



Enfermedades peroxisomales generalizadas: nuevo enfoque terapéutico

M. Martínez Regúlez¹, M.T. Noguera Torrell²

¹Fundación Manuela Martínez para los Niños con Enfermedades Metabólicas, Laboratorio de Investigación, ²Departamento de Electrofisiología, Clínica Corachán, Barcelona

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades peroxisomales generalizadas o de la biogénesis peroxisomal constituyen un heterogéneo grupo de patologías caracterizado por la carencia o total ausencia de peroxisomas funcionantes en las células del organismo. Los peroxisomas son organelas de pequeño tamaño (diámetro promedio, 0,5 μm), cuya importancia en medicina ha crecido espectacularmente desde que en 1973 Goldfischer y colaboradores⁽¹⁾ descubrieran la ausencia de peroxisomas identificables en el hígado de enfermos con el síndrome cerebro-hepato-renal de Zellweger⁽²⁾. Hasta ese momento, la principal función atribuida a los peroxisomas se limitaba al reino vegetal y consistía en la capacidad de oxidar diversos sustratos con producción de peróxido de hidrógeno (de ahí su nombre), que posteriormente es descompuesto por la catalasa.

En el ser humano, el síndrome de Zellweger constituye el prototipo de la carencia de peroxisomas y ha servido para incentivar considerablemente el estudio en este área, de tal modo que en los últimos años se han adscrito a los peroxisomas más de 50 reacciones enzimáticas distintas. Las más características de estas reacciones afectan el metabolismo lipídico, como la defectuosa β -oxidación de los ácidos grasos de más de 22 átomos de carbono (llamados de cadena muy larga o, en inglés, *very long chain fatty acids*, VLCFA), especialmente del 26:0 y 26:1 ω 9, que tiene lugar en el peroxisoma^(3,4). Las dos primeras etapas en la síntesis de plasmalógenos también son peroxisomales^(5,6), como lo son la α -oxidación del ácido fitánico^(7,8) la β -oxidación del ácido pristánico y la síntesis de ácidos biliares^(9,10). La grave patología del síndrome de Zellweger se ha atribuido a la deficiencia de estas reacciones peroxisomales⁽¹¹⁾. El origen de todo ello sería un fallo en el ensamblaje del peroxisoma debido a la defectuosa importación de proteínas de nueva síntesis en la matriz peroxisomal. No obstante, el mecanismo patogénico profundo de los gravísimos síntomas y signos de esta letal enfermedad permanece aún en la oscuridad.

Las medidas terapéuticas seguidas con estos enfermos se suelen limitar a intentar corregir algunas de las anomalías bioquímicas que presentan los enfermos con síndrome de Zellweger y sus variantes. Dado que muchos de los signos bioquímicos que manifiestan estos pacientes consisten en acumulaciones de compuestos lipídicos anómalos, la terapia ha consistido generalmente en

tratar de disminuir los niveles de dichos metabolitos. Como veremos más adelante, también se han ensayado tratamientos con el fin de aumentar los niveles de plasmalógenos y de normalizar la función hepática administrando ácidos biliares. En general, la eficacia de estas medidas dietéticas se ha limitado a ciertas mejoras bioquímicas, con una escasa o nula respuesta clínica. El concurrente capítulo presenta una orientación terapéutica de estas enfermedades totalmente distinta, basada en los hallazgos y experiencia personales acumulados durante los últimos veinte años. Comenzaremos por exponer un breve repaso clínico de estas enfermedades, necesario para evaluar la eficacia del tratamiento.

2. CLÍNICA DE LAS ENFERMEDADES PEROXISOMALES GENERALIZADAS

Las enfermedades peroxisomales constituyen un grupo de patologías sumamente heterogéneo, no sólo clínicamente sino también desde los puntos de vista bioquímico y genético. En primer lugar, hay que distinguir las llamadas enfermedades de la biogénesis peroxisomal o generalizadas de aquellas otras caracterizadas por un defecto aislado de una sola enzima (adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X/adrenomieloneuropatía) o de varias enzimas peroxisomales (condrodistrofia punctata rizo-mélica), enfermedades que no vamos a tratar aquí por tener patologías totalmente distintas. Pero, aun ciéndonos a las enfermedades peroxisomales generalizadas, en que el defecto enzimático es múltiple y el fallo peroxisomal total, la sintomatología de estos pacientes es profundamente diferente de unos a otros casos. Clásicamente, se han distinguido tres variantes distintas dentro de este grupo de enfermedades: el síndrome cerebro-hepato-renal de Zellweger, la adrenoleucodistrofia neonatal y la llamada enfermedad de Refsum infantil. Aunque la distinción entre estos tres fenotipos es bastante artificial y se solapan entre ellos, como también lo hacen sus genotipos, vamos a enumerar brevemente algunas características de cada uno de ellos que, al menos, nos permitan distinguir entre formas más y menos malignas de la enfermedad. Ello será necesario a la hora de evaluar la eficacia del tratamiento.

El síndrome de Zellweger es el más grave y letal a corto plazo. Los pacientes con este síndrome no suelen sobrepasar los 6 meses o, como máximo, el año de vida. Las anomalías del sistema ner-

vioso central son muy profundas y existen defectos en la migración neuronal, con heterotopias, polimicrogiria y paquigiria, y un defecto básico de la mielinogénesis que impide desde el principio la formación de una vaina mielínica normal (*desmielinización*). Estas alteraciones se traducen por graves signos y síntomas neurológicos, con marcada hipotonía generalizada, convulsiones y afectación neurosensorial profunda, con ceguera, sordera y falta de contacto con el mundo exterior. Hay hepatomegalia, a veces acompañada de esplenomegalia, y la función hepática está constantemente alterada. En la biopsia o necropsia hepáticas se descubre la falta de peroxisomas y una cirrosis, generalmente micronodular. En la ecografía abdominal o necropsia suelen descubrirse quistes renales, usualmente silentes desde el punto de vista clínico. El metabolismo óseo está alterado y existe una osteopenia generalizada. Los huesos del cráneo están especialmente afectados, con fontanelas extraordinariamente amplias y, a menudo, diastasis completa de suturas⁽¹²⁾. Es muy característica la observación radiológica de un punteado óseo en las rótulas y acetábulos (condrodisplasia punctata). Estos niños presentan anomalías craneofaciales típicas, con frente alta y a menudo prominente, paladar ojival o hendido, orejas de implantación baja, arcos superciliares poco acentuados y epicanto interno. La nariz es pequeña y de raíz aplanada. De perfil, la facies de estos enfermos adquiere un aspecto peculiar aplanado. Las glándulas suprarrenales suelen estar afectadas y la respuesta suprarrenal a la estimulación con ACTH es pobre.

El diagnóstico se hace *in vivo* mediante la detección de los niveles anormalmente elevados de los ácidos grasos de cadena muy larga 26:0 y 26:1 ω 9 en plasma y una disminución drástica de los plasmalógenos en las células hemáticas (hematíes, linfocitos). Aunque la degradación de los ácidos fitánico y pristánico es defectuosa, estos ácidos apenas aumentan en sangre, dado su origen exógeno y la poca edad y dieta pobre de estos enfermos. La síntesis defectuosa de ácidos biliares en el síndrome de Zellweger se traduce por la acumulación de metabolitos anormales, como los ácidos 3,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colestanoico (THCA) y 3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colestanoico (DHCA)⁽¹³⁾. En fibroblastos cultivados de piel se confirma el aumento de los VLCFA y la afectación severa de la síntesis de plasmalógenos⁽¹⁴⁾. A nivel anatomopatológico, es patognomónica la ausencia de peroxisomas normales y su sustitución por membranas peroxisomales, vacías de contenido matricial (*peroxisomal ghosts*)⁽¹⁵⁾.

