





Categoría: Investigación aplicada en salud y medicina

ORIGINAL

Evaluation of serum transferrin microheterogeneity for the diagnosis of congenital N-glycosylation defects

Evaluación de la microheterogeneidad de la transferrina sérica para el diagnóstico de defectos congénitos de la N-glicosilación

Tatiana Acosta Sánchez¹ , Lilia Caridad Marín Padrón¹ , Gretell Huertas Pérez² , Anitery Travieso Téllez³ , Alina García García⁴ , Laritza Martínez Rey¹ .

¹ Centro Nacional de Genética Médica. La Habana. Cuba.

² Hospital Pediátrico Docente de Centro Habana. La Habana. Cuba.

³ Hospital Pediátrico Docente Pepe Portilla. Pinar del Rio. Cuba.

⁴ Hospital Pediátrico William Soler. La Habana. Cuba.

Citar como: Acosta Sánchez T, Marín Padrón LC, Huertas Pérez G, Travieso Téllez A, García García A, Martínez Rey L. Evaluation of serum transferrin microheterogeneity for the diagnosis of congenital N-glycosylation defects. SCT Proceedings in Interdisciplinary Insights and Innovations. 2025;3:374. DOI: <https://doi.org/10.56294/piii2025374>

Recibido: 12-09-2025

Revisado: 27-11-2024

Aceptado: 03-01-2025

Publicado: 05-01-2025

Editor: Emanuel Maldonado 

ABSTRACT

Introduction: transferrin is a glycoprotein produced in the liver, whose function is to transport iron to the tissues. It has been used mainly for the differential diagnosis of anemias as a biomarker. There are different isoforms due to the difference in their glycosylation patterns. This microheterogeneity has allowed its use as a biomarker for Congenital Disorders of Glycosylation; genetic diseases as a result of mutations in genes that encode the enzymes of the post-translational mechanism of protein glycosylation.

Objective: to evaluate the microheterogeneity of serum transferrin for the diagnosis of Congenital Disorders of Glycosylation in Cuba

Methods: a descriptive and cross-sectional study was developed at the National Center for Medical Genetics in the period from 2016 to 2022. The analytical method used was the transferrin isoelectric focusing with immunofixation described by Van Eijik et al in 1983. Serum samples from 26 patients with multisystem clinical symptoms and suspicion of having a genetic disease without a definitive diagnosis were processed

Results: the IEF with immunofixation used allowed us to determine the glycosylation pattern of serum Tf. An altered Tf glycosylation pattern was found in four samples, two of type I and two of type II.

Conclusions: the IEF method to evaluate Tf glycoforms allowed the positive diagnosis in four patients, thus demonstrating the presence of Congenital Disorders of Protein N-glycosylation in Cuba

Keywords: Transferrin; Biomarker; Diagnosis; Congenital Disorders of Glycosylation.

RESUMEN

Introducción: la transferrina (Tf) es una glicoproteína producida en el hígado, cuya función es transportar el hierro hacia los tejidos. Como biomarcador se ha empleado fundamentalmente para el diagnóstico diferencial de anemias. Existen diferentes isoformas debido a la diferencia en sus patrones de glicosilación. Esta microheterogeneidad ha permitido su empleo como biomarcador de los Trastornos Congénitos de la Glicosilación; enfermedades genéticas debido a mutaciones en genes que codifican las enzimas del mecanismo postraducciona de glicosilación de proteínas.

Objetivo: evaluar la microheterogeneidad de la transferrina sérica para el diagnóstico de los Trastornos Congénitos de la Glicosilación en Cuba.

Métodos: en el Centro Nacional de Genética Médica se desarrolló un estudio descriptivo y transversal en el período comprendido entre el 2016 al 2022. El método analítico empleado fue el isoelectroenfoque (IEF) de transferrina con inmunofijación descrito por Van Eijik y cols en 1983. Se procesaron muestras de suero procedente de 26 pacientes con síntomas clínicos multisistémicos y sospecha de presentar alguna enfermedad genética sin diagnóstico definitivo.

Resultados: el IEF con inmunofijación empleado permitió determinar el patrón de glicosilación de la Tf sérica. En cuatro muestras se encontró un patrón de glicosilación de Tf alterado dos de tipo I y dos de tipo II.

