

D493

H42.43

Manuela Martínez

**HALLAZGO DE UNA NUEVA ANOMALIA
BIOQUIMICA EN LOS ERRORES
CONGENITOS DEL METABOLISMO
PEROXISOMAL Y
NUEVO TRATAMIENTO ENCAMINADO A
PREVENIR LAS DEFICIENCIAS
NEUROLOGICAS Y VISUALES**

HALLAZGO DE UNA NUEVA ANOMALÍA BIOQUÍMICA EN LOS ERRORES CONGÉNITOS DEL METABOLISMO PEROXISOMAL Y NUEVO TRATAMIENTO ENCAMINADO A PREVENIR LAS DEFICIENCIAS NEUROLÓGICAS Y VISUALES

AUTORA: Manuela Martínez. Laboratorio de Lípidos y Desarrollo Cerebral Humano. Centro de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. Hospital Materno-Infantil Valle de Hebrón. Pº Valle de Hebrón 119-129. 08035 Barcelona. Tlfno. 934894065. Correo electrónico: mmartinez@cinet.fcr.es

DOCUMENTOS 49/98 (Circulación institucional)

. **Memoria de la labor de investigación galardonada con la dotación para España de los Premios Reina Sofía 1998, de Investigación sobre Prevención de las Deficiencias.**

. **EDITA:** Real Patronato de Prevención y de Atención a Personas con Minusvalía.

. **CUIDADO DE LA EDICIÓN Y DISTRIBUCIÓN:** SIIS. Centro de Documentación e Información, concertado con el Real Patronato de Prevención y de Atención a Personas con Minusvalía. Serrano, 140. 28006 Madrid. Tlfno. 914115500 – Fax. 914115502- Correo electrónico: rp@futurnet.es

. **IMPRIME:** Artegraf. Sebastián Gómez 5. 28026 Madrid.

. **Primera edición:** Diciembre de 1998. 1.000 ejemplares

Depósito Legal: M. 2.882 - 1999.

INDICE

	Páginas
PALABRAS INTRODUCTORIAS	9
ANTECEDENTES AL TEMA DE INVESTIGACIÓN ACTUAL	13
DESARROLLO CEREBRAL HUMANO NORMAL.	
IMPACTO DE LA MALNUTRICIÓN:	
PROBABLES CONSECUENCIAS NEUROLÓGICAS	
- Desarrollo cerebral normal y período crítico de máxima vulnerabilidad.....	13
- Período crítico en la especie humana. Mielinización	14
- Estudio de la mielina pura del cerebro humano durante el desarrollo normal del sistema nervioso central	25
- Estudio de la mielina producida durante la malnutrición	36
- Acidos grasos durante el desarrollo normal del cerebro y cerebelo humanos. Implicaciones de tipo nutricional	38
- Estudio de los patrones de ácidos grasos de los diversos fosfolípidos cerebrales durante el desarrollo normal	45

- Estudio de la composición en ácidos grasos del hígado y cerebro en niños alimentados parenteralmente con una alta proporción del ácido linoleico50

- Desarrollo de la retina humana. Composición en ácidos grasos de los principales fosfolípidos. Influencia de la malnutrición55

- Influencia de la nutrición en los patrones de ácidos grasos de los hematíes58

LABOR INVESTIGADORA ACTUAL EN RELACIÓN
A LA PREVENCIÓN DE LAS DEFICIENCIAS61

DESARROLLO CEREBRAL HUMANO PATOLÓGICO
INVESTIGACIONES RELACIONADAS CON LAS
ENFERMEDADES PEROXISOMALES

- Introducción61

HALLAZGO DE UNA NUEVA ANOMALIA BIOQUÍMICA
EN PACIENTES CON ENFERMEDADES PEROXISOMALES68

- Ácidos grasos de glicerofosfolípidos en el cerebro de
pacientes con enfermedades peroxisomales generalizadas75

TRATAMIENTO CON ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO EN LOS
 PACIENTES CON ENFERMEDADES PEROXISOMALES GENE-
 RALIZADAS79

- Resultados del tratamiento con DHA80
- Conclusiones110
- Perspectivas futuras112

REFERENCIAS117

Nomenclatura empleada127

PALABRAS INTRODUCTORIAS

El presente trabajo es el resultado de largos años de investigación en el terreno de la neuroquímica del desarrollo, con especial referencia a los cambios que tienen lugar en los lípidos y ácidos grasos poliinsaturados a lo largo de la sinaptogénesis y mielinogénesis del cerebro humano. Fue el trabajo continuado dentro de esta línea de investigación básica lo que me condujo, hace ya once años, a hallar una nueva anomalía bioquímica en el síndrome de Zellweger y otras enfermedades peroxisomales generalizadas, hallazgo que a su vez me impulsó a ensayar un nuevo tratamiento para estos gravísimos enfermos.

A pesar de los muchos años que llevo en el laboratorio, nunca he olvidado mi formación pediátrica, la cual ha guiado siempre mis estudios de investigación. Es por ello por lo que, aún reconociendo la importancia de la experimentación animal, siempre he preferido estudiar directamente lo que ocurre en el cerebro humano en desarrollo. Ha sido así como he comprobado lo que puede llegar a suceder en el cerebro y la retina del niño cuando la alimentación no es adecuada, y así también, como he encontrado una probable relación patogenética entre el ácido docosahexaenoico y la dismielinogénesis del cerebro peroxisomal.

Quiero expresar aquí mi reconocimiento a la Dra. Carmen Conde y al Dr. Angel Ballabriga por haber influido decisivamente en mi trayectoria profesional. La Dra. Conde fue la iniciadora de los estudios sobre lípidos durante el desarrollo cerebral humano y a ella se deben los primeros datos que demuestran que el desarrollo bioquímico del cerebro comienza después de las 28-31 semanas de gestación. El Dr. Ballabriga ha sido siempre un gran entusiasta de la investigación en pediatría y fue el responsable de que yo me dedicase de lleno a esta actividad. En su momento, sentí que me desviase de la pediatría clínica, actividad que practicaba por vocación. Ahora se lo agradezco. Ha sido precisamente la investigación de laboratorio la que me ha vuelto a llevar a la práctica pediátrica, en un terreno para mí apasionante.

Una mención especial merece el Dr. Jordi Marsal, Catedrático de Biología Celular de la Universidad de Barcelona, por su siempre desinteresado y continuado apoyo. El fue quien me introdujo en el estudio por microscopía electrónica de la mielina humana en desarrollo y sus amplios conocimientos de neuroquímica han sido siempre de gran ayuda para mí. En este mismo terreno, también he aprendido mucho del Dr. William T. Norton, Profesor del Albert Einstein College of Medicine de Nueva York y pionero en el estudio bioquímico de la mielina. Con él

estudié las proteínas mielínicas y a él debo el haber conseguido aislar mielina pura del cerebro humano al inicio de su mielinización.

Debo agradecer también aquí de un modo especial la ayuda del Dr. Norman Salem, de los National Institutes of Health (NIH, Bethesda, EEUU), del Dr. Hugo Moser, del Kennedy-Krieger Institute (Baltimore, EEUU), de la Dra. María Antonia Monedero, del Ministerio de Sanidad y Consumo, y de mi enfermera Isabel Mougán. El primero me ha apoyado siempre en mi trabajo, facilitándome, mediante becas renovadas repetidamente, el etil ester del ácido docosaheptaenoico (DHA-EE) para el tratamiento de mis pacientes. Al Dr. Moser, primera autoridad mundial en el terreno de las enfermedades peroxisomales, le debo consejo y apoyo. La Dra. Monedero, a través de su “Línea Caliente”, ha colaborado siempre eficazmente en la agilización de los trámites necesarios para la instauración rápida del tratamiento en los enfermos peroxisomales. Sin la eficaz ayuda de Isabel Mougán no hubiera podido realizar gran parte de mi trabajo.