Las otras variantes del síndrome de Zellweger no suelen ser tan graves a corto plazo y algunos pacientes pueden llegar a sobrepasar la primera o, incluso, la segunda infancia. La constelación de signos y síntomas es la misma, si bien con menor constancia y gravedad. En la llamada adrenoleucodistrofia neonatal, puede observarse un cierto grado de mielinización, al principio difícil de distinguir por resonancia magnética cerebral de un simple retraso de la mielinización. Sin embargo, si el niño sobrevive, más tarde suele perderse parte de la mielina (probablemente anormal) adquirida, apareciendo una franca desmielinización de tipo inflamatorio, similar a la observada en la adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X, que se traduce por una captación anómala de contraste endovenoso⁽¹⁶⁾. Bioquímicamente, aparecen las mismas anomalías que en el síndrome de Zellweger, aunque algo

menos acentuadas. Los VLCFA están francamente elevados y los plasmalógenos están muy disminuidos, aunque no tan drásticamente como en el síndrome de Zellweger. Los ácidos fitánico y pristánico están elevados, dependiendo su cuantía de la edad y dieta del paciente. Es usual que los enfermos con NALD adquieran un cierto grado de desarrollo psicomotor inicial, desarrollo que suele llegar hasta los 6-12 meses de vida, para después perder progresivamente las funciones adquiridas, al propio tiempo que aparece la desmielinización. Estos niños no suelen sobrepasar los 2 ó 3 años de vida.

La enfermedad de Refsum infantil es la menos grave de las tres variantes peroxisomales. Algunos de estos pacientes han alcanzado incluso la edad adulta. En estos enfermos suele haber un predominio relativo de la patología hepatodigestiva sobre la neurológica, hasta el punto de que no es raro que sea el gastroenterólogo el primer médico consultado por los problemas del niño. No obstante, el retraso psicomotor, la afectación neurosensorial y la hipotonía más o menos acentuada son constantes y es muy difícil que un pediatra o neuropediatra avezado las pase por alto. La hepatomegalia es un signo prominente de esta enfermedad, a veces acompañada de esplenomegalia, y la función hepática está siempre alterada. A menudo existe esteatorrea, más llamativa en el lactante joven. Bioquímicamente, el ácido fitánico suele estar muy elevado en estos pacientes, existiendo además una alteración en el patrón de ácidos biliares y un aumento, aunque no tan marcado como en las otras dos variantes, de los VLCFA. En cambio, los plasmalógenos están tan sólo discretamente disminuidos en hematíes, de tal modo que, a no ser que se tenga mucha experiencia en su determinación, se suelen dar por normales. No obstante, un cuidadoso análisis de sus niveles en relación a los ácidos grasos de la misma cadena (índices 18:0DMA/18:0 y 16:0DMA/16:0) siempre descubre valores inferiores a los auténticamente normales. Es común, en cambio, que la síntesis *in vitro* de plasmalógenos en fibroblastos cultivados de piel se dé por normal, debido a los nutrientes de los medios de cultivo que en parte compensan las anomalías metabólicas de estas células. En nuestra experiencia personal, siempre que la carencia de plasmalógenos sea discreta, creemos que es mejor dar por válidos los datos obtenidos en hematíes. De otro modo nos exponemos a considerar como normal una síntesis de plasmalógenos ligeramente afectada.

A pesar de esta distinción, que es en cierto modo real en cuanto a gravedad clínica, hay que insistir en que la diferenciación entre fenotipos es artificial, y no basada en la genética. Este solapamiento se manifiesta también clínicamente, sobre todo, entre los dos fenotipos NALD y IRD. En nuestra experiencia, enfermos que se habían diagnosticado de Refsum infantil, correctamente desde el punto de vista clínico, han resultado después ser casos de adrenoleucodistrofia neonatal, como ha quedado evidenciado por resonancia magnética craneal⁽¹⁶⁾. Se ha propuesto una diferenciación bioquímica, basada en los niveles relativos de los dos VLCFA 26:0 y 26:1 ω 9⁽¹⁷⁾, en el sentido de que en el Zellweger verdadero predominaría el 26:1 ω 9, en el Refsum infantil, el 26:0 y en la NALD, ambos VLCFA tendrían niveles equivalentes. Sin embargo, personalmente hemos visto a varios enfermos con grandes elevaciones de los VLCFA y franca predominancia del 26:1 ω 9, cuyo

cuadro clínico se situaba entre una adrenoleucodistrofia neonatal y una enfermedad de Refsum infantil.

No obstante, sí creemos que el típico síndrome cerebro-hepato-renal de Zellweger es realmente diferente de los otros dos fenotipos, tanto clínica como bioquímicamente. Estos enfermos no sólo son mucho más graves, sino que además tienen características que los diferencian de un modo claro de los otros dos fenotipos. Probablemente la más evidente es la cifra de plasmalógenos, que es prácticamente nula. En las otras dos variantes fenotípicas, en cambio, no hemos hallado nunca niveles de plasmalógenos que fueran inferiores al 50% del mínimo normal. Clínicamente, en los más graves de estos enfermos con Zellweger clásico, hemos encontrado quistes renales, *condrodysplasia punctata* y claras heterotopias neuronales detectables en RM craneal. Estos niños presentaban siempre un cuadro convulsivo de aparición muy precoz, ya al nacimiento o poco después. En cambio, las crisis comiciales que han aparecido en los otros fenotipos han sido inconstantes y de aparición más tardía. Por ello, proponemos reservar el término síndrome de Zellweger para este cuadro clásico, clasificando a los demás como enfermos peroxisomales generalizados dentro del espectro *NALD/IRD* o variantes del síndrome de Zellweger, sin especificar más, en tanto nuestros conocimientos no nos permitan llegar a una diferenciación más clara que la que ahora existe entre *NALD* e *IRD*.

3. TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDADES PEROXISOMALES GENERALIZADAS

Las medidas terapéuticas administradas a los enfermos peroxisomales han sido, en general, sintomáticas y básicamente han consistido en una drástica reducción de los lípidos en la dieta, con el fin de disminuir los niveles de ácido fitánico⁽¹⁸⁾. También con dietas muy pobres en grasas y, al igual que en los pacientes con X-ALD, se ha intentado disminuir los niveles plasmáticos de VLCFA, en especial de 26:0. En algunos casos, se han añadido incluso ácidos grasos monoinsaturados a la dieta (18:1ω9, 22:1ω9, ácidos oleico y erúico, respectivamente), mediante la conocida mezcla *aceite de Lorenzo*⁽¹⁹⁾, en un intento de inhibir la síntesis de 26:0. Estas medidas han producido, en efecto, una caída en plasma del 26:0 pero, como contrapartida, han provocado un gran aumento de los niveles de 26:1ω9, ácido graso de la misma serie que el 18:1ω9 y el 22:1ω9, y una marcada disminución de los ácidos grasos poliinsaturados. Además, no se ha conseguido que el índice 26:0/22:0, diagnóstico de la enfermedad, disminuya lo más mínimo, detectándose en cambio un aumento marcado del cociente 26:1ω9/22:0, que en ocasiones ha alcanzado valores extraordinarios, muy por encima de los espontáneamente hallados en la enfermedad (datos personales no publicados). Desde el punto de vista clínico estas dietas no han producido mejoría alguna. Es más, el empeño en disminuir los niveles plasmáticos de VLCFA a toda costa, empobreciendo la dieta de estos enfermos, no sólo no los mejora sino que los empeora dramáticamente, convirtiendo a unos niños ya gravemente enfermos en desnutridos profundos. Hemos tenido ocasión de comprobar esta triste realidad en dos pacientes que presentamos más adelante.