Conclusiones: el método IEF para evaluar las glicofomas de Tf permitió el diagnóstico positivo en cuatro pacientes, demostrando así la presencia de Trastornos Congénitos de la N-glicosilación de proteínas en Cuba

Palabras clave: Transferrina; Biomarcador; Diagnóstico; Trastornos Congénitos de Glicosilación.

INTRODUCCIÓN

Las mutaciones en los genes que codifican las enzimas involucradas en el proceso de glicosilación de proteínas y lípidos son la base molecular de los Trastornos Congénitos de la Glicosilación (CDG, por sus siglas en inglés *Congenital Disorders of Glycosylation*).¹ En 1980, Jaeken describió el primer caso y desde entonces, se han identificado más de 170 subtipos; dentro de estos, un importante grupo lo constituyen los defectos en la N-glicosilación.²⁻⁴ La N-glicosilación es la modificación co- y post-traducciona más compleja que sufren las proteínas. La primera etapa de la vía ocurre en el citosol y en el retículo endoplasmático rugoso, en esta se produce la síntesis y transferencia de un oligosacárido núcleo al nitrógeno de la cadena lateral de un residuo Asparagina de la proteína nascente. El orden de los residuos de monosacáridos así como el tipo de enlace glucósido entre ellos, está definido por la acción específica de las glicosiltransferasas que intervienen en esta vía. Durante la segunda etapa ocurre el procesamiento específico del núcleo de N-Glicano en el Aparato de Golgi. Se eliminan y adicionan monosacáridos según el tipo de glicoproteína en formación mediante la combinación de glicosiltransferasas y glicosidasas, de elevada especificidad. Según la etapa donde actúe la enzima afectada, estamos en presencia de un trastorno de la N-glicosilación de tipo I o II.

Las alteraciones orgánicas de los CDG se pueden expresar en diferentes etapas de la vida, involucrando a cualquier sistema. Sin embargo, el amplio espectro clínico compromete mayoritariamente a los sistemas: nervioso central y periférico, digestivo, musculo-esquelético, hematológico, inmune y tegumentario.^{1,5} El diagnóstico es puramente bioquímico y molecular. El algoritmo comienza con la identificación de defectos en la glicosilación de las proteínas y la etapa afectada. Para confirmar el subtipo específico, se requieren estudios adicionales para identificar la enzima defectuosa y el genotipo correspondiente.

El marcador bioquímico primordial es la transferrina (Tf) sérica, glicoproteína transportadora de hierro en el plasma.⁶ La Tf es sintetizada principalmente en los hepatocitos y está presente en la sangre en gran concentración. Se encuentra formada por una cadena polipeptídica de 679 aminoácidos y un punto isoeléctrico (pI) que puede variar entre 5,4 y 5,9. Cada molécula consta de dos lóbulos de similar estructura para la fijación de Hierro. El grupo glucosídico está constituido por dos cadenas complejas de N-glicanos enlazadas a los residuos Asn 413 y Asn 611. Las isoformas se deben a la composición de la secuencia de aminoácidos, el contenido diferencial en Hierro y a la composición de las cadenas de carbohidratos. Estas cadenas varían en su grado de ramificación y cada una puede presentar hasta cuatro antenas. Si las dos etapas del proceso de N-glicosilación de la proteína transcurre sin defectos, cada antena terminará en un residuo de ácido siálico (cargado negativamente) y la isoforma mayoritaria será la tetrasialotransferrina (tetrasialoTf). Esta presenta cuatro terminaciones de ácido siálico y su pI es de 5,4. Las isoformas que le siguen en concentración son la pentasialotransferrina (pentasialoTf) y la trisialotransferrina (trisialoTf). Además, circulan pequeñas cantidades (menos del 2,5 %) de las glicofomas con menos de tres residuos de ácido siálico. Estas son denominadas genéricamente como Tf deficiente de carbohidratos (TDC) y se corresponden con las isoformas asialoTf (pI 5,9), monosialotransferrina (monosialoTf, pI 5,8) y disialotransferrina (disialoTf, pI 5,7). De esta manera, el contenido en ácido siálico puede variar desde 0-8 lo que determina la microheterogeneidad de la molécula.⁷⁻⁹