Finalmente, quiero también agradecer el apoyo del Dr. Xavier Trías, anterior Conseller de Sanidad y actual Conseller de la Presidencia de la Generalidad de Cataluña, que ha hecho posible el tratamiento en nuestro hospital de niños procedentes del extranjero, y la eficaz ayuda del Dr. José Cuervo, Gerente de la Ciudad Sanitaria Valle de Hebrón y de la Dra. Alicia Granados, Directora de la Agencia de Evaluación de

Tecnología Médica, que han facilitado mi vuelta a las tareas pediátricas. Finalmente, quiero también agradecer aquí la importante colaboración de la neurorradióloga, Dra. Elida Vázquez, y del equipo de pediatras del Hospital infantil Valle de Hebrón, que han contribuido eficazmente al estudio de mis enfermos peroxisomales.

El presente escrito trata de resumir el trabajo a lo largo de todos estos años. Dada la homogeneidad de los estudios que resume, siempre dentro de una misma línea de investigación sobre lípidos, nutrición y desarrollo cerebral humano, comenzaremos brevemente por los primeros trabajos de investigación, para terminar con lo referente a las enfermedades peroxisomales y su tratamiento.

ANTECEDENTES AL TEMA DE INVESTIGACION ACTUAL

DESARROLLO CEREBRAL HUMANO NORMAL. IMPACTO DE LA MALNUTRICIÓN SOBRE EL DESARROLLO CEREBRAL: PROBABLES CONSECUENCIAS NEUROLÓGICAS

Desarrollo cerebral normal y período crítico de máxima vulnerabilidad

Durante las primeras fases del desarrollo, el crecimiento en peso del encéfalo no es lineal sino que experimenta un brusco impulso en un determinado momento, que varía en las distintas especies animales. Es lo que Dobbing denomina “brain growth spurt” (1). Durante este tiempo, y paralelamente al crecimiento en peso, tienen lugar una serie de cambios bioquímicos dramáticos que marcan el desarrollo estructural del sistema nervioso central (SNC). Es en este momento cuando agresiones de tipo nutricional pueden interferir con el proceso madurativo normal del encéfalo, produciendo alteraciones que pueden llegar a ser irreversibles.

Por ello, esta fase del desarrollo encefálico se considera un período de máxima vulnerabilidad dentro del desarrollo del SNC. Una característica importante del “período vulnerable” es su fijeza cronológica. Es decir, el encéfalo tiene una sola oportunidad de crecer correctamente, que no puede ser recuperada en ningún otro momento (2). En la especie humana, este período comienza durante la segunda mitad de la vida intrauterina y se extiende hasta el inicio de la vida postnatal, siendo en su conjunto un proceso perinatal, como también lo es en el cerdo. En el cobayo, por el contrario, el “spurt” del desarrollo encefálico es enteramente prenatal y en la rata es postnatal. Por lo tanto, cuando se trata de extrapolar resultados, hay que tener siempre muy en cuenta estos períodos de crecimiento máximo, más bien que las edades prenatales o postnatales, aunque sean relativas

Período crítico en la especie humana. Mielinización

Las estructuras nerviosas que se forman durante este período son precisamente las más elaboradas y que distinguen a la especie humana dentro del reino animal. Durante este tiempo, tienen lugar en el cerebro

humano la rápida formación de arborizaciones dendríticas y de conexiones sinápticas y el comienzo de la mielinización (3). Cuando inciden dentro de este período crítico, la desnutrición, malnutrición o, simplemente, un desequilibrio en el aporte de ácidos grasos esenciales pueden tener un efecto deletéreo sobre la maduración encefálica, especialmente sobre la mielinogénesis. Por ello, era importante tratar de fijar los límites de este período de máxima vulnerabilidad para el SNC humano en desarrollo mediante parámetros bioquímicos, trabajo que hemos venido desarrollando desde 1974. Entre estos parámetros, los lípidos son buenos marcadores de algunos de los procesos más importantes que tienen lugar en el SNC. El encéfalo, y en especial la mielina, son estructuras muy ricas en lípidos y algunos de estos lípidos, que se hallan en el SNC a concentraciones muy superiores a las que se encuentran en otros tejidos, pueden servirnos para trazar determinados procesos madurativos a nivel bioquímico. Así sucede, por ejemplo, con galactolípidos tales como los cerebrósidos y sulfátidos, cuya elevada concentración, casi exclusiva en la mielina y sustancia blanca, los hace excelentes marcadores del proceso de mielinización. Otros lípidos mielínicos que se han empleado para trazar la mielinización son los plasmalógenos y el colesterol, si bien su especificidad como lípidos mielínicos es muy inferior a la de los galactolípidos. Entre los lípidos

neuronales, los gangliósidos son relativamente específicos y los fosfolípidos ricos en ácidos grasos poliinsaturados se encuentran especialmente concentrados en las membranas neuronales y de las células fotorreceptoras de la retina.

En la rata, el crecimiento químico y ponderal del encéfalo es postnatal y, dentro del mismo, el cerebelo es el que muestra un crecimiento más rápido. Logicamente, ello da como consecuencia que, para ciertos parámetros como el peso y el DNA, el cerebelo de la rata sea más vulnerable que el cerebro ante las agresiones nutricionales que puedan ocurrir durante el periodo crítico (4). Para los lípidos mielínicos, en cambio, las tres partes del SNC de la rata, cerebro, cerebelo y tronco cerebral, resultan afectadas más uniformemente (5). Este período de máxima vulnerabilidad se ha fijado para la rata dentro de los 10-20 días después del nacimiento que, extrapolando a la especie humana según las diferentes cronologías de crecimiento encefálico, corresponderían a los primeros 6 meses de la vida del niño.

No obstante, en nuestros estudios sobre el desarrollo normal pudimos demostrar que no es exactamente así en el cerebro humano, el cual comienza su “spurt” bioquímico ya en la vida prenatal (6), concretamente a las 32 semanas de gestación (7,8), coincidiendo con el

CEREBRO : NANA LIPIDICO

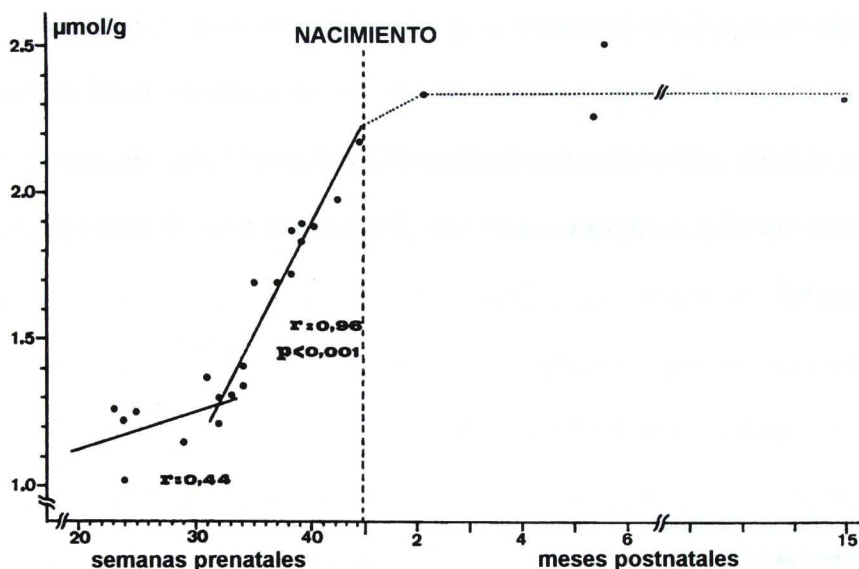


Fig. 1. Concentración de gangliósidos (medidos como ácido siálico o N-acetilneuramínico total) en el cerebro humano durante el desarrollo