Otros intentos de mejorar el severo cuadro clínico de estos pacientes han sido la aportación de precursores de plasmalógenos⁽²⁰⁾, efectuada en un solo enfermo con resultados dudosos. Actualmente, el grupo holandés está insistiendo en el empleo del alcohol batílico en enfermos con condrodysplasia punctata rizo-mélica (Annemieke Bams, última reunión de la ULF, abril 2009), con el que han obtenido aumento de plasmalógenos, tanto en ratones como en pacientes, aunque no mejorías clínicas significativas. La plasmaféresis⁽²¹⁾, realizada en un paciente para disminuir los niveles de ácido fitánico, con resultados bioquímicos y clínicos transitoriamente positivos y la terapéutica con ácidos biliares (cólico, quenodesoxicólico)⁽²²⁾, administrada con el fin de suplir la carencia de estos compuestos e inhibir la síntesis de metabolitos anormales (THCA y DHCA, ácidos di y trihidroxicoles-tanoico) tampoco han producido ninguna clara mejoría clínica. Esta última terapia ha estado varios años en fase experimental, al parecer mejorando la función hepática en otros defectos genéticos, pero sin haberse tampoco publicado resultados en enfermos peroxisomales. Los intentos de estimular la formación de peroxisomas⁽²³⁾ han fracasado.

Hace ya dos décadas, descubrimos que el cerebro de los enfermos con síndrome de Zellweger clásico y sus variantes tiene unas cifras bajísimas de ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6ω3)^(24,25). Esta carencia de DHA está también presente en otros tejidos (hígado, riñones, suprarrenales, sangre), e incluso en la retina, que es la estructura más rica en este ácido graso⁽²⁶⁻²⁸⁾. Dado el crucial papel atribuido al DHA en las membranas celulares en general y, especialmente, en las neuronas y células fotorreceptoras de la retina, una carencia tan drástica como la hallada en los enfermos peroxisomales podría ser patogénica. Ello constituyó la hipótesis de trabajo de un ensayo terapéutico comenzado en 1991^(29,30), que sigue en marcha en la actualidad y cuyos resultados hasta la fecha vamos a tratar de resumir.

4. PACIENTES

Hasta el momento, hemos tratado a 56 pacientes provenientes de todo el mundo (Fig. 1), con diversos fenotipos y por períodos variables de tiempo, dependiendo de muchas circunstancias, entre ellas la posibilidad o no de seguir desplazándose para los imprescindibles controles que requiere el tratamiento. Otro factor importante ha sido el hecho de que los ácidos grasos omega-3 están hoy en día muy en boga y existen en las farmacias diversas mezclas de triglicéridos ricas en DHA. Ésta ha sido la causa de que varios de los pacientes hayan interrumpido el tratamiento con DHA-EE pasando a otras formas de DHA. Incluso, la mayoría de ellos han combinado el tratamiento con dietas restrictivas, a pesar de nuestras recomendaciones. No hemos podido seguir a estos pacientes, que están señalados como "incontrolados" en la figura 1. En cuanto a los diagnósticos, no todas fueron enfermedades peroxisomales generalizadas y por tanto no siempre tenían una carencia de DHA manifiesta, por lo que no cabía esperar la misma efectividad del tratamiento. Sin embargo, por motivos humanitarios hemos aceptado a todos los pacientes, sin excluir a ninguno por razón de gravedad, edad, fenotipo o estado clínico. Esto incluye a tres enfermos con *NALD/IRD* en fase terminal,

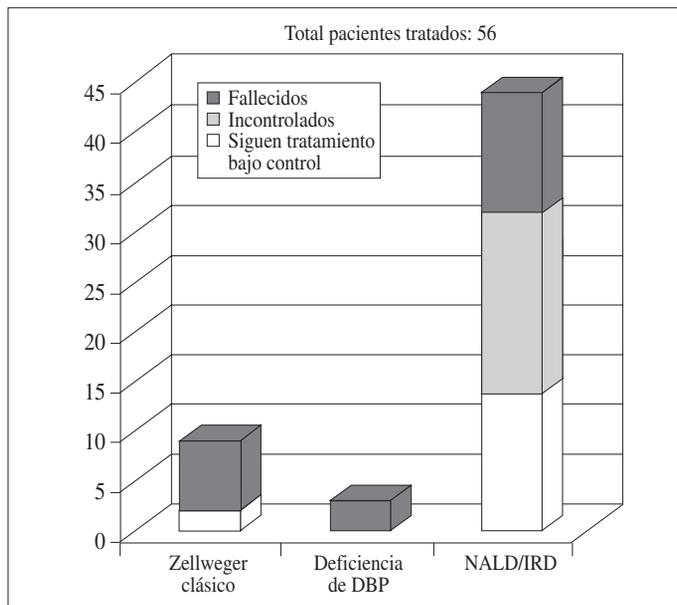


Figura 1. 56 pacientes con enfermedades peroxisomales clasificados por diagnóstico. Sin hacer distinciones por razón de fenotipo, gravedad o estado clínico, todos fueron tratados con DHA-EE (etil ester del ácido docosahexaenoico) por un tiempo variable. Los pacientes con síndrome de Zellweger clásico, todos muy gravemente afectados, sólo pudieron tratarse durante algunos meses, aunque dos aún sobreviven. Los tres enfermos con deficiencia de DBP fallecieron. De los 34 pacientes con NALD/IRD (adrenoleucodistrofia neonatal/enfermedad de Refsum infantil), sólo 16 siguen aún tratamiento con DHA-EE controlado por nosotros. Otros (especialmente los que más mejoraron) han preferido seguir con una dieta rica en pescado u otros preparados de DHA, y se cuentan entre los "incontrolados".

nueve pacientes con síndrome cerebro-hepato-renal de Zellweger clásico, así como tres con deficiencia de enzima bifuncional (*D-bifunctional protein, DBP*) y otro muy afectado con dudosa carencia de DHA y aún no clasificado. Los pacientes con deficiencia de *DBP* tienen un cuadro clínico y bioquímico totalmente diferentes del de los generalizados. Sus parámetros somáticos y sus plasmalógenos son normales y creemos que no tienen una real carencia de DHA. Son niños que se desarrollan muy bien desde el punto de vista pondoestatural, a pesar de lo cual su cuadro clínico suele ser tan grave como el del Zellweger clásico.

5. MEDICACIÓN Y DIETA

El preparado utilizado como medicación ha sido siempre el ester etílico del ácido docosahexaenoico (DHA-EE), producto de una pureza superior al 90% obtenido mediante sucesivas ayudas de investigación de los *National Institutes of Health* (NIH, Bethesda, EE.UU.). El producto puro se ha administrado diluido en aceite de oliva como excipiente, en monodosis de administración diaria, preparadas en condiciones estériles y bajo atmósfera de nitrógeno en viales herméticos conteniendo 200 mg DHA-EE en un volumen total de 2 ml. Los viales se han mantenido siempre congelados, incluso durante el transporte, hasta el momento de su administración. La dosis diaria se ha calculado en base a la carencia y no al peso del paciente teniendo en cuenta que, cuanto más joven es el enfermo, mayores son sus necesi-

Tabla I. *Exitus* clasificados por diagnóstico, fenotipo y estado clínico

Síndrome de Zellweger clásico	7
Insuficiencia DBP	3
NALD/IRD, fase terminal	3
NALD/IRD, fallo suprarrenal agudo por infección intercurrente	3
NALD/IRD, causa desconocida	6

dades de DHA. Una dosis diaria de 200 mg/día ha sido la generalmente adoptada, por ser suficiente para normalizar los niveles de DHA en sangre rápidamente en los pacientes, sin ser excesiva en cuanto a sus posibles efectos inhibitorios sobre la síntesis de DHA, ni causar desequilibrios con otros ácidos grasos. Otro punto importante a subrayar es que la dieta no ha consistido en restringir las grasas sino que, por el contrario, ha estado constituida por una alimentación completa y lo más nutritiva posible. Sólo como medida de precaución, se ha procurado eliminar las verduras de hojas, pero el resto de vegetales y todas las frutas se han administrado libremente. Se ha permitido toda clase de carnes, pescados y huevos, así como lácteos completos y sus derivados. Sólo se ha tenido cuidado en eliminar la grasa de la carne.