En pacientes con afectación en la N-glicosilación se produce un aumento de la concentración de las TDC y de la trisialoTf con patrones característicos para cada una de las dos etapas. Esto constituye el fundamento teórico del diagnóstico de los CDG de la ruta de la N-glicosilación, siempre que se tenga en cuenta los polimorfismos genéticos y el contenido de Hierro.¹⁰ Se han desarrollado varias técnicas para evaluar la microheterogeneidad de la Tf, entre ellos se encuentran: la cromatografía líquida de alta resolución, la electroforesis capilar y la espectrometría de masas. El método analítico más empleado es el isoelectroenfoque (IEF) con inmunofijación.¹¹ Un diagnóstico temprano de CDG es crucial para ofrecer un tratamiento a los síntomas que forman parte de la historia natural de cada tipo.¹²

En Cuba, hasta el 2016 no se había registrado algún caso con este diagnóstico por no contar con un método analítico que permitiera evaluar la microheterogeneidad de la Tf. Por este motivo, la presente investigación se propuso introducir el empleo de la Tf sérica como biomarcador para la identificación de trastornos congénitos de la N-glicosilación de proteínas en Cuba, a través de la evaluación de su microheterogeneidad mediante el IEF.

MÉTODOS

En el Centro Nacional de Genética Médica se realizó un estudio observacional, descriptivo de serie de casos, en el período comprendido entre el 2016 y 2022. La población de estudio la constituyeron los pacientes atendidos en las consultas de genética clínica de Cuba, con sospecha de padecer algún error innato del metabolismo no dilucidado mediante los métodos protocolizados en dicha institución. La muestra quedó conformada por 26 pacientes luego de aplicar una técnica de muestreo intencionado y de realizar el proceso de consentimiento informado, teniendo en cuenta los siguientes criterios.

Criterios de inclusión

Pacientes con manifestaciones multisistémicas con evidencias de alteraciones hematológicas, inmunológicas, hepáticas, gastrointestinales o neurológicas de etiología desconocida.

Criterios de exclusión

Pacientes con menos de tres meses de vida cumplidos.

Pacientes que recibieron alguna transfusión de sangre 10 días antes de realizar el estudio.

Criterios de salida

Pacientes cuyas muestras biológicas no cumplieron con los parámetros de calidad para ser procesadas en el laboratorio.

Como muestra biológica se empleó suero obtenido, de cada paciente, a partir de la centrifugación (3000 g, 5 min) de sangre total con EDTAK2 al 10% como anticoagulante. Se determinó la concentración de Tf de cada uno mediante un método inmunturbidimétrico en analizador químico Mindray BS200E y se les normalizó a 80g/L empleando solución de cloruro de sodio al 0,9%. El mismo fue pre-tratado para lograr la saturación de la Tf sérica con hierro, en condiciones alcalinas. Para ello se adicionó 5 µL de hidrógeno carbonato de sodio (0,5mmol/L) y 5 µL de cloruro de hierro (III) (20mmol/L) a 100 µL de suero.

El método analítico empleado fue el isoelectroenfoco de Tf con inmunofijación descrito por de Jong y van Eijik en 1988.¹³ Paralelamente, se procedió según lo descrito en el procedimiento normalizado de operación y en el manual de instrucción del equipo model 111 Mini IEF Cell de BIORAD.

Se elaboró un gel de poliacrilamida como soporte (T: 12,5%), utilizando anfolitas con un rango pH 4-7. Para la inmunofijación se empleó un anticuerpo policlonal anti-Tf humana. El revelado se realizó mediante tinción con azul Coomasie, previa remoción del resto de las proteínas séricas mediante lavado con solución de cloruro de sodio al 0,9% durante 24 horas. La corrida electroforética procedió de la siguiente forma:

- Etapas 1(migración de las anfolitas): 15 min a 100 V;
- Etapas 2 (alineación de las proteínas de la muestra): 15 min a 200 V,
- Etapas 3(separación de las isoformas de Tf): 1 h a 450 V

El resultado de la técnica de IEF fue analizado, cualitativamente, mediante visualización de los patrones sugestivos de defectos de la etapa I o II de la N-glicosilación al compararlos con estándares internacionales. Para tal análisis se dispuso de un control negativo y dos positivos (para ambos patrones) aportados por el Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares de Madrid, institución certificada internacionalmente para el diagnóstico de estas entidades. Para garantizar la confiabilidad de los resultados se practicaron ensayos de repetibilidad y reproducibilidad.