rápido desarrollo de las sinapsis. Este inicio brusco del desarrollo sináptico queda claramente reflejado bioquímicamente cuando se estudia el perfil madurativo de los gangliósidos cerebrales, cuantificados como ácido siálico total. En efecto, en la gráfica correspondiente (Fig. 1), se aprecia una inflexión brusca, con un aumento muy significativo de la concentración de gangliósidos a partir de las 32 semanas de gestación. A este respecto, fué interesante constatar la marcada coincidencia entre nuestros estudios

bioquímicos y los morfológicos de D.P. Purpura (9) en cuanto al momento exacto en que comienza el explosivo desarrollo neuronal en la especie humana: precisamente a las 32 semanas de vida intrauterina. Como el mismo Purpura subtítulo en una de sus brillantes conferencias sobre el tema (Albert Einstein College of Medicine, 1975), en el feto humano “la vida comienza con la vida del cerebro, a las 32 semanas de gestación”.

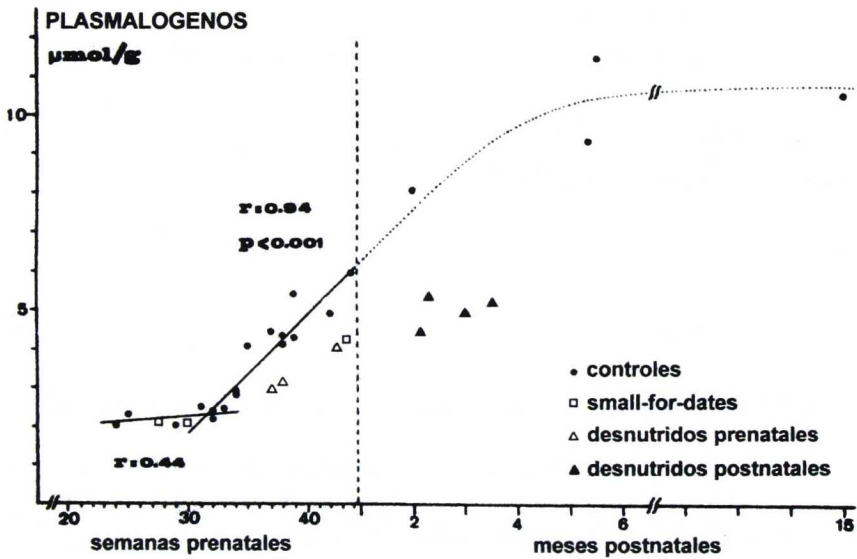


Fig. 2. Concentración de plasmalógenos durante el desarrollo cerebral normal y en un grupo de niños desnutridos durante el período vulnerable. Nótese que la desviación de la normalidad fué tanto más importante cuanto más prolongada fué la agresión nutricional.

Una vez que el desarrollo dendrítico y sináptico está prácticamente finalizado, comienza ya en el cerebro humano la mielinogénesis. En un estudio posterior (10) efectuado durante el desarrollo normal del SNC en distintas condiciones de nutrición, vimos que los plasmalógenos, lípidos preferentemente mielínicos que comienzan su “spurt” bioquímico después de las 32 semanas de gestación, se afectan más que los gangliósidos cuando las condiciones nutricionales son adversas (Fig. 2). Posteriormente, al estudiar los galactolípidos (cerebrósidos y sulfátidos), que son marcadores de mielina mucho más específicos que los plasmalógenos, hallamos valores prácticamente nulos de estos lípidos en el cerebro hasta casi el final de la gestación (11). Es en este momento, a las 36-37 semanas de edad gestacional, cuando los oligodendrocitos cerebrales, ya suficientemente maduros, comienzan a producir mielina. En efecto, el inicio de la mielinización queda claramente reflejado bioquímicamente en el rápido acúmulo de galactolípidos que tiene lugar a partir de las 36 semanas de edad gestacional (Fig. 3). Al comparar nuestros datos en el encéfalo humano con los obtenidos en la rata por otros autores (11), vimos que el cerebro del niño sigue acumulando galactolípidos a gran velocidad durante el primer año de vida, mientras que en el cerebelo la acreción de galactolípidos se enlentece ya considerablemente a partir del nacimiento (Fig.3).

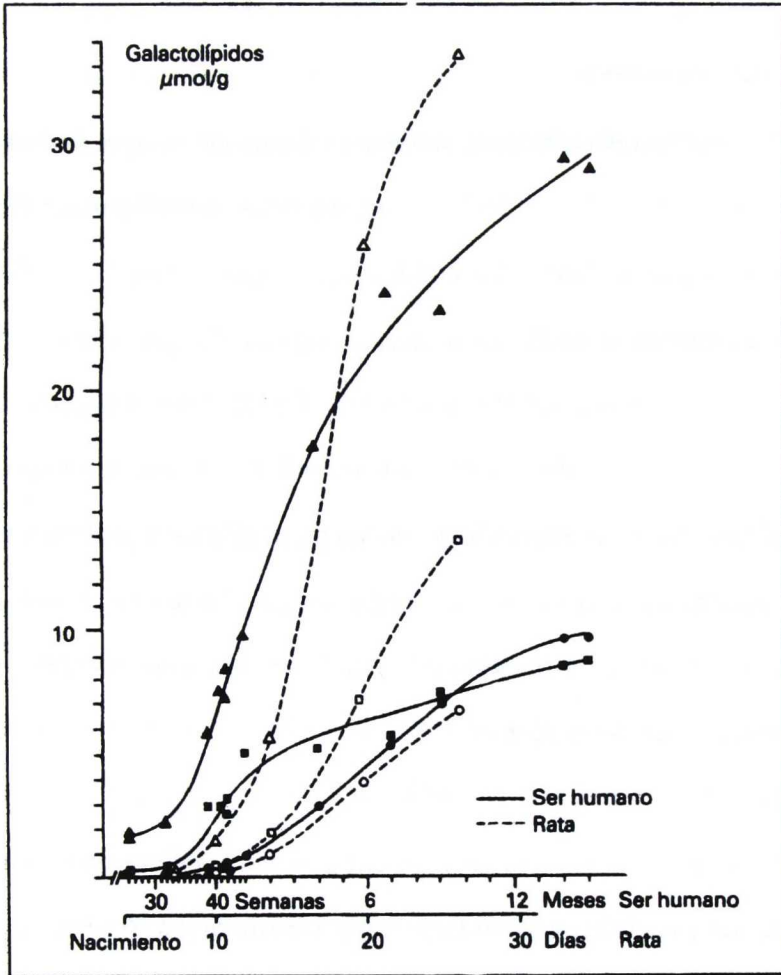


Fig. 3. Acreción de galactolípidos en el encéfalo del niño y de la rata durante el desarrollo. La comparación se ha hecho teniendo en cuenta los distintos "brain growth spurts" del hombre y la rata. Nótese que los perfiles cerebrales son muy paralelos en las dos especies, mientras que los del cerebelo se cruzan. En la rata, los galactolípidos se acumulan siempre a velocidad superior en el cerebelo que en el cerebro. En el niño, sucede lo contrario. En ambas especies, el tronco cerebral es el que tiene mayores niveles de galactolípidos, como corresponde a una estructura muy mielinizada.