6. RESULTADOS

La figura 1 resume el diagnóstico y evolución de los 56 enfermos tratados y la tabla I muestra los *exitus* clasificados por diagnóstico y situación clínica como causas que más probablemente condujeron a una falta de respuesta terapéutica. De ellos, siete tenían SZ clásico. En realidad, el síndrome de Zellweger verdadero no tiene tratamiento, al menos por ahora. Estos niños nacen ya demasiado afectados para que pueda obtenerse beneficio de ningún tratamiento. Además, esta enfermedad parece ser diferente en varios aspectos. Aparte de la total carencia de plasmalógenos, hay otras diferencias bioquímicas. Los lípidos y el colesterol, disminuidos en los otros fenotipos, son en el SZ normales y la carencia de DHA no es tan marcada. El pronóstico es siempre letal a corto plazo en estos pacientes. De las tres enfermas con *NALD/IRD* en fase terminal, una tenía 3 años y estaba ya en estado vegetativo, pudiendo recibir tratamiento con DHA-EE sólo durante unas 6 semanas en total⁽³⁰⁾. Otra era una niña de 5 años con fallo hepático agudo y también en estado vegetativo que, a pesar de todo, sobrevivió varios años debido a la mejoría de su función hepática. La última era una lactante de 13 meses que estaba ya en un estado de deterioro neurológico y desnutrición tan profundos que no hubo forma de remontarla (Fig. 2), falleciendo a los pocos días de comenzar el tratamiento. Es importante subrayar que esta última paciente constituye un ejemplo clásico del daño que una dieta pobre en grasas y carente de DHA puede llegar a producir en estos enfermos⁽³¹⁾ (dieta que, lamentablemente, es la universalmente utilizada). Esta pequeña era hermana de otro paciente afecto de la misma enfermedad y, por lo tanto, el genotipo era el mismo. Sin embargo, su hermano tuvo la suerte de no ser diagnosticado y su dieta fue completa y variada. Sólo por ello, su estado nutricional y su desarrollo fueron mucho mejores,

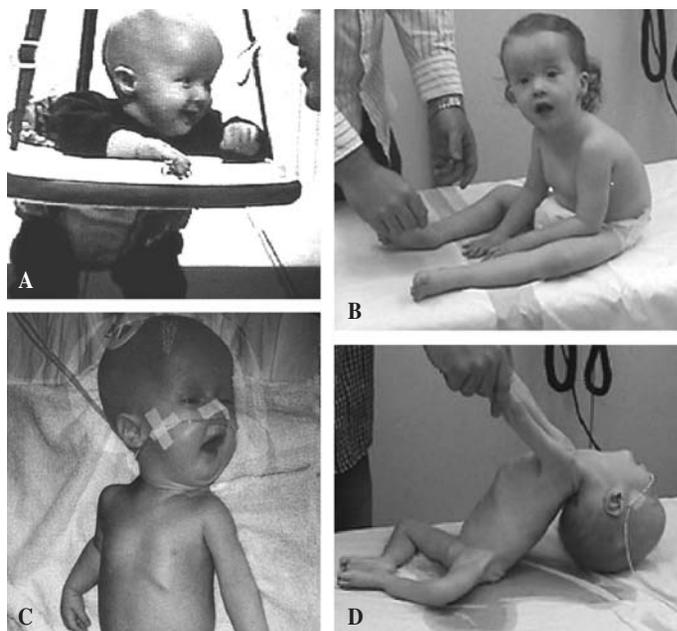


Figura 2. Dos hermanos con enfermedad peroxisomal. Su genotipo era, lógicamente, el mismo. Sin embargo, el hermano mayor (A, a los 8 meses de edad; B, a los 2 años) no fue diagnosticado y, por lo tanto, recibió una nutrición completa. En cambio, a su hermana menor se le diagnosticó la enfermedad muy tempranamente, lo que hizo que se la sometiera a una dieta estricta muy baja en grasas. No se le dio DHA, a pesar de que tenía una carencia severa de este ácido graso. En consecuencia, esta niña estaba ya muy enferma a los 6 meses de edad (C) y a los 13 meses (D) se encontraba en un estado terminal de profundo marasmo y deterioro neurológico; falleció en pocos días.

como puede apreciarse en las figuras 2A y B, a diferencia de su hermana, cuya muerte fue debida más a su estado de profundo marasmo que a la misma enfermedad (Fig. 2C y D). Entre los pacientes fallecidos, tres de ellos murieron a causa de un fallo suprarrenal fulminante en el curso de una repentina infección banal. Esto fue especialmente lamentable, ya que se trataba de niños que habían mejorado mucho de su enfermedad de base, uno de ellos de forma espectacular⁽³²⁾. La posibilidad de una insuficiencia suprarrenal aguda ante cualquier estrés debe siempre tenerse presente en estos pacientes y en todos se debe realizar un test del Synacthen para evaluar la respuesta de las suprarrenales al estímulo del ACTH. Si ésta es débil habrá que vigilar para poder administrar hidrocortisona en caso necesario. No tenemos constancia de las causas por las que los otros seis pacientes con *NALD/IRD* fallecieron en sus respectivos países. Sí sabemos que cuatro de ellos habían interrumpido el tratamiento con DHA-EE y que una paciente con grave afectación hepática, cuya función había mejorado mucho y había sobrevivido 12 años, finalmente falleció debido a complicaciones múltiples.

De los restantes pacientes tratados, hasta el momento de escribir este capítulo no hemos tenido constancia de ningún *exitus*, si bien sólo podemos responder de los 16 que siguen siendo controlados por nosotros y, por tanto, siguen en tratamiento con DHA-EE. Paradójicamente, varios pacientes de los que evolucionaron mejor durante los primeros años de tratamiento con el DHA-EE han preferido seguir la terapia con otros preparados de DHA más asequibles y no han podido seguir siendo controlados por nosotros.

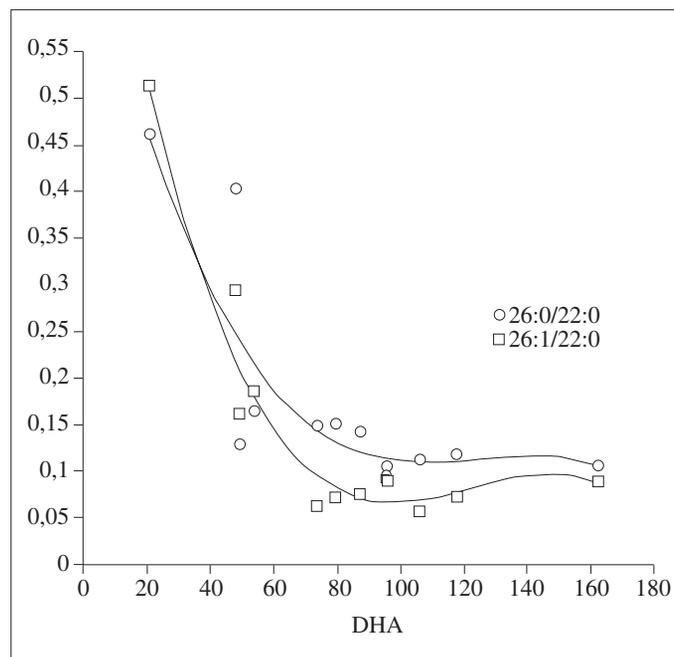


Figura 3. Típica evolución de los dos índices diagnósticos 26:0/22:0 y 26:1/22:0 en relación a los niveles de DHA en plasma de un paciente con *NALD/IRD*. Estos parámetros, así como las enzimas hepáticas, han presentado una clara correlación negativa con los niveles plasmáticos de DHA, disminuyendo significativamente a medida que aumentaba la concentración de DHA.

La mejoría más constante ha sido la normalización de los niveles de DHA y de la función hepática. Esta última pudo detectarse incluso en el síndrome de Zellweger verdadero. Otra mejoría bastante constante ha sido la disminución de los dos índices diagnósticos 26:0/22:0 y 26:1/22:0 en plasma. Esta mejoría bioquímica ha sido especialmente significativa si se considera el marcado aumento de grasas en la dieta que ha acompañado el tratamiento. Otra mejoría bioquímica inesperada ha sido el aumento de plasmalógenos en hematíes, especialmente del índice 18:0DMA/18:0, en paralelo con la normalización del DHA. Este aumento de plasmalógenos, a veces muy sutil, así como la disminución de los índices de *VLCFA*, se pueden ver más claramente si se correlacionan con los niveles de DHA, como puede observarse en los dos ejemplos de las figuras 3 y 4.

