotti G, Cubellis MV. β -Glucose-1,6-Bisphosphate Stabilizes Pathological Phosphomannomutase2 Mutants In Vitro and Represents a Lead Compound to Develop Pharmacological Chaperones for the Most Common Disorder of Glycosylation, PMM2-CDG. *Int J Mol Sci* 2019; 20 (17): 4164.

173. -. Morava E, Wosik HN, Sykut-Cegielska J, et al. Ophthalmological abnormalities in children with congenital disorders of glycosylation type I. *Br J Ophthalmol* 2009; 93 (3): 350–354.
174. -. Morelle W, Potelle S, Witters P, et al. Galactose Supplementation in Patients With TMEM165-CDG Rescues the Glycosylation Defects. *J Clin Endocrinol Metab* 2017; 102: 1375-86.
175. -. Moremen KW, Tiemeyer M, Naim AV. Vertebrate protein glycosylation: diversity, sintesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13: 448-462.
176. -. Mormina E, Petracca M, Bommarito G, Piaggio N, Cocozza S, Inglese M. Cerebellum and neurodegenerative diseases: beyond conventional magnetic resonance imaging. *World J Radiol* 2017; 9 (10): 371-388.
177. -. Mostile G, Barone R, Nicoletti A, et al. Hyperkinetic movement disorders in congenital disorders of glycosylation. *Eur J Neurol* 2019; 26 (9): 1226–1234.
178. -. Mu TW, Ong DS, Wang YJ, Balch WE, Yates JR 3rd, Segatori L, Kelly JW. Chemical and biological approaches synergize to ameliorate protein-folding diseases. *Cell* 2008 Sep 5; 134 (5): 769-81.
179. -. Mumenthaler M, Mattle H. *Fundamentals of Neurology. An Illustrated Guide*, 1st edition. Ed. Thieme, 2006.
180. -. Musselman KE, Stoyanov CT, Marasigan R, et al. Prevalence of ataxia in children: a systematic review. *Neurology* 2014; 82: 80–9.
181. -. Muzik O, Chugani DC, Juhász C, Shen C, Chugani HT. Statistical parametric mapping: assessment of application in children. *Neuroimage* 2000; 12 (5): 538–549.

N

182. -. Nestrasil I, Ahmed A, Utz JM, Rudser K, Whitley CB, Jarnes-Utz JR. Distinct progression patterns of brain disease in infantile and juvenile gangliosidoses: Volumetric quantitative MRI study. *Mol Genet Metab* 2018; 123 (2): 97–104.
183. -. Ng BG, Freeze HH. Perspectives on glycosylation and its congenital disorders. *Trends Genet* 2018; 34 (6): 466-476.
184. -. Ng BG, Sosicka P, Agadi S, et al. SLC35A2-CDG: Functional characterization, expanded molecular, clinical, and biochemical phenotypes of 30 unreported Individuals. *Hum Mutat* 2019; 40 (7): 908-925.
185. -. Ng WG, Xu YK, Kaufman FR, Donnell GN. Deficit of uridine diphosphate galactose in galactosaemia. *J Inherit Metab Dis.* 1989; 12 (3): 257-66.
186. -. Nissenkorn A, Borgohain R, Micheli R, et al. Development of global rating instruments for pediatric patients with ataxia telangiectasia. *Eur J Paediatr Neurol* 2016; 20 (1): 140-6.

O

187. -. Ohtsubo K, Chen MZ, Olefsky JM, Marth JD. Pathway to diabetes through attenuation of pancreatic beta cell glycosylation and glucose transport. *Nat Med.* 2011; 17 (9): 1067-75.

P

188. -. Panneerselvam K, Freeze HH. Mannose corrects altered N-glycosylation in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome fibroblasts. *J Clin Invest* 1996; 97 (6): 1478–1487.