Como resultado de este trabajo pudimos deducir que, en contraste con lo que sucede en la rata, el cerebro del niño se mieliniza mucho más rápidamente durante este período que el cerebelo que, al igual que el tronco cerebral, comienza a formar mielina ya en la vida prenatal. En consecuencia y siguiendo la hipótesis del período vulnerable de Dobbing, cabía esperar que, también a diferencia con lo que sucede en la rata, en la especie humana el cerebro estuviera más expuesto a la desnutrición que el cerebelo, cosa que pudimos comprobar en el mismo estudio (Fig. 4). En un trabajo posterior (13) obtuvimos resultados muy similares con otro marcador mielínico, el enzima 2',3'-nucleótido cíclico fosfohidrolasa (CNP), cuyos perfiles de desarrollo en el cerebro y cerebelo humanos (Fig. 5) son casi idénticos a los de los galactolípidos. En este estudio pudimos también comprobar que los bajos niveles de galactolípidos hallados en el cerebro del niño desnutrido se debían a una reducción en la cantidad total de mielina, más bien que en su calidad. Como veremos en seguida, esto es lógico si se considera que el oligodendrocito del cerebro, al menos en la especie humana, produce desde el principio una mielina de características bioquímicas prácticamente definitivas. Efectivamente, al estudiar la fracción mielínica pura del cerebro humano durante el desarrollo del SNC, vimos que la mielina

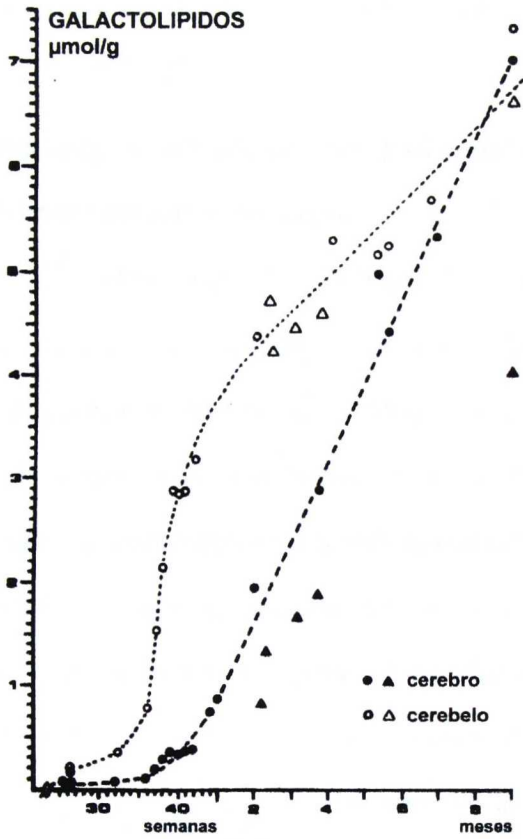
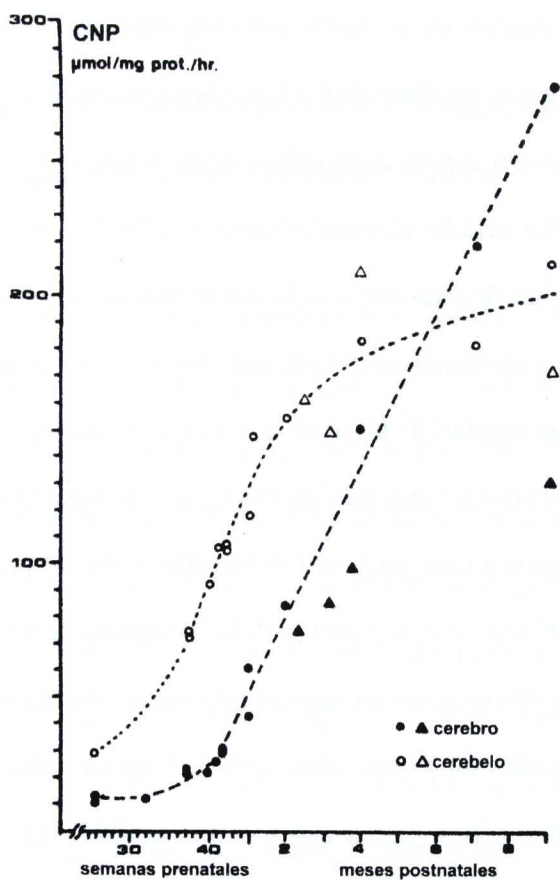


Fig. 4. Concentración de galactolípidos (cerebrósidos y sulfátidos) en el cerebro y cerebelo de niños bien nutridos y desnutridos durante el período vulnerable. Sólo en el cerebro la concentración de galactolípidos está realmente afectada, en proporción directa a la duración del período de desnutrición.



Fi. 5. Actividad del enzima marcador mielínico, 2',3'-nucleótido cíclico fosfohidrolasa en el cerebro y cerebelo humanos durante el desarrollo. Los círculos y triángulos llenos corresponden al desarrollo normal en niños bien nutridos, los vacíos, a los niños desnutridos.

depositada en el cerebro en las fases más tempranas de la mielinización tiene ya una composición bioquímica casi idéntica a la de la mielina madura (14), tanto en cuanto a proteínas como a lípidos, en claro contraste con lo que se había venido aceptando hasta la fecha (15-17). Es, pues, una consecuencia lógica de todo ello que la afectación de la mielinogénesis producida por la malnutrición consista más bien en una disminución de la cantidad que de la calidad de la mielina, como veremos seguidamente.

Las posibles consecuencias deletéreas de una hipomielinización, ocurrida en etapas tan tempranas del desarrollo, sobre el funcionalismo posterior del SNC son obvias y han podido comprobarse en el animal de experimentación. No se sabe con seguridad si estas alteraciones de la mielinización pueden ser recuperables con una buena nutrición, pero algunos datos en la rata sugieren que son irreversibles (18). En el hombre, la escasez de datos no permite sacar conclusiones. Incluso a nivel bioquímico, los datos relacionados con la mielinización son mínimos. Todo ello fué lo que nos impulsó a emprender un nuevo estudio en la fracción mielínica pura del cerebro humano en desarrollo.

Estudio de la mielina pura del cerebro humano durante el desarrollo normal del sistema nervioso central

Como hemos mencionado anteriormente, nuestros resultados demostraron que la mielina depositada en el cerebro en las fases más tempranas de la mielinización tiene ya una composición bioquímica prácticamente definitiva, en contraste con lo que se venía aceptando como consecuencia de los previos estudios en el animal de experimentación y en el neonato humano (16,17). ¿A qué se debe la discrepancia entre nuestros datos y los de otros autores en cuanto a la composición bioquímica de la mielina inmadura? A partir de resultados obtenidos en el animal de experimentación (15), se había aceptado que la llamada “early myelin” - o mielina primeramente formada en el cerebro durante el desarrollo - era físicamente diferente de la mielina definitiva del animal adulto. La mielina adulta es compacta, formada por múltiples lamelas cargadas de proteínas y lípidos específicos, cuyo origen se encuentra en prolongaciones de la membrana plasmática del oligodendrocito maduro, que literalmente se arrollan alrededor del axón (Fig 6). Se ha calculado que cada oligodendrocito puede dar origen por día a una cantidad de mielina tal que equivale a más de tres veces su propio peso (19) y que un solo