Clínicamente, el desarrollo pondoestatural ha mejorado mucho en aquellos pacientes que lo tenían más afectado. Paradójicamente, la abundante esteatorrea que tenían dos enfermos, sometidos previamente a una dieta desgrasada, desapareció en tan sólo tres semanas de tratamiento con DHA-EE y una dieta rica en grasas (Tabla II). Ello coincidió con una rápida mejoría hepática en ambos pacientes. Desde el punto de vista neurológico y sensorial la mejoría ha sido muy frecuente y significativa en los casos con variantes de Zellweger menos severas.

En general, el tono muscular, actividad y contacto social han mejorado claramente en la mayoría de los pacientes⁽³³⁻³⁵⁾. Un enfermo que comenzó a tomar DHA-EE a los 5 meses de edad^(34,35) y que presentaba un fallo importante del desarrollo pondoestatural y psicomotor, con pérdida de visión, mejoró espectacularmente en tan sólo 3 semanas, tanto desde el punto de vista hepatodi-

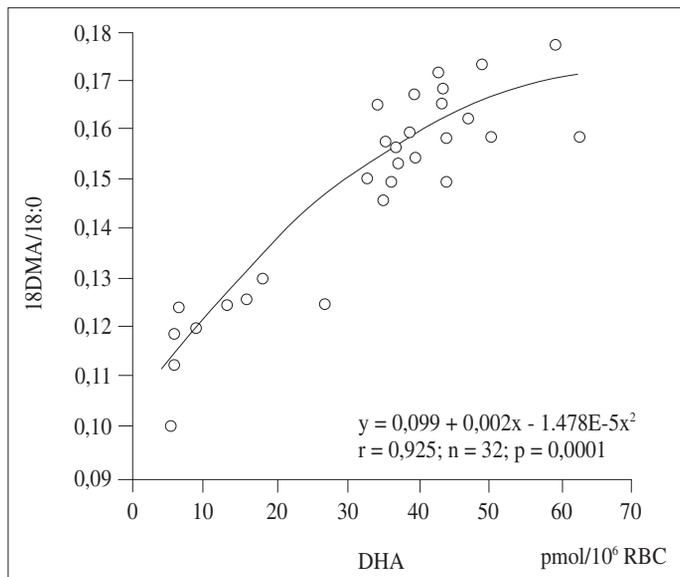


Figura 4. Evolución característica de los índices de plasmalógenos en hemátis de una enferma con NALD/IRD tratada con DHA-EE. Obsérvese cómo estos índices se normalizaron a partir del momento en que el DHA alcanzó un valor óptimo de unos 35 pmol/10⁶ células.

gestivo como pondoestatural y neurológico (Fig. 5A y 5B, Tabla II). A los 2 años (Fig. 5C) su aspecto era totalmente normal, su mielinización cerebral estaba ya casi completada (Fig. 6C) y su visión había mejorado, hasta permitirle apreciar objetos con muy poco contraste y color. La figura 5C muestra a este paciente a los 5 años de edad y en la figura 6D se puede ver el progreso de su mielinización cerebral hasta esa edad. A los 6 años, su audición pasó de 80 dB a 25-30 dB (sin audífonos). A los 9 años se le practicó un implante coclear. En la actualidad, tiene 11 años (Fig. 5D) y, aunque es autista, se comunica muy bien por ordenador. Es de destacar que, por este medio, está siendo capaz de seguir sus estudios en un colegio especializado, obteniendo muy buenas notas en varias asignaturas, e incluso ha conseguido algún premio.

Mención especial merece la mejoría visual de nuestros enfermos, que últimamente hemos podido comprobar de un modo objetivo mediante el estudio oftalmológico y electrofisiológico en 23 pacientes. Ya desde hace años, pudimos detectar una mejoría visual en varios pacientes. Una enferma que comenzó el tratamiento bastante tarde, cuando ya tenía una retinopatía pigmentaria y aparente ceguera total con desviación conjugada de la mirada hacia arriba⁽³³⁾, recuperó gran parte de la visión y ahora



Figura 5. Paciente con NALD/IRD que comenzó el tratamiento a los 5 meses de edad (A), cuando el niño presentaba un marcado retraso psicomotor, hepatopatía, esteatorrea y estacionamiento ponderal. A las 3 semanas de recibir el tratamiento con DHA-EE (B), el peso, estado general, función hepática y contacto social y visual habían mejorado claramente. La esteatorrea había desaparecido. C y D, muestran al mismo paciente a los 2 y a los 11 años de edad, respectivamente. Aunque es autista, en la actualidad, este paciente se comunica y estudia mediante ordenador, habiendo conseguido muy buenas notas en varias asignaturas y algunos premios.

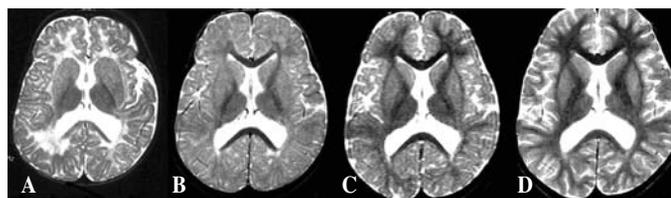


Figura 6. Resonancia magnética (RM) craneal potenciada en T2 del paciente mostrado en la figura 5, realizada a los 6 meses, 16 meses, 2 años y 5 años de edad (A, B, C y D, respectivamente).

Tabla II. Efectos iniciales del tratamiento con etil éster del ácido docosahexaenoico en dos pacientes con enfermedades peroxisomales generalizadas

Tiempo de tratamiento	Caso nº 2		Caso nº 10	
	Basal	3 semanas con DHA-EE	Basal	3 semanas con DHA-EE
Peso	5.070 g	6.010 g	5.630 g	6.260 g
Esteatorrea	++++	+	11,99%	5,78%
ALT	300	141	199	48
AST	459	238	384	90
GGT	123	40	41	20

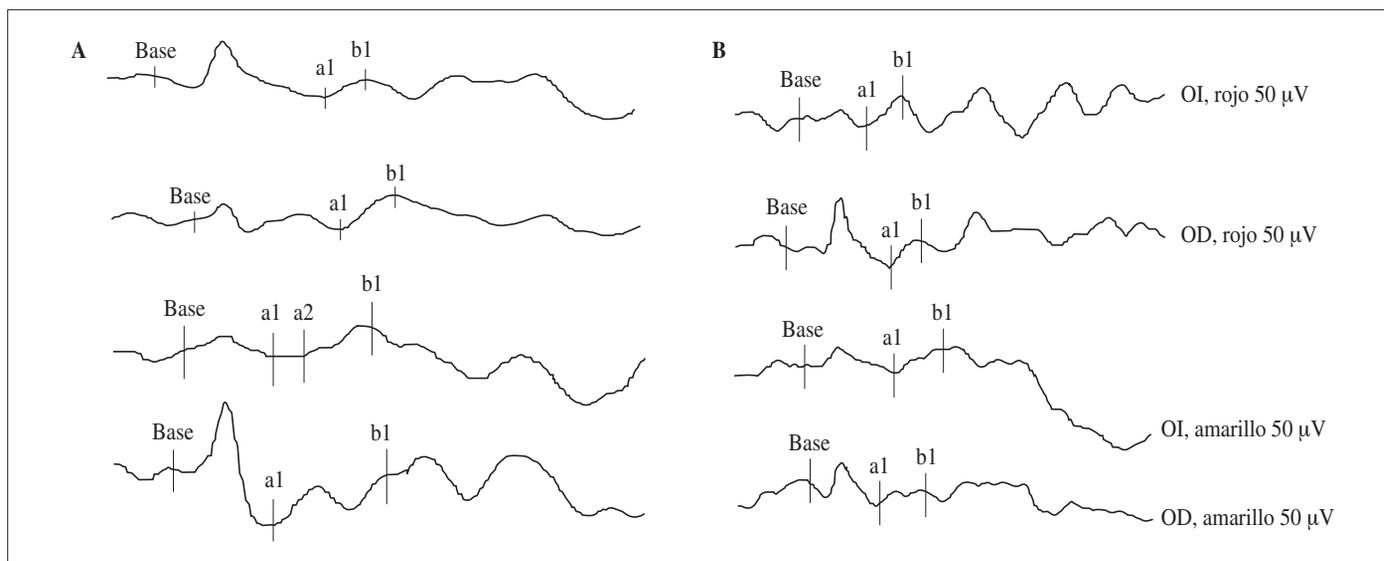


Figura 7. Paciente mostrado en la figura 5, con NALD/IRD y retinopatía pigmentaria invertida al examen del fondo de ojo. Obsérvese la clara mejoría en B (casi 9 años de edad) con respecto al trazado mostrado en A (5 años): hay una mejor morfología y mayor amplitud de las ondas, con normalización de las latencias. (OI: ojo izquierdo; OD: ojo derecho).