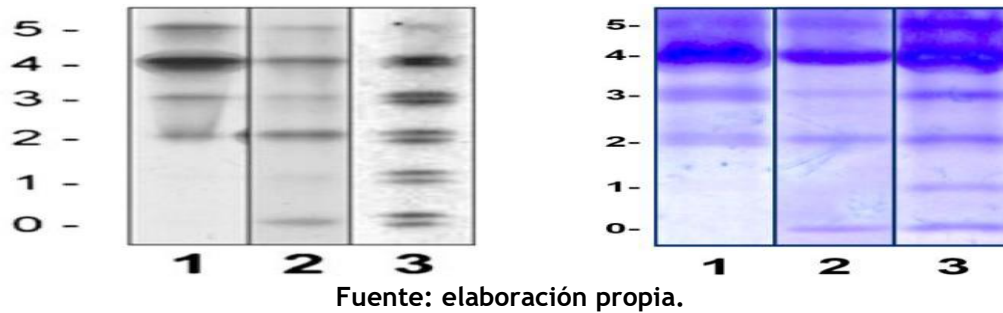
Para dar salida al objetivo propuesto se definieron cuatro variables. En la tabla 1 se definen los datos correspondientes a estas.

La investigación forma parte de un proyecto de investigación institucional. Para su desarrollo, se respetaron los principios enunciados en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, que establece los principios éticos para las investigaciones en seres humanos.¹⁴

RESULTADOS

El método de EIF de Tf con inmunofijación utilizado en el laboratorio reprodujo los patrones normales, tipo I y II de microheterogeneidad de la Tf sérica (figura 1).

Figura 1. Patrones electroforéticos de glicofomas de Tf establecidos internacionalmente y obtenidos en el laboratorio.



Fuente: elaboración propia.

Nota: Imagen de la izquierda: patrones de EIF de Tf establecidos internacionalmente. Imagen de la derecha: patrones de EIF de Tf obtenido en la investigación. Números verticales: 0 (banda de asialoTf); 1 (banda de monosialoTf); 2 (banda de disialoTf); 3 (banda de trisialoTf); 4: (banda de tetrasialoTf); 5: (banda de pentasialoTf). Números horizontales: carril 1 (control negativo); carril 2 (control positivo patrón I); carril 3: (control positivo patrón II).

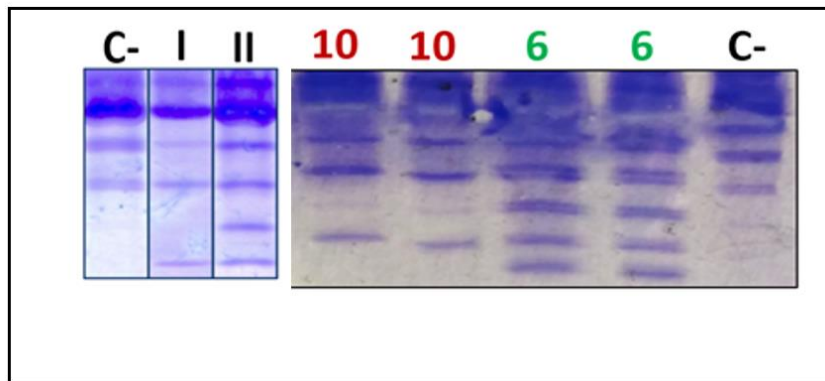
De las 25 muestras de pacientes evaluadas, cuatro mostraron un patrón electroforético alterado. Dos de estos correspondieron a un patrón tipo I y dos a un patrón tipo II. En el resto de las muestras, se obtuvieron patrones similares al control negativo.

A continuación, se describen los datos de cada uno de ellos.

Paciente 6: masculino de 56 meses de edad con daño neurológico y cardiovascular severos, coagulopatía, hipotonía, apnea, hepatomegalia. Patrón de EIF-Tf tipo II (figura 2). Diagnóstico: trastorno congénito de la segunda etapa de la N-glicosilación de proteínas.

Paciente 10: femenino de 23 meses de edad con fallo de medro, disfunción hepática, hipotonía, dismorfias faciales, cardiomiopatía, mamilas invertidas, lipodistrofia e inmunodeficiencia. Patrón de EIF-Tf tipo I (figura 2). Diagnóstico: trastorno congénito de la primera etapa de la N-glicosilación de proteínas, posible PMM2-CDG (CDG Ia).

Figura 2. Patrones electroforéticos de glicofomas de Tf de los pacientes 6 y 10. Imagen de la izquierda: patrones de EIF de Tf establecidos internacionalmente.