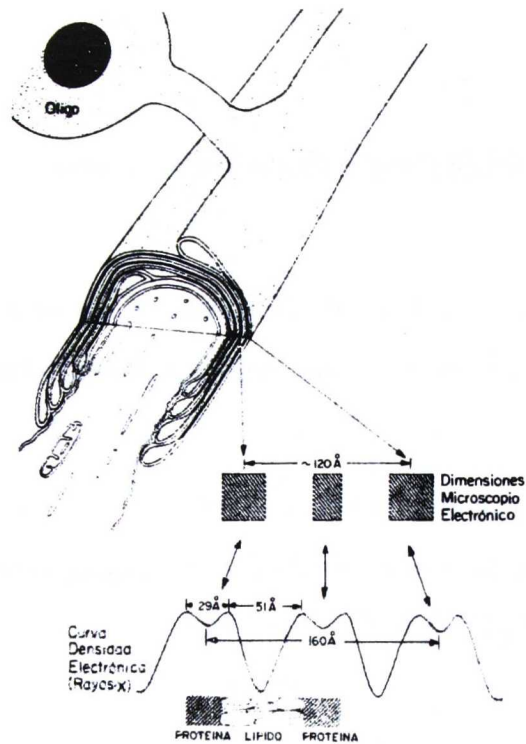


Fig. 6. El oligodendrocito formando mielina (tomado de la ref. 19).

oligodendrocito es capaz de mielinizar más de 40 axones procedentes de neuronas diferentes. Se cree que, al comienzo de la mielinización, la membrana plasmática del oligodendrocito, aún desprovista de lípidos específicos, se arrolla de un modo laxo alrededor del axón. Esta membrana no sería aún mielina verdadera. Lo será más tarde cuando, una vez cargada de lípidos mielínicos, forme las típicas lamelas compactas. En la mielina típica multilamelar, la yuxtaposición de las dos superficies internas de la

membrana oligodendrocitaria originará las líneas de mayor densidad al microscopio electrónico, llamadas líneas periódicas, y la unión de las dos superficies externas de dicha membrana formará las líneas menos densas, conocidas como intraperiódicas. La distancia entre dos líneas periódicas es fija, siendo en la especie humana de 120 amstrongs (Fig. 6).

Los resultados obtenidos en el animal de experimentación avalaban la hipótesis de una mielina primitiva laxa, muy diferente de la mielina final. En efecto, cuando se intentaba separar la fracción mielínica del resto de fracciones subcelulares en el cerebro de la rata en desarrollo, se obtenía en su lugar una fracción de membranas laxas que en nada se parecían a la mielina verdadera (15). A esta fracción se la denominó “myelin-like”. Como era de esperar, la composición bioquímica de estas membranas difería marcadamente de la hallada en la mielina verdadera.

Cuando comenzamos nuestro estudio, había muy pocos datos publicados sobre mielina humana durante el desarrollo. Dichos datos estaban en concordancia con los resultados de trabajos en animales, en cuanto a la existencia, también en el cerebro humano, de una mielina temprana muy diferente de la madura. Esto era especialmente evidente cuando se estudiaban las proteínas mielínicas (16,17). Al comienzo de nuestro estudio, efectuado en cerebro congelado, obtuvimos también

fracciones, aparentemente mielínicas, cuya composición lipídica y proteica eran totalmente atípicas. En especial, la proteína básica mielínica (MBP), que es altamente específica de la mielina y constituye más del 40% de sus proteínas, se hallaba en una proporción insignificante en nuestra “mielina” inicial. Esto estaba en concordancia con los pocos estudios realizados en mielina de neonato humano, que hallaban una proporción de MBP inapreciable o muy baja (16,17). Ante estos resultados y gracias al apoyo y consejo de William T. Norton (un pionero en el estudio de la mielina y profesor del Albert Einstein College of Medicine de Nueva York), emprendimos un segundo estudio en cerebro fresco, no congelado, cotejando tres métodos diferentes de separación para tratar de aclarar si nuestra fracción “myelin-like” correspondía verdaderamente a la “early myelin”, es decir, a la primera mielina formada en el cerebro del niño, o más bien se debía a un problema metodológico o de degradación (13,14).

Después de repetir los fraccionamientos subcelulares con tres métodos distintos, que incluían dos tipos de gradientes en sacarosa de diferente concentración y una simple etapa de flotación en sacarosa concentrada (0,85 M), conseguimos aislar del cerebro humano inmaduro una fracción mielínica cuya composición y aspecto eran totalmente diferentes de los hallados en la “early myelin” publicada por otros

investigadores y en nuestra primera “pseudomielina”. Efectivamente, la mielina que obtuvimos del cerebro no congelado era cuantitativamente muy escasa. En el recién nacido sólo pudimos aislar unos pocos miligramos de todo un hemisferio cerebral. Ello estaba totalmente en consonancia con el momento inicial de la mielinización que estábamos estudiando, momento en que la cantidad de mielina es casi inapreciable en el cerebro humano. Sin embargo, la pureza de la fracción mielínica era muy elevada, como pudimos comprobar por microscopía electrónica (ME) a pequeño aumento (Fig 7).

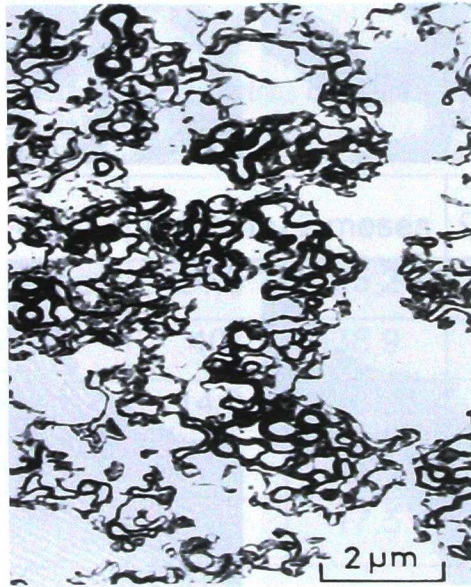


Fig. 7

Además, desde un punto de vista cualitativo, vimos que la calidad de nuestra mielina inicial correspondía más bien a la de una mielina madura. En efecto, a elevados aumentos encontramos por ME imágenes multilamelares compactas, donde se podían apreciar claramente tanto las líneas periódicas como las intraperiódicas (Fig.8-11).

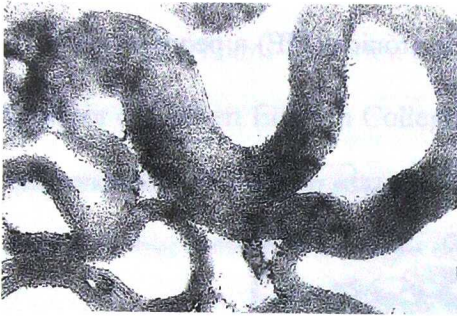


Fig. 8



fig. 9



Fig. 10



Fig. 11

En concordancia con ello, la composición bioquímica de esta mielina primera, supuestamente “inmadura”, correspondía a la de una mielina compacta, tanto en cuanto a las proteínas como a los lípidos. Respecto a a las primeras, se vió que la proteína básica mielínica se halla ya en el recién nacido en una proporción similar a la que se encuentra en la mielina adulta (Tabla I). Así, en contraste con otros autores, que no hallaban nada (16) o casi nada (17) de MBP en el recién nacido humano, nuestra mielina tenía ya un 40 % de MBP al nacimiento (Tabla I), proporción que aumentaba sólo ligeramente después.

Tabla I. Patrones de proteínas de la mielina cerebral humana a lo largo del desarrollo.