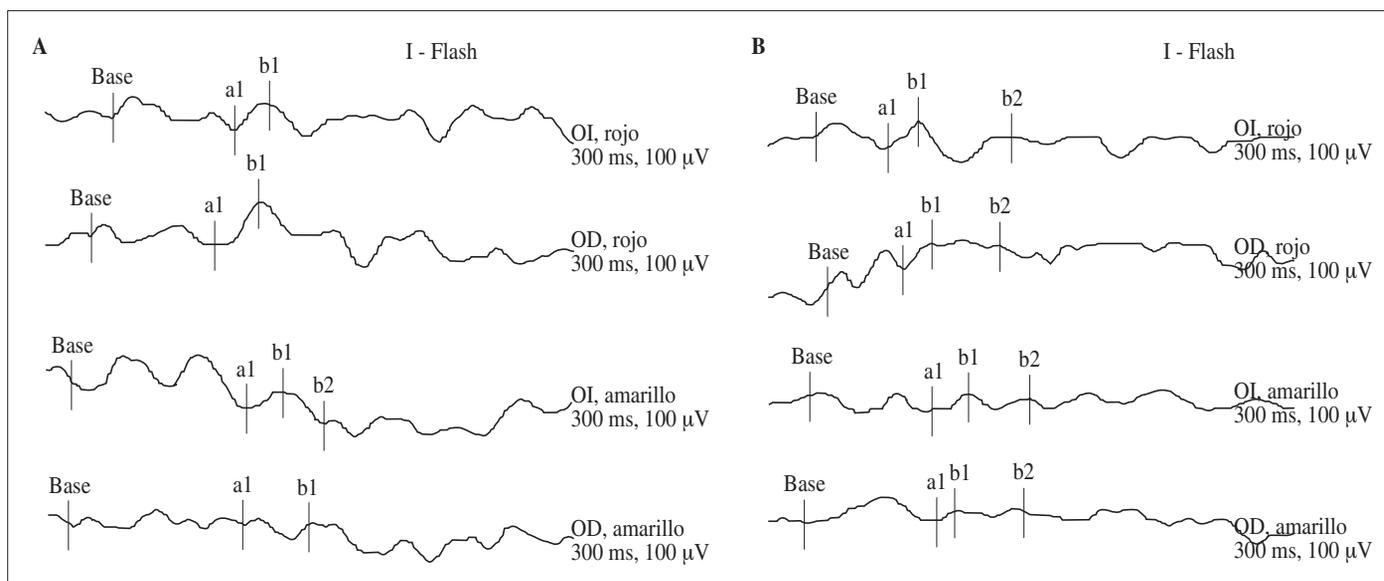


Figura 8. Evolución electroretinográfica del paciente mostrado en la figura 9. En A, a los 6 meses de edad. En B, a los 18 meses, después de un año de tratamiento con DHA-EE. Obsérvese la mejor morfología de las ondas a y b, así como la evidente disminución de las latencias. OI: ojo izquierdo; OD: ojo derecho.

puede defenderse con gafas. Esta niña ha alcanzado ya los 15 años de edad y está clínicamente estable. Otros pacientes, con una afectación visual probablemente aún más profunda, han conseguido sólo ver la luz. Evidentemente, la gran heterogeneidad de nuestros pacientes, tanto en cuanto al fenotipo como en cuanto a la edad al comienzo del tratamiento, ha influido grandemente en la efectividad del tratamiento sobre la visión, pero ha habido efectos objetivos constantes. En efecto, en los 23 pacientes en los que hemos podido efectuar un estudio oftalmológico completo en los últimos cinco años, el nistagmus ha desaparecido en el 100% de los casos y la agudeza visual se ha conservado inalterada. Al examen del fondo de ojo, el aspecto de la retina se ha mantenido

estable, excepto en un caso. En 6 de los enfermos a los que hemos podido seguir desde el principio del tratamiento, hemos detectado una clara mejoría del electroretinograma (ERG) y de los potenciales visuales evocados (VEP, *visual evoked potentials*), consistente en una mejoría en la morfología y amplitud de las ondas, y una disminución de las latencias. Dos ejemplos se muestran en las figuras 7 y 8. En la primera, se muestran los trazados de ERG practicados al paciente de la figura 5 en dos ocasiones. Como puede apreciarse, el ERG de este paciente, que había sido definido como “plano” inicialmente, presentó después evidentes ondas a y b, que han seguido mejorando en los últimos años. Otro paciente, que había estado severamente afectado al nacer (Fig.



Figura 9. Paciente con NALD/IRD que presentó graves problemas en el período neonatal, requiriendo su ingreso en la UCI (A). A los 6 meses de edad, el niño había mejorado bastante, aunque aún estaba muy hipotónico, con escaso desarrollo ponderal y déficit visual (B), momento en que comenzamos el tratamiento con DHA-EE. Al año de edad, la mejoría era evidente (C) y ha seguido avanzando hasta la actualidad (D, 2 años).

9A) y que mantenía una clara hipotonía y déficit visual a los 6 meses (Fig. 9B y 8A), mejoró rápidamente con el DHA-EE, tanto desde el punto de vista clínico (Fig. 9C y 9D) como desde el electrofisiológico (Fig. 8B).

Hay que subrayar que esta evolución visual positiva es la contraria que presentan estos enfermos, cuyos ERG, en los casos en que se han practicado, se han definido siempre como “planos” o “extinguidos”. En dicha evolución, ha tenido sin duda un papel relevante el contenido de DHA de la retina, cuya función en el proceso visual ha quedado suficientemente demostrada experimentalmente desde hace años⁽³⁶⁻³⁸⁾. En el ser humano, hay que recordar que la máxima acumulación cerebral de DHA y, por tanto, su período de máxima vulnerabilidad, se extiende desde las 32 semanas de gestación hasta los primeros meses de la vida⁽³⁹⁾, y en la retina el comienzo del período vulnerable es aún más precoz⁽⁴⁰⁾. En consonancia con ello, cabe esperar que los efectos de la terapéutica con DHA sean tanto más marcados cuanto más precozmente se inicie el tratamiento. Al menos, los casos que hemos tratado hasta ahora así lo indican.

La deambulación es una función muy difícil de adquirir en un enfermo peroxisomal, debido a la severa afectación motora unida a la poca actividad de estos pacientes y a problemas ortopédicos. Sin embargo, mediante el tratamiento con DHA-EE, unido a medi-

das fisioterapéuticas, hemos conseguido mejorías motoras y deambulación autónoma en varios casos. Estas mejorías se han correlacionado a menudo con la normalización de la mielina cerebral detectada por resonancia magnética^(16,34). Una de las pacientes, cuya mielina cerebral está normalizada desde los 3 años de edad y que estaba desde entonces caminando con ayuda, adquirió la marcha autónoma a los 7 años y ha cumplido ya los 15 años. Otro paciente que, cuando comenzó el tratamiento a los 15 meses estaba ya empezando a desmielinizarse, está andando sin ayuda desde los 4 años y su mielina cerebral es ahora prácticamente normal. Una paciente ciega, con una grave afectación hepática que mejoró espectacularmente durante el primer mes y que estuvo siguiendo el tratamiento desde los 6 meses de edad, comenzó a andar a los 3 años y llegó a ver la luz, con mejoría evidente en el ERG. Desgraciadamente, esta niña sufrió una serie de complicaciones hepáticas tardías posteriormente y falleció a los 12 años.