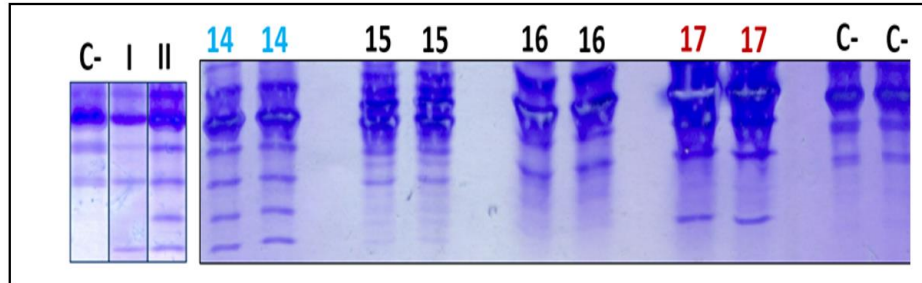
Fuente: elaboración propia.

Nota: Imagen de la derecha: patrones de EIF de Tf obtenido en la investigación. Carril C- (control negativo); carril I (control positivo patrón I); carril II: (control positivo patrón II); carril 10 (suero de paciente 10); carril 6 (suero de paciente 6)

Paciente 14: masculino de 18 meses de edad con cardiopatía, anemia, afectaciones neurológicas, episodios de hipotermias, inmunodeficiencia. Patrón de EIF-Tf tipo II (figura 3). Diagnóstico: trastorno congénito de la segunda etapa de la N-glicosilación de proteínas CDG-II.

Paciente 17: masculino de 8 meses de edad con enteropatía perdedora de proteínas, diarreas crónicas, coagulopatía, vómitos recurrentes, signos de atrofia cortical y cerebelosa, hipoglicemia, anemia, edemas. Patrón de EIF-Tf tipo I (figura 3). Diagnóstico: trastorno congénito de la primera etapa de la N-glicosilación de proteínas CDG-I, posible MPI-CDG (CDG Ib).

Figura 3. Patrones electroforéticos de glicofomas de Tf de los pacientes 14, 15, 16 y 17.



Fuente: elaboración propia.

Nota: Imagen de la izquierda: patrones de EIF de Tf establecidos internacionalmente. Imagen de la derecha: patrones de EIF de Tf obtenido en la investigación. Carril C- (control negativo); carril I (control positivo patrón I); carril II: (control positivo patrón II); carril 14 (suero de paciente 14); carril 15 y 16 (sueros con resultado negativo); carril 17 (suero de paciente 17)

CONCLUSIONES

En este trabajo se introdujo el método IEF para evaluar las glicofomas de Tf y de esta manera utilizarlo como un primer biomarcador para la identificación de CDG de la N glicosilación de proteínas en el país. Esto permitió el diagnóstico positivo en cuatro pacientes, demostrando así la presencia de estas enfermedades en Cuba. Para poder confirmar el subtipo específico, se recomienda la introducción de métodos de biología molecular. Con esto se puede ampliar el conocimiento de estas enfermedades y aumentar el arsenal de métodos diagnósticos para errores congénitos del metabolismo en el territorio nacional.

REFERENCIAS

1. Bogdańska A, Lipiński P, Szymańska-Rożek P, Jezela-Stanek A, Rokicki D, Socha P, et al. Clinical, biochemical and molecular phenotype of congenital disorders of glycosylation: long-term follow-up. *Orphanet J Rare Dis* 2021;16:17. <https://doi.org/10.1186/s13023-020-01657-5>.
2. Jaeken J, Vanderschueren-Lodeweyckx M, Casaer P, Snoeck L, Corbeel L, Eggermont E, 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?: 90. *Pediatr Res* 1980;14:179-179. <https://doi.org/10.1203/00006450-198002000-00117>.
3. Piedade A, Francisco R, Jaeken J, Sarkhail P, Brasil S, Ferreira CR, et al. Epidemiology of congenital disorders of glycosylation (CDG)—overview and perspectives. *J Rare Dis* 2022;1:3. <https://doi.org/10.1007/s44162-022-00003-6>.
4. Rosero Freire DA, López Altamirano JM. Prognostic efficacy of platelet/lymphocyte ratio and neutrophil/lymphocyte ratio in patients with gastric cancer. *Salud, Ciencia y Tecnología* 2023;3:232. <https://doi.org/10.56294/saludcyt2023232>.
5. Lipiński P, Tylki-Szymańska A. Congenital Disorders of Glycosylation: What Clinicians Need to Know? *Front Pediatr* 2021;9:715151. <https://doi.org/10.3389/fped.2021.715151>.
6. Francisco R, Marques-da-Silva D, Brasil S, Pascoal C, Dos Reis Ferreira V, Morava E, et al. The challenge of CDG diagnosis. *Mol Genet Metab* 2019;126:1-5. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.11.003>.