	Neonato	2 meses	9 meses	8 años
Total proteínas	24,6	25,2	24,6	29,8
MBP	40	38,9	46	54,7
DM-20	14,3	10,6	5,3	4
PP	28,8	33	29,2	26,8
WP	16,8	17,5	19,5	14,5

CNP, 2',3' nucleótido cíclico fosfohidrolasa; MBP, proteína básica mielínica; PP, proteína proteolípídica; WP, proteína de Wolfgram.

Tabla II. Composición lipídica de la mielina humana a lo largo del desarrollo

	Neonato	2 meses	9 meses	8 años
Fosfolípidos	454	487	437	354
Colesterol	458	489	465	527
Galactolípidos	194	207	196	196
Plasmalógenos	152	169	153	114
Sulfátidos	46	44	52	48
Gangliósidos	2,8	2,4	2,7	1,7
CNP	1214	1481	1306	1164

CNP, 2',3' nucleótido cíclico fosfohidrolasa

Lo mismo se puede decir de la composición lipídica (Tabla II), cuyos cambios con la maduración eran también prácticamente inexistentes. En cuanto a las discrepancias halladas con otros estudios, probablemente se deban al hecho de que nuestra mielina se había aislado de cerebro fresco en lugar de congelado. Las congelaciones y descongelaciones sucesivas producen roturas de membranas que liberan proteasas. La MBP es muy

Tabla III. Cambios en los patrones proteicos de la mielina humana tras diferentes tiempos de almacenamiento del tejido cerebral a -60°C

Meses de almacenamiento	Tejido	MBP	PI (DM-20)	PP	WP
0	SB	46,0	5,3	29,2	19,5
1	SB	38,7	8,3	36,2	16,8
4	HT	35,6	11,3	36,1	17,0
12	HT	15,3	12,5	46,0	26,2
14	SB	18,8	6,5	47,4	27,3

SB, sustancia blanca; HT, homogenizado total; MBP, proteína mielínica básica; PI, proteína intermedia; PP, proteína proteolipídica; WP, proteína de Wolfgram.

sensible a estas enzimas, como pudimos comprobar en nuestro primer estudio (Tabla III). Además, las membranas rotas y degradadas no tienen ya las mismas características de flotación en gradientes de sacarosa que tiene una mielina compacta bien conservada y existe el riesgo de contaminación con otras fracciones subcelulares. Probablemente sea ésta, más bien que las diferencias metodológicas, la causa de la gran discrepancia entre los datos publicados sobre proteínas de la mielina humana en desarrollo. En nuestro estudio, realizado con tres métodos distintos de aislamiento de mielina, las diferencias en composición

bioquímica debidas a la metodología fueron mínimas (14), mientras que, como ya hemos dicho, el tiempo de almacenamiento del cerebro congelado resultó esencial a la hora de evaluar los patrones de proteínas. La Fig 12 muestra la verdad de estas afirmaciones, al comparar las proteínas de la mielina de un mismo cerebro, obtenida por tres métodos de separación distintos y después de tiempos crecientes de almacenamiento del tejido. Se observa una desaparición gradual de la proteína básica mielínica, mientras que las diferencias metodológicas no producen alteraciones apreciables

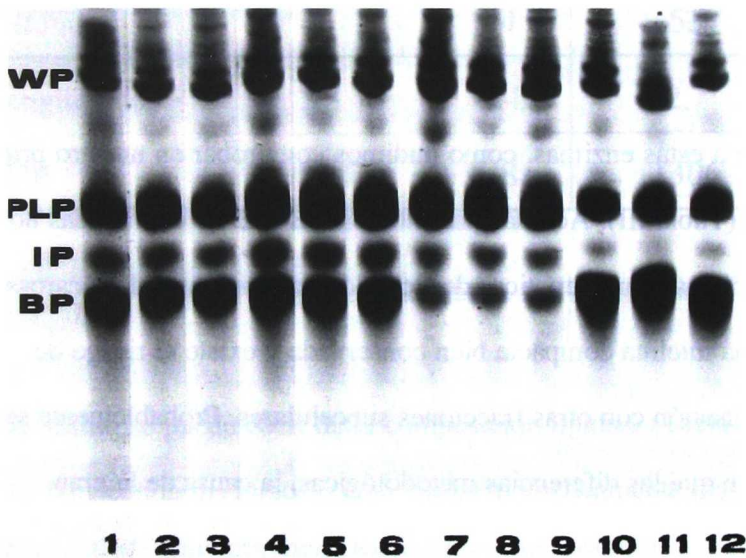


Fig. 12. Electroforesis de proteínas de mielina obtenida por tres métodos distintos de cerebro de un niño de 9 meses, después de un tiempo de congelación de un mes (1,2,3), 4 meses (4,5,6) y 11 meses (7,8,9). Geles 10-12, mielina cerebral adulta.

En definitiva, este estudio demostró que es sólo cuando se ha conseguido aislar “verdadera” mielina del cerebro de neonato humano cuando se puede apreciar que la composición de la mielina es bastante constante a lo largo del desarrollo. Este hecho se puso una vez más de manifiesto al comparar la composición proteica de la mielina de distintas zonas del SNC. En efecto, la Fig. 13 demuestra que dicha composición es muy similar en el cerebro, cerebelo y tronco cerebral del neonato humano, a pesar de que el primero es el último en mielinizarse. En resumen pues, nuestros estudios indican que durante la mielinogénesis inicial el cerebro del niño es capaz ya de producir una mielina compacta, de características físicas y bioquímicas prácticamente definitivas.

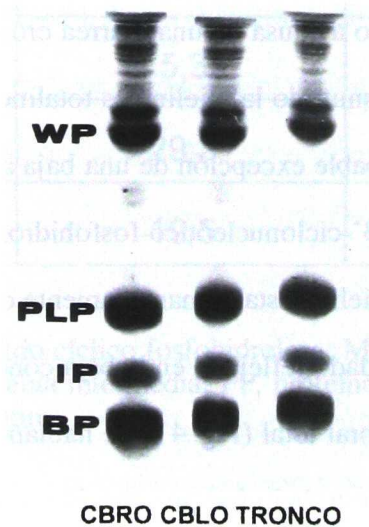


Fig. 13

Estudio de la mielina producida durante la malnutrición

En un estudio posterior, efectuado en unos pocos cerebros de niños, en uno de los cuales la mielinización había tenido lugar en condiciones nutricionales adversas, pudimos comprobar nuestra hipótesis: la afectación de la mielina debida a agresiones nutricionales es más bien de tipo cuantitativo que cualitativo (Tabla IV) Es decir, siendo la mielinización en el niño un proceso fundamentalmente cuantitativo, su afectación también lo es. La Tabla IV presenta la composición bioquímica de la mielina del cerebro humano normal a los 9 meses de edad en condiciones de buena nutrición y la compara con la hallada en un niño de la misma edad profundamente desnutrido a causa de una diarrea crónica. Como puede apreciarse, en el niño desnutrido la mielina es totalmente normal en composición, con la probable excepción de una baja actividad del marcador mielínico enzimático 2',3'-ciclonucleótico-fosfohidrolasa (CNP). En cambio, la cantidad de mielina estaba marcadamente disminuída en este niño, como ya había quedado reflejado en la baja concentración de lípidos mielínicos en tejido cerebral total (Fig. 4) que habíamos hallado en nuestro anterior estudio (11). Este trabajo fué presentado en un simposium sobre Neurobiología del Desarrollo (1985) y apareció publicado en 1989 (13).

Tabla IV. Composición de la mielina cerebral en un niño de 9 meses con un buen estado de nutrición y en un niño desnutrido de la misma edad.