189. -. Park JH, Hogrebe M, Fobker M, et al. SLC39A8 deficiency: biochemical correction and major clinical improvement by manganese therapy. *Genet Med* 2018; 20: 259-68.
190. -. Pavone L, Fiumara A, Barone R, Rizzo R, Buttitta P, Dobyns WB, Jaeken J. Olivopontocerebellar atrophy leading to recognition of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *J Neurol* 1996 Oct; 243 (10): 700-5.
191. -. Péanne R, de Lonlay P, Foulquier F, et al. Congenital disorders of glycosylation (CDG): quo vadis? *Eur J Med Genet* 2018; 61(11): 643-663.
192. -. Peredo DE, Hannibal MC. The floppy infant: evaluation of hypotonia. *Pediatr Rev* 2009; 30 (9): e66-76.
193. -. Pérez B, Briones P, Quelhas D, et al. The molecular landscape of phosphomannose mutase deficiency in iberian peninsula: identification of 15 population-specific mutations. *JIMD Rep* 2011; 1: 117-123.
194. -. Pérez-Cerdá C, Girós ML, Serrano M, et al. A Population-Based Study on Congenital Disorders of Protein N- and Combined with O-Glycosylation Experience in Clinical and Genetic Diagnosis. *J Pediatr*. 2017; 183: 170-177.
195. -. Pérez-Cerdá C, Girós ML, Serrano M, et al. Protocolo de diagnóstico y tratamiento de los defectos congénitos de la glicosilación. *Acta Pediatr Esp*. 2015; 73 (Suplemento): S1-S139.
196. -. Pérez-Dueñas B, García-Cazorla A, Pineda M, et al. Long-term evolution of eight Spanish patients with CDG type Ia: typical and atypical manifestations. *Eur J Paediatr Neurol* 2009; 13 (5): 444–451.
197. -. Phan TV, Sima DM, Beelen C, Vanderauwera J, Smeets D, Vandermosten M. Evaluation of methods for volumetric analysis of pediatric brain data: The childmetrix pipeline versus adult-based approaches. *Neuroimage Clin* 2018; 19: 734–744.
198. -. Phoenix C, Schaefer AM, Elson JL, et al. A scale to monitor progression and treatment of mitochondrial disease in children. *Neuromuscul Disord* 2006; 16 (12): 814–820.
199. -. Pier DB, Gholipour A, Afacan O, et al. 3D Super-Resolution Motion-Corrected MRI: Validation of Fetal Posterior Fossa Measurements. *J Neuroimaging* 2016; 26 (5): 539–544.
200. -. Pierson R, Corson PW, Sears LL, Alicata D, Magnotta V, O'Leary D, Andreasen NC. Manual and semiautomated measurement of cerebellar subregions on MR images. *Neuroimage* 2002; 17 (1): 61–76.
201. -. Pilu G, Nicolaidis KH. Central nervous system: normal sonographic anatomy. In: Nicolaidis K, ed. *Diagnosis of fetal abnormalities. The 18–23-week scan. Diploma in Fetal Medicine Series.* Parthenon Publishing 1999. p. 5–6.
202. -. Pinho SS, Reis CA. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer* 2015; 15 (9): 540-55.
203. -. Poretti A, Wolf NI, Boltshauser E. Differential diagnosis of cerebellar atrophy in childhood. *Eur J Paediatr Neurol* 2008; 12 (3): 155–167.
204. -. Powell LD, Paneerselvam K, Vij R, et al. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome: not an N-linked oligosaccharide processing defect, but an abnormality in lipid-linked oligosaccharide biosynthesis? *J Clin Invest*. 1994; 94 (5): 1901-9.
205. -. Price M, Cardenas VA, Fein G. Automated MRI cerebellar size measurements using active appearance modeling. *Neuroimage* 2014; 103: 511–521.

Q

206. -. Quintana E, Navarro-Sastre A, Hernández-Pérez JM, et al. Screening for congenital disorders of glycosylation (CDG): transferrin HPLC versus isoelectric focusing (IEF). *Clin Biochem* 2009; 42 (4-5): 408–415.

R

207. -. Ranta ME, Crocetti D, Clauss JA, Kraut MA, Mostofsky SH, Kaufmann WE. Manual MRI parcellation of the frontal lobe. *Psychiatry Res* 2009; 172 (2): 147–154.
208. -. Rosenlöcher J, Sandig G, Kannicht C, Blanchard V, Reinke SO, Hinderlich S. Recombinant glycoproteins. The impact of cell lines and culture conditions on the generation of protein species. *J Proteomics* 2016; 134: 85-92.
209. -. Rossi M, Medina Escobar A, Ameghino L, Merello M. Expanding the phenotype of phosphomannomutase-2 gene congenital disorder of glycosylation: Cervical dystonia. *J Neurol Sci* 2017; 378: 52–54.
210. -. Rudaks LI, Andersen C, Khong TY, Kelly A, Fietz M, Barnett CP. Hypertrophic cardiomyopathy with cardiac rupture and tamponade caused by congenital disorder of glycosylation type Ia. *Pediatr Cardiol* 2012; 33 (5): 827–830.
211. -. Rutherford MA. Magnetic resonance imaging of the fetal brain. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2009; 21 (2): 180–186.
212. -. Rutschow S, Thiem J, Kranz C, Marquardt T. Membrane-permeant derivatives of mannose-1-phosphate. *Bioorg Med Chem* 2002; 10 (12): 4043-9.