7. Jeffrey PD, Bewley MC, MacGillivray RT, Mason AB, Woodworth RC, Baker EN. Ligand-induced conformational change in transferrins: crystal structure of the open form of the N-terminal half-molecule of human transferrin. *Biochemistry* 1998;37:13978-86. <https://doi.org/10.1021/bi9812064>.
8. Baker EN. Structure and Reactivity of Transferrins. *Advances in Inorganic Chemistry*, vol. 41, Elsevier; 1994, p. 389-463. [https://doi.org/10.1016/S0898-8838\(08\)60176-2](https://doi.org/10.1016/S0898-8838(08)60176-2).
9. Prabavathy K, Nalini M. Deep Learning Enabled Whale Optimization Algorithm for Accurate Prediction of RA Disease. *Salud, Ciencia y Tecnología - Serie de Conferencias* 2024;3:652. <https://doi.org/10.56294/sctconf2024652>.
10. Messina A, Palmigiano A, Esposito F, Fiumara A, Bordugo A, Barone R, et al. HILIC-UPLC-MS for high throughput and isomeric N-glycan separation and characterization in Congenital Disorders Glycosylation and human diseases. *Glycoconj J* 2021;38:201-11. <https://doi.org/10.1007/s10719-020-09947-7>.
11. Francisco R, Brasil S, Poejo J, Jaeken J, Pascoal C, Videira PA, et al. Congenital disorders of glycosylation (CDG): state of the art in 2022. *Orphanet J Rare Dis* 2023;18:329. <https://doi.org/10.1186/s13023-023-02879-z>.
12. Verheijen J, Tahata S, Kozicz T, Witters P, Morava E. Therapeutic approaches in Congenital Disorders of Glycosylation (CDG) involving N-linked glycosylation: an update. *Genet Med* 2020;22:268-79. <https://doi.org/10.1038/s41436-019-0647-2>.
13. van Eijk HG, van Noort WL, Dubelaar ML, van der Heul C. The microheterogeneity of human transferrins in biological fluids. *Clin Chim Acta* 1983;132:167-71. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(83\)90244-9](https://doi.org/10.1016/0009-8981(83)90244-9).
14. WMA - The World Medical Association-WMA Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Participants s. f. <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki/> (accedido 26 de noviembre de 2024).
15. de Jong G, van Eijk HG. Microheterogeneity of human serum transferrin: a biological phenomenon studied by isoelectric focusing in immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 1988;9:589-98. <https://doi.org/10.1002/elps.1150090921>.
16. Pascoal C, Francisco R, Mexia P, Pereira BL, Granjo P, Coelho H, et al. Revisiting the immunopathology of congenital disorders of glycosylation: an updated review. *Front Immunol* 2024;15:1350101. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1350101>.
17. Pérez-Dueñas B, García-Cazorla A, Pineda M, Poo P, Campistol J, Cusí 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. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2008.09.002>.
18. Altassan R, Péanne R, Jaeken J, Barone R, Bidet M, Borgel D, 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;42:5-28. <https://doi.org/10.1002/jimd.12024>.
19. Čechová A, Altassan R, Borgel D, Bruneel A, Correia J, Girard M, et al. Consensus guideline for the diagnosis and management of mannose phosphate isomerase-congenital disorder of glycosylation. *J Inherit Metab Dis* 2020;43:671-93. <https://doi.org/10.1002/jimd.12241>.
20. Ferreira CR, Altassan R, Marques-Da-Silva D, Francisco R, Jaeken J, Morava E. Recognizable phenotypes in CDG. *J Inherit Metab Dis* 2018;41:541-53. <https://doi.org/10.1007/s10545-018-0156-5>.

FINANCIACIÓN

Ninguna.

CONFLICTO DE INTERÉS

Ninguno.