7. CONCLUSIONES

Los resultados del tratamiento con DHA indican que la carencia de este importante ácido graso poliinsaturado tiene un papel fundamental en la patogenia de las enfermedades peroxisomales generalizadas. El mero hecho de que los índices 26:0/22:0 y 26:1 ω 9/22:0, patognomónicos de la enfermedad, tiendan a normalizarse con el tratamiento sugiere una acción del DHA sobre la β -oxidación peroxisomal. En el mismo sentido apunta el aumento de plasmalógenos que acompaña a la normalización de los niveles de DHA. Pero, sobre todo, son las mejorías clínicas las que indican que, como mínimo, algunos de los síntomas de los enfermos peroxisomales van ligados a la carencia de DHA en las membranas celulares. El constante efecto beneficioso de la terapéutica con DHA sobre el funcionamiento hepático, así como la desaparición de la esteatorrea, sugieren una implicación profunda de la carencia de DHA en estos trastornos. Aunque el número de casos y la imposibilidad moral de realizar un estudio doble-ciego no permiten aún sacar conclusiones definitivas, la correlación inversa que existe entre el grado de mejoría clínica y la edad al comienzo del tratamiento subraya la importancia del DHA durante el desarrollo normal.

Especialmente relevante es la mejoría visual de nuestros pacientes, que últimamente hemos podido corroborar mediante el estudio oftalmológico y el electrofisiológico detallados en muchos de ellos. Las mejorías visuales obtenidas indican que la carencia de DHA tiene un importante papel patogénico en la retinopatía peroxisomal. Es obvio que, aunque no hubiera ningún otro factor causante de la ceguera en estos niños, una retina con un contenido de DHA casi nulo⁽²⁷⁾ no puede funcionar normalmente. Además, al ser el déficit visual de las enfermedades peroxisomales de origen mixto neuro-sensorial, el DHA ha podido también tener un efecto beneficioso sobre la mielinización de las vías ópticas, como hemos comprobado por RM cerebral en otros casos⁽¹⁶⁾.

Por todo ello se puede concluir que el tratamiento con DHA tiene importantes efectos beneficiosos en los pacientes con enfermedades peroxisomales generalizadas, tanto más marcados cuanto más joven es el paciente. El tratamiento debe pues instaurarse sin tardanza. Debe, además, tenerse muy en cuenta que se trata

de un tratamiento fisiológico, no de una droga. Lo que pretendemos es normalizar los patrones de ácidos grasos poliinsaturados, aportando el que es deficitario sin por ello afectar el equilibrio con otras familias de poliinsaturados. Por lo mismo, la dieta debe ser la normal para un niño en crecimiento, e incluso más nutritiva si cabe, a fin de contrarrestar las carencias acumuladas. Cualquier restricción en el aporte lipídico conllevaría una carencia adicional de DHA o, en caso de aportar este último como tratamiento exclusivo, provocaríamos además una carencia de los ácidos grasos de la serie omega-6 (especialmente del ácido araquidónico). Hay que tener en cuenta, asimismo, que la finalidad de la restricción de grasas es la disminución de los ácidos grasos de cadena muy larga, ácidos grasos que, como hemos visto, disminuyen de todos modos por el mero hecho de normalizar los niveles de DHA. Otro objetivo de la dieta pobre en grasas es disminuir el aporte de ácido fitánico, que es exclusivamente de origen exógeno. No obstante, el ácido fitánico (y el fitol, su precursor) está ampliamente extendido en la naturaleza y es imposible eliminarlo del todo sin desnutrir al niño gravemente. El remedio, pues, sería mucho peor que la enfermedad, sobre todo si se tiene en cuenta que el ácido fitánico no alcanza nunca en el niño peroxisomal niveles peligrosos parecidos a los detectados en la enfermedad de Refsum del paciente adulto. Además, hemos observado que tras una elevación inicial al introducir una dieta completa, los niveles de ácido fitánico tienden después a estabilizarse y, más tarde, a disminuir. En todo caso, siempre estaremos a tiempo de reducir la ingesta de algún alimento rico en ácido fitánico, en el supuesto de que los controles efectuados nos indiquen un aumento peligroso de este compuesto. En cambio, desnutrir *a priori* a un niño con una dieta restrictiva estricta es siempre sumamente peligroso, sobre todo si es un enfermo peroxisomal. El caso que ya hemos comentado de la figura 2 es lo suficientemente ilustrativo de esto.

En resumen, el tratamiento con DHA debe iniciarse lo más cerca posible del período neonatal, momento en que las necesidades de este ácido graso son máximas. Lógicamente, los enfermos menos afectados y tratados más precozmente serán los que respondan mejor al tratamiento. En el síndrome de Zellweger clásico, el daño está tan avanzado ya al nacimiento que posiblemente poco podremos hacer para mejorarlo. En cambio, en las variantes menos malignas el tratamiento con DHA-EE puede llegar a producir espectaculares mejorías. El tratamiento debe acompañarse de una dieta completa y debe controlarse bioquímicamente para ajustar las dosis de DHA y evitar desequilibrios con otros ácidos grasos. Así empleado, el tratamiento con DHA-EE produce importantes mejorías neurológicas y visuales en los enfermos menos severamente afectados, contribuyendo en todos los casos a mejorar el estado general y la calidad de vida.

8. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseamos agradecer aquí las repetidas becas de los *National Institutes of Health* (NIH, Bethesda, EE.UU.) que nos han proporcionado el etil éster de DHA (DHA-EE) empleado en el tratamiento de los enfermos. La especial ayuda de los Dres. Norman Salem, Jr. y Patricia Fair, ha sido muy efi-

caz en la obtención del DHA-EE procedente de los NIH y de otras fuentes (Harima Chemicals y Dr. Yoshihisa Misawa, Japón). Los laboratorios Pronova Biocare (Noruega) contribuyeron también con una pequeña cantidad de DHA-EE. Para la preparación de las monodosis de DHA-EE, hemos contado con la eficiente colaboración de mi ayudante I. Mougán en el Hospital Vall d'Hebron y, actualmente, con la de M. Guevara, del Servicio de Farmacia del Hospital de Bellvitge. Numerosos médicos y bioquímicos han colaborado en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes. En especial, agradecemos la colaboración de los neuropediatras M. Pineda, M.T. García-Silva, R. Vidal y A. Verdú, y de los neurofisiólogos M. Olesti, Conill, M. Pasqual y M. Tallada, así como la ayuda prestada por numerosos pediatras y enfermeras del Hospital Infantil Vall d'Hebron y de la Clínica Infantil Stauros.