S

213. -. Sanz-Nebot V, Balaguer E, Benavente F, Neusüss C, Barbosa J. Characterization of transferrin glycoforms in human serum by CE-UV and CE-ESI-MS. *Electrophoresis* 2007; 28 (12): 1949–1957.
214. -. Saudubray JM, Van den Berghe G, Walter JH. *Inborn Metabolic Diseases. Diagnosis and Treatment*. 6th edition. Ed. Springer 2016.
215. -. Schachter H, Freeze HH. Glycosylation diseases: quo vadis?. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792: 925-930.
216. -. Schiff M, Roda C, Monin ML, et al. Clinical, laboratory and molecular findings and long-term follow-up data in 96 French patients with PMM2-CDG (phosphomannomutase 2-congenital disorder of glycosylation) and review of the literature. *J Med Genet* 2017; 54 (12): 843–851.
217. -. Schmahmann JD. The cerebellum and cognition. *Neurosci Lett*. 2019 Jan 1; 688: 62-75.
218. -. Schmahmann JD, Gardner R, MacMore J, Vangel MG. Development of a brief ataxia rating scale (BARS) based on a modified form of the ICARS. *Mov Disord* 2009; 24 (12): 1820-8.
219. -. Schmahmann JD, Sherman JC. The cerebellar cognitive affective syndrome. *Brain* 1998; 121 (4): 561-79.
220. -. Schmitz-Hübsch T, du Montcel ST, Baliko L, et al. Scale for the assessment and rating of ataxia: development of a new clinical scale. *Neurology* 2006b; 66 (11): 1717-20.
221. -. Schmitz-Hübsch T, Tezenas du Montcel S, Baliko L, et al. Reliability and validity of the International Cooperative Ataxia Rating Scale: a study in 156 spinocerebellar ataxia patients. *Mov Disord* 2006a; 21 (5): 699-704.
222. -. Schollen E, Keldermans L, Foulquier F, et al. Characterization of two unusual truncating PMM2 mutations in two CDG-Ia patients. *Mol Genet Metab* 2007; 90 (4): 408–413.
223. -. Schollen E, Kjaergaard S, Legius E, Schwartz M, Matthijs G. Lack of Hardy-Weinberg equilibrium for the most prevalent PMM2 mutation in CDG-Ia (congenital disorders of glycosylation type Ia). *Eur J Hum Genet* 2000; 8 (5): 367–371.

224. -. Shang J, Lehrman MA. Metformin-stimulated mannose transport in dermal fibroblasts. *J Biol Chem* 2004; 279 (11): 9703–9712.
225. -. Shanti B, Silink M, Bhattacharya K, et al. Congenital disorder of glycosylation type Ia: heterogeneity in the clinical presentation from multivisceral failure to hyperinsulinaemic hypoglycaemia as leading symptoms in three infants with phosphomannomutase deficiency. *J Inher Metab Dis* 2009; 32 Suppl 1: S241–S251.
226. -. Sival DA, Brunt ER. The International Cooperative Ataxia Rating Scale shows strong age-dependency in children. *Dev Med Child Neurol* 2009; 51 (7): 571-2.
227. -. Sival DA, Pouwels ME, Van Brederode A, et al. In children with Friedreich ataxia, muscle and ataxia parameters are associated. *Dev Med Child Neurol* 2011; 53 (6): 529-34.
228. -. Smeets D, Ribbens A, Sima DM, et al. Reliable measurements of brain atrophy in individual patients with multiple sclerosis. *Brain Behav* 2016; 6 (9): e00518.
229. -. Smolyaninov VV. Some special features of organization of the cerebellar cortex. In: IM Gelfand, VS Gurfinkel, SV Fomin et al. eds. *Models of the Structural Functional Organization of Certain Biological Systems*. Ed. MIT Press 1971. p. 250–423.
230. -. Sparks SE, Krasnewich DM. PMM2-CDG (CDG-Ia) 2005 Aug 15 [Updated 2015 Oct 29]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2020. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1110/>.
231. -. Stanley P. What we have learned from glycosyltransferase knockouts in mice. *J Mol Biol* 2016; 428: 3166-3182.
232. -. Steinlin M, Zangger B, Boltshauser E. Non-progressive congenital ataxia with or without cerebellar hypoplasia: a review of 34 subjects. *Dev Med Child Neurol* 1998; 40 (3): 148-54.
233. -. Stenson PD, Mort M, Ball EV, et al. The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Hum Genet* 2017; 136 (6): 665–677 [<http://www.hgmd.org>].
234. -. Stray-Pedersen, A, Backe, PH, Sorte, HS, et al. PGM3 mutations cause a congenital disorder of glycosylation with severe immunodeficiency and skeletal dysplasia. *Am. J. Hum. Genet.* 2014; 95: 96–107.
235. -. Strømme P, Maehlen J, Strømme H, Torvik A. Postmortem findings in two patients the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *Acta Paediatr Scand* 1991; 375: 55–62.
236. -. Subramony SH, May W, Lynch D, et al. Cooperative Ataxia Group. Measuring Friedreich ataxia: Interrater reliability of a neurologic rating scale. *Neurology* 2005; 64 (7): 1261-2.
237. -. Sun L, Zhao Y, Zhou K, Freeze HH, Zhang YW, Xu H. Insufficient ER-stress response causes selective mouse cerebellar granule cell degeneration resembling that seen in congenital disorders of glycosylation. *Mol Brain* 2013; 6: 52.
238. -. Szathmari A, Thiesse P, Galand-desmé S, et al. Correlation between pre- or postoperative MRI findings and cerebellar sequelae in patients with medulloblastomas. 2010; 55 (7): 1310–1316.