	Buena nutrición	Desnutrición
Fosfolípidos	437	472
Colesterol	465	482
Plasmalógenos	153	136
Galactolípidos	196	232
Gangliósidos	2,7	2,7
CNP	1306	652
MBP	46,0	47,5
IP (DM-20)	5,3	5,9
PP	29,2	31,6
WP	19,5	15,0

CNP, 2',3' nucleótido cíclico fosfohidrolasa; MBP, proteína básica mielínica; IP, proteína intermedia; PP, proteína proteolípídica; WP, proteína de Wolfgram.

Acidos grasos durante el desarrollo normal del cerebro y cerebelo humanos. Implicaciones de tipo nutricional

Como componentes esenciales de los fosfolípidos de las membranas cerebrales, los ácidos grasos constituyen un grupo crucial de nutrientes durante el desarrollo del niño. Si bien todos los ácidos grasos se encuentran en todos los tejidos y estructuras biológicas, existen, fundamentalmente, dos grandes grupos de ácidos grasos que forman parte, preferentemente, de dos tipos de membranas cerebrales distintas: las membranas neuronales y la mielina. En las primeras predominan los ácidos grasos poliinsaturados y en la segunda, los saturados y monoinsaturados. En el tejido nervioso y en la retina predominan los fosfolípidos ricos en ácidos grasos de elevado grado de insaturación, especialmente el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 ω 3) y el ácido araquidónico (AA, 20:4 ω 6). Tan sólo desde el punto de vista cuantitativo, el DHA tiene una gran importancia en estas membranas, constituyendo un porcentaje muy elevado de la fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina del cerebro y de la retina, donde se encuentra particularmente concentrado, respectivamente, en las membranas plasmáticas neuronales de las sinapsis y en los segmentos externos de los bastones. En los mamíferos, estos ácidos grasos poli-insaturados se

sintetizan a partir de precursores “esenciales”, llamados así porque el organismo no puede sintetizarlos y tiene que recibirlos en la dieta. Tales compuestos son el ácido linoleico (18:2 ω 6), precursor de la serie ω 6 y el ácido α -linolénico (18:3 ω 3), precursor de la serie ω 3.

Paralelamente al rápido desarrollo neuronal que comienza a las 32 semanas de gestación, la concentración de varios lípidos (fosfolípidos, plasmalógenos, colesterol, gangliósidos) aumenta bruscamente en el cerebro (7,8). Al mismo tiempo, el porcentaje de DHA y la relación ω 3/ ω 6 aumentan de forma cuadrática en los fosfoglicéridos de etanolamina del cerebro (7, 20-23), debido al extraordinario crecimiento de las dendritas y terminales nerviosos (9). En la retina, el rápido desarrollo de los fotorreceptores se traduce también en un gran aumento del DHA a partir de las 24 semanas de gestación (24), momento en que los segmentos externos de los bastones comienzan a desarrollarse rápidamente.

Aparte de estas variaciones en los fosfolípidos individuales y sus patrones de ácidos grasos, que sirven para trazar el crecimiento químico de determinadas estructuras, el estudio global del tejido cerebral proporciona datos muy útiles desde el punto de vista nutricional. Así, cuando se estudia el cerebro en su conjunto se pueden deducir los valores absolutos de

acreción de ciertos ácidos grasos, lo que permite estimar las necesidades semanales o diarias de estos componentes. Para ello, y conociendo el peso del órgano, se pueden trazar curvas de las cantidades absolutas de ácidos grasos por cerebro completo (25). La Fig. 14 muestra los principales ácidos grasos insaturados frente a la edad postconcepcional del niño hasta los dos años de vida. Puede verse que, en términos de concentración total, el ácido oleico (18:1 ω 9) es el componente lipídico que más crece en el cerebro durante el período postnatal temprano. Ello se debe a la rápida mielinización que tiene lugar en el cerebro humano durante este período.

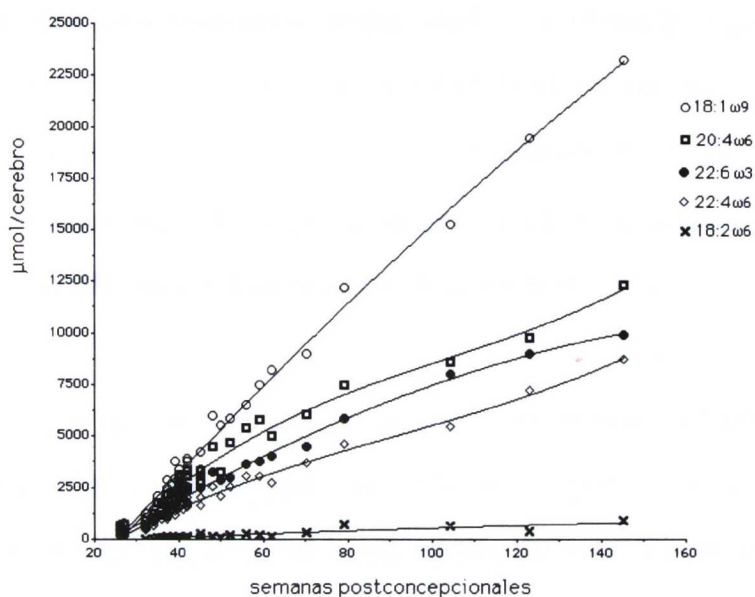


Fig. 14

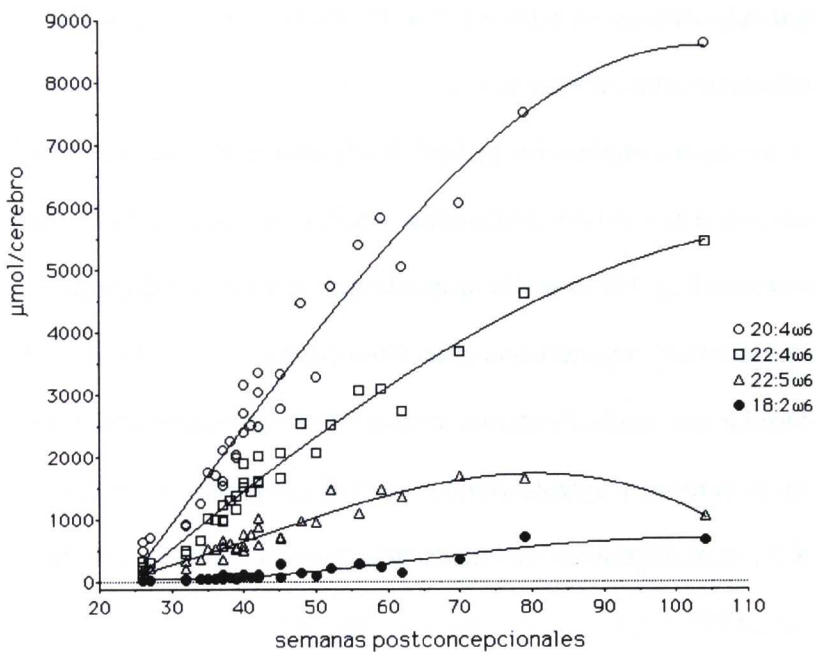


Fig. 15

El ácido adrenico (22:4ω6), que al igual que los moninsaturados está especialmente concentrado en la mielina, también aumenta de forma marcada en la vida postnatal, alcanzando concentraciones próximas a las de los dos principales ácidos grasos poliinsaturados, DHA y ácido araquidónico (AA, 20:4ω6). En el cerebro total mielinizado, la concentración de estos dos últimos poliinsaturados queda, por así decir “diluída”, por los ácidos grasos más característicos de la mielina, pero

es la que nos va a servir para calcular la acreción total, y por lo tanto, las necesidades de estas sustancias.