BIBLIOGRAFÍA

1. Goldfischer S, Moore CL, Johnson AB, Spiro AJ, Valsmis MP, Wisniewski HK, et al. Peroxisomal and mitochondrial defects in the cerebro-hepato-renal syndrome. *Science* 1973; 182: 62-4.
2. Bowen P, Lee CSN, Zellweger H, Lindenberg R. A familial syndrome of multiple congenital defects. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1964; 114: 402-14.
3. Moser AE, Singh I, Brown FR 3d, Solish GI, Kelley RI, Benke PJ, et al. The cerebro-hepato-renal (Zellweger) syndrome: Increased levels and impaired degradation of very long chain fatty acids, their use in prenatal diagnosis. *N Engl J Med* 1984; 310: 1141-6.
4. Bakkeren JA, Monnens LA, Trijbels JM, Maas JM. Serum very long chain fatty acid pattern in Zellweger syndrome. *Clin Chim Acta* 1984; 138: 325-31.
5. Hajra AK, Bishop JE. Glycerolipid biosynthesis in peroxisomes via de acyl dihydroxyacetone phosphate pathway. *Am N Y Acad Sci* 1982; 386: 170-82.
6. Heymans HSA, Schutgens RBH, Tan R, van den Bosch H, Borst P. Severe plasmalogen deficiency in tissues of infants without peroxisomes (Zellweger syndrome). *Nature* 1983; 306: 69-70.
7. Poulos A, Sharp P, Fellenberg AJ, Danks DM. Cerebro-hepato-renal (Zellweger) syndrome, adrenoleukodystrophy and Refsum's disease; Plasma changes and skin fibroblast phytanic acid oxidase. *Hum Genet* 1985; 70: 172-7.
8. Singh H, Usher S, Johnson D, Poulos A. A comparative study of straight chain and branched chain fatty acid oxidation in skin fibroblasts from patients with peroxisomal disorders. *J Lipid Res* 1990; 31: 217-25.
9. Pedersen JI, Gustafsson J. Conversion of 3 α ,7 α ,12 α -trihydroxy-5 β -cholestanic acid into cholic acid by rat liver peroxisomes. *FEBS Lett* 1980; 121: 345-8.
10. Krisans SK, Thompson SL, Pena LA, Kok E, Javitt NB. Bile acid synthesis in rat liver peroxisomes: Metabolism of 26-hydroxycholesterol to 3 β -hydroxy-5-holenic acid. *J Lipid Res* 1985; 26: 1324-32.
11. Lazarow PB, Moser HW. Disorders of peroxisome biogenesis. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. 7th CD-ROM edition, New York: McGraw-Hill; 1997: records 38247-973.
12. Martínez M. Sintomatología clínica de las enfermedades peroxisomales generalizadas. *Rev Neurología* 1998; 28: S49-54.
13. Hanson RF, Szczepanick-van Leeuwen P, Williams GC, Grabowski G, Sharp HL. Defects of bile acid synthesis in Zellweger's syndrome. *Science* 1979; 203: 1107-8.

14. Wanders RJA, van Roermund CWT, van Wijland MJA, Heikoop J, Schutgens RBH, Schram AW, et al. Peroxisomal very long chain fatty acid β -oxidation in human skin fibroblasts: activity in Zellweger syndrome and other peroxisomal disorders. *Clin Chim Acta* 1987; 166: 255-63.
15. Santos MJ, Imanaka T, Shio H, Small GM, Lazarow PB. Peroxisomal membrane ghosts in Zellweger syndrome - aberrant organelle assembly. *Science* 1988; 239: 1536-8.
16. Martínez M, Vázquez E. MRI evidence that docosahexaenoic acid ethyl ester improves myelination in generalized peroxisomal disorders. *Neurology* 1998; 51: 26-32.
17. Moser AE, Singh I, Brown FR 3d, Solish GI, Kelley RI, Benke PJ, et al. The cerebro-hepato-renal (Zellweger) syndrome: increased levels and impaired degradation of very long chain fatty acids, their use in prenatal diagnosis. *N Engl J Med* 1984; 310: 1141-6.
18. Dry J, Pradaliere A, Canny M. Maladie de Refsum: Dix ans de régime pauvre en acide phytanique et phytol. *Ann Med Interne (Paris)* 1982; 133: 483-7.
19. Moser AB, Borel J, Odone A, Naidu S, Cornblath D, Sanders DB, et al. A new dietary therapy for adrenoleukodystrophy: biochemical and preliminary clinical results in 36 patients. *Ann Neurol* 1987; 21: 240-9.
20. Wilson GN, Holmes RG, Custer J, Lipkowitz JI, Stover J, Datta N, et al. Zellweger syndrome: diagnostic assays, syndrome delineation, and potential therapy. *Am J Med Genet* 1986; 24: 69-82.
21. Smeitink JMA, Beemer FA, Speel M, Donckerwolcke RAMG, Jakobs C, et al. Bone dysplasia associated with phytanic acid accumulation and deficient plasmalogen synthesis: a peroxisomal entity amenable to plasmapheresis. *J Inher Metab Dis* 1992; 15: 377-80.
22. Setchell KDR, Bragetti P, Zimmer-Nechemias L, Daugherty C, Pelli MA, Vaccaro R, et al. Oral bile acid treatment and the patient with Zellweger syndrome. *Hepatology* 1992; 15: 198-207.
23. Bjorkhem I, Blomstrand S, Glaumann H, Strandvik B. Unsuccessful attempts to induce peroxisomes in two cases of Zellweger disease by treatment with clofibrate. *Pediatr Res* 1985; 19: 590-3.
24. Martínez M. Polyunsaturated fatty acid changes suggesting a new enzymatic defect in Zellweger syndrome. *Lipids* 1989; 24: 261-5.
25. Martínez M. Severe deficiency of docosahexaenoic acid in peroxisomal disorders: a defect of Δ^4 -desaturation? *Neurology* 1990; 40: 1292-8.
26. Martínez M. Severe changes in polyunsaturated fatty acids in the brain, liver, kidney, and retina in patients with peroxisomal disorders. En: Bazan N (ed.). *Neurobiology of essential fatty acids*. New York: Plenum; 1992. p. 347-59.
27. Martínez M. Abnormal profiles of polyunsaturated fatty acids in the brain, liver, kidney and retina of patients with peroxisomal disorders. *Brain Res* 1992; 583: 171-82.
28. Martínez M, Mougán I, Roig M, Ballabriga A. Blood polyunsaturated fatty acids in patients with peroxisomal disorders. A multicenter study. *Lipids* 1994; 29: 273-80.
29. Martínez M. Treatment with docosahexaenoic acid favorably modifies the fatty acid composition of erythrocytes in peroxisomal patients. En: Coates PM, Tanaka K (eds.). *New developments in fatty acid oxidation*. New York: Wiley-Liss; 1992. p. 389-97.
30. Martínez M, Pineda M, Vidal R, Martín B. Docosahexaenoic acid - A new therapeutic approach to peroxisomal-disorder patients: experience with two cases. *Neurology* 1993; 43: 1389-97.
31. Martínez M. El síndrome de Zellweger. *Investigación y Ciencia*, marzo 2009. p. 8-9.
32. Martínez M. Polyunsaturated fatty acids in the developing human brain, erythrocytes and plasma in peroxisomal disease: therapeutic implications. *J Inher Metab Dis* 1995; 18 (Suppl. 1): 61-75.
33. Martínez M. Docosahexaenoic acid therapy in DHA-deficient patients with disorders of peroxisomal biogenesis. *Lipids* 1996; 31: S145-52.
34. Martínez M, Vázquez E, García Silva MT, Manzanares J, Bertran JM, Castelló F, et al. Therapeutic effects of docosahexaenoic acid ethyl ester in patients with generalized peroxisomal disorders. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 376S-85S.
35. Martínez M. Restoring the DHA levels in the brains of Zellweger patients. *J Mol Neurosci* 2001; 16: 225-32.
36. Neuringer M, Connor WE, Lin DS, Barstad L, Luck S. Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal omega 3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 4021-5.
37. Weisinger HS, Vingrys AJ, Sinclair AJ. The effect of docosahexaenoic acid on the electroretinogram of the guinea pig. *Lipids* 1996; 31: 65-70.
38. Heinemann KM, Waldron MK, Bigley KE, Lees GE, Bauer JE. Long-chain (n-3) polyunsaturated fatty acids are more efficient than alpha-linolenic acid in improving electroretinogram responses of puppies exposed during gestation, lactation, and weaning. *J Nutr* 2005; 135: 1960-6.
39. Martínez M. Tissue levels of polyunsaturated fatty acids during early human development. *J Pediatr* 1992; 120: S129-38.
40. Martínez M, Gil-Gibernau JJ, Ballabriga A. Lipids of the developing human retina: I. Total fatty acids, plasmalogens, and fatty acid composition of ethanolamine and choline phosphoglycerides. *J Neurosci Res* 1988; 20: 484-90.