T

239. -. Tan J, Dunn J, Jaeken J, Schachter H. Mutations in the MGAT2 gene controlling complex N-glycan synthesis cause carbohydrate-deficient glycoprotein

- síndrome type II, an autosomal recessive disease with defective brain development. *Am J Hum Genet.* 1996; 59 (4): 810-7.
240. -. Tan TY, Dillon OJ, Stark Z, et al. Diagnostic Impact and Cost-effectiveness of Whole-Exome Sequencing for Ambulant Children With Suspected Monogenic Conditions. *JAMA Pediatr.* 2017; 171 (9): 855-862.
241. -. Tayebi N, Andrews DQ, Park JK, Orvisky E, McReynolds J, Sidransky E, Krasnewich DM. A deletion-insertion mutation in the phosphomannomutase 2 gene in an African American patient with congenital disorders of glycosylation-Ia. *Am J Med Genet* 2002; 108 (3): 241-6.
242. -. Tegtmeier LC, Rust S, van Scherpenzeel M, et al. Multiple phenotypes in phosphoglucomutase 1 deficiency. *N Engl J Med.* 2014; 370 (6): 533-42.
243. -. Tiemeier H, Lenroot RK, Greenstein DK, Tran L, Pierson R, Giedd JN. Cerebellum development during childhood and adolescence: a longitudinal morphometric MRI study. *Neuroimage* 2010; 49 (1): 63–70.
244. -. Trouillas P, Takayanagi T, Hallett M, et al. International Cooperative Ataxia Rating Scale for pharmacological assessment of the cerebellar syndrome. The Ataxia Neuropharmacology Committee of the World Federation of Neurology. *J Neurol Sci* 1997; 145 (2): 205-11.

U

245. -. Urbizu A, Toma C, Poca MA, Sahuquillo J, Cuenca-León E, Cormand B, Macaya A. Chiari malformation type I: a case-control association study of 58 developmental genes. *PLoS One* 2013; 8 (2): e57241.

V

246. -. van de Kamp JM, Lefeber DJ, Ruijter GJ, et al. Congenital disorder of glycosylation type Ia presenting with hydrops fetalis. *J Med Genet* 2007; 44 (4): 277–280.
247. -. van den Boogert MAW, Rader DJ, Holleboom AG. New insights into the role of glycosylation in lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2017; 28 (6): 502–506.
248. -. van Egmond ME, Verschuuren-Bemelmans CC, Nibbeling EA, et al. Ramsay Hunt syndrome: clinical characterization of progressive myoclonus ataxia caused by GOSR2 mutation. *Mov Disord* 2014; 29 (1): 139-43.
249. -. Van Geet C, Jaeken J, Freson K, et al. Congenital disorders of glycosylation type Ia and IIa are associated with different primary haemostatic complications. *J Inher Metab Dis* 2001; 24 (4): 477–492.
250. -. Van Schaftingen E, Jaeken J. Phosphomannomutase deficiency is a cause of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome I. *FEBS Lett* 1995; 377(3): 318–320.
251. -. Varki A. Biological roles of glycans. *Glycobiology* 2017; 27: 3-49.
252. -. Vatansever D, Kyriakopoulou V, Allsop JM, Fox M, Chew A, Hajnal JV, Rutherford MA. Multidimensional analysis of fetal posterior fossa in health and disease. *Cerebellum* 2013; 12 (5): 632–644.
253. -. Vega AI, Pérez-Cerdá C, Desviat LR, Matthijs G, Ugarte M, Pérez B. Functional analysis of three splicing mutations identified in the PMM2 gene: toward a new therapy for congenital disorder of glycosylation type Ia. *Hum Mutat* 2009; 30 (5): 795–803.
254. -. Verity CM, Butler NR, Golding J. Febrile convulsions in a national cohort followed up from birth. I--Prevalence and recurrence in the first five years of life. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1985; 290 (6478): 1307-1310.