Cuando se estudian los principales ácidos grasos poliinsaturados de cada familia, $\omega 6$ y $\omega 3$, en una misma gráfica, se puede apreciar que entre los primeros (Fig. 15) el ácido araquidónico es el más importante cuantitativamente, seguido por el ácido adrenico. En cambio el precursor de la familia $\omega 6$, ácido linoleico, se encuentra sólo en proporciones muy bajas en el cerebro y apenas aumenta con el desarrollo. En el caso de la serie $\omega 3$, el protagonismo del ácido docosahexaenoico es absoluto

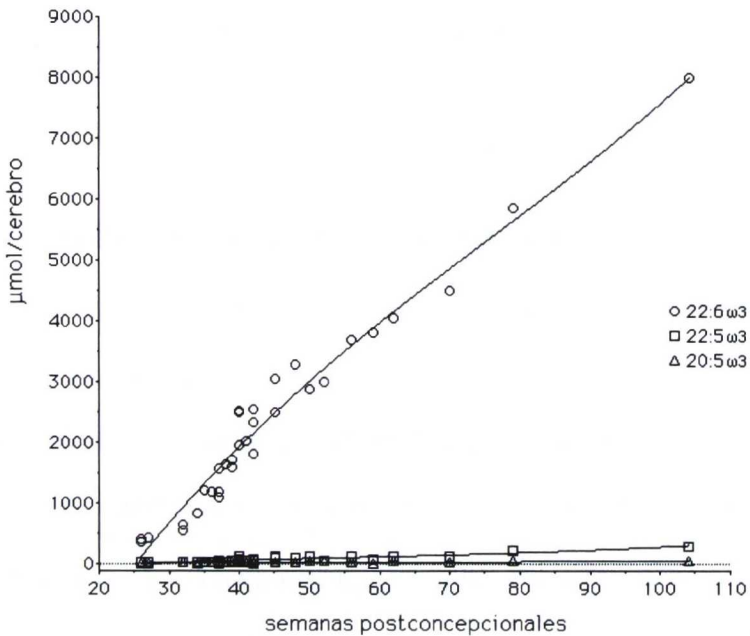


Fig. 16

(Fig. 16). El DHA es prácticamente el único ácido graso poliinsaturado cuya acreción en el cerebro humano en desarrollo es importante. Debemos puntualizar que las gráficas de las figuras 14-16 representan la acreción global a lo largo de todo el período madurativo. Cuando interesa más precisión en momentos concretos del desarrollo una curva única no representa adecuadamente el período prenatal, durante el cual la acreción lipídica es mucho más rápida que posteriormente. Entonces gráficas como las representadas en las Fig. 17 y 18, que muestran los perfiles madurativos de los dos principales ácidos grasos poliinsaturados, DHA y AA, son más adecuadas. Estas gráficas están formadas por dos tipos de

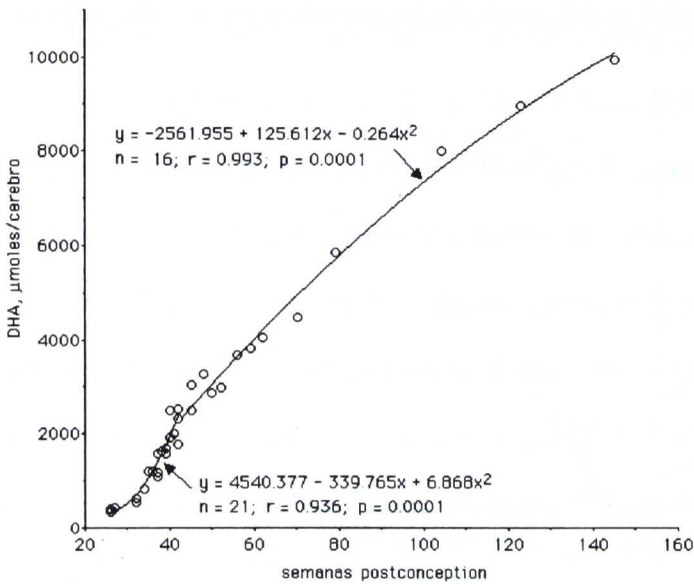


Fig. 17

curvas: una para el período prenatal y otra para el postnatal. La primera es de tipo parabólico, adaptándose al crecimiento cuadrático de estos ácidos grasos, que es más abrupto durante la vida intrauterina, mientras que es más suave y de pendiente decreciente en el período postnatal. Podemos ver que, ni en estas gráficas ni en las anteriores aparece en momento alguno durante el desarrollo cerebral humano el cese en el crecimiento químico de los ácidos grasos poliinsaturados descrito por otros autores (26). La importancia de este hecho para la nutrición es obvia, ya que indica que, aunque el crecimiento más importante tenga lugar durante la vida intrauterina, la acreción de ácidos grasos continúa durante los dos primeros años postnatales y está, por lo tanto, expuesta a desequilibrios dietéticos.

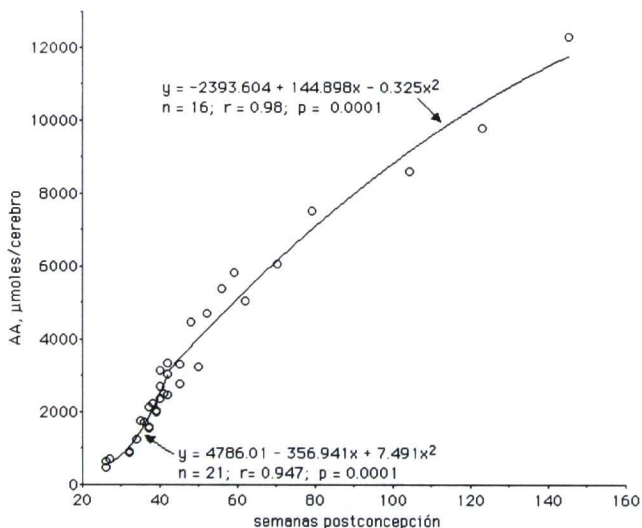


Fig. 18

Estudio de los patrones de ácidos grasos de los diversos fosfolípidos cerebrales durante el desarrollo normal

Aunque el conocer la cantidad total de cada ácido graso en el cerebro completo es muy importante a la hora de evaluar las necesidades nutricionales, un estudio más detallado de la composición en ácidos grasos de cada fosfolípido cerebral aporta un conocimiento más profundo en relación a la estructura del SNC. Desde un punto de vista práctico, es muy difícil separar la sustancia blanca de la gris, con lo que el conocimiento aproximado de la composición bioquímica de las neuronas y la mielina que ello proporcionaría es muy difícil de valorar. De hecho, sustancia blanca y gris estarán siempre mezcladas, con lo que si se quiere tener un conocimiento más real es mejor separar fracciones, tal como hemos hecho con la mielina. El estudio de la composición de la neurona sería sumamente interesante. Sin embargo, la separación de neuronas es muy problemática, ya que los axones quedan amputados y lo que en realidad se obtiene es sólo el pericario, con lo cual los resultados analíticos no corresponden a la neurona completa.

En cambio, el estudio de los fosfolípidos, aunque sea en cerebro total, nos dará una aproximación de lo que sucede en las diversas estructuras

cerebrales. Así, por ejemplo, sabemos que la mielina es rica en determinados lípidos y ácidos grasos. Los cerebrósidos y sulfátidos mielínicos son extraordinariamente ricos en ácidos grasos de cadena larga y muy larga, saturados y, sobre todo, monoinsaturados. Uno de ellos, el ácido nervónico (24:1 ω 9), se encuentra en