255. -. Vilas A, Yuste-Checa P, Gallego D, et al. Proteostasis regulators as potential rescuers of PMM2 activity. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2020; 1866 (7): 165777.
256. -. Villanueva V, Alvarez-Linera J, Gómez-Garre P, Gutiérrez J, Serratosa JM. MRI volumetry and proton MR spectroscopy of the brain in Lafora disease. *Epilepsia* 2006; 47 (4): 788–792.
257. -. Vissers LELM, van Nimwegen KJM, Schieving JH, et al. A clinical utility study of exome sequencing versus conventional genetic testing in pediatric neurology. *Genet Med*. 2017; 19 (9): 1055-1063.
258. -. Vogt G, Vogt B, Chuzhanova N, Julenius K, Cooper DN, Casanova JL. Gain-of-glycosylation mutations. *Curr Opin Genet Dev* 2007; 17 (3): 245-51.
259. -. Vuillaumier-Barrot S, Isidor B, Dupré T, Le Bizec C, David A, Seta N. Expanding the Spectrum of PMM2-CDG Phenotype. *JIMD Rep* 2012; 5: 123-5.

W

260. -. Wang JY, Ngo MM, Hessler D, Hagerman RJ, Rivera SM. Robust Machine Learning-Based Correction on Automatic Segmentation of the Cerebellum and Brainstem. *PLoS One*. 2016; 11 (5): e0156123.
261. -. Weier K, Beck A, Magon S, et al. Evaluation of a new approach for semi-automatic segmentation of the cerebellum in patients with multiple sclerosis. *J Neurol* 2012; 259 (12): 2673–2680.
262. -. Whitsett JA, Alenghat T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat Immunol*. 2015; 16(1): 27-35.
263. -. Winchester B. Lysosomal metabolism of glycoproteins. *Glycobiology*. 2005; 15 (6): 1R-15R.
264. -. Witters P, Honzik T, Bauchart E, et al. Long-term follow-up in PMM2-CDG: are we ready to start treatment trials?. *Genet Med* 2019; 21 (5): 1181–1188.
265. -. Wong SY, Gadomski T, van Scherpenzeel M, et al. Oral D-galactose supplementation in PGM1-CDG. *Genet Med* 2017; 19: 1226-35.

Y

266. -. Yoon U, Fonov VS, Perusse D, Evans AC; Brain Development Cooperative Group. The effect of template choice on morphometric analysis of pediatric brain data. *Neuroimage*. 2009; 45 (3): 769–777.
267. -. Yuste-Checa P, Brasil S, Gámez A, et al. Pharmacological Chaperoning: A Potential Treatment for PMM2-CDG. *Hum Mutat* 2017; 38 (2): 160–168.
268. -. Yuste-Checa P, Gámez A, Brasil S, et al. The Effects of PMM2-CDG-Causing Mutations on the Folding, Activity, and Stability of the PMM2 Protein. *Hum Mutat* 2015; 36 (9): 851–860.

Z

269. -. Zentilin Boyer M, de Lonlay P, Seta N, et al. Failure to thrive and intestinal diseases in congenital disorders of glycosylation. *Arch Pediatr* 2003; 10 (7): 590–595.
270. -. Zhang W, James PM, Ng BG, et al. A Novel N-Tetrasaccharide in Patients with Congenital Disorders of Glycosylation, Including Asparagine-Linked Glycosylation Protein 1, Phosphomannomutase 2, and Mannose Phosphate Isomerase Deficiencies. *Clin Chem* 2016; 62 (1): 208–217.

271. -. Zhao D, Liu W, Cai A, Li J, Chen L, Wang B. Quantitative evaluation of the fetal cerebellar vermis using the median view on three-dimensional ultrasound. *Prenat Diagn* 2013; 33 (2): 153–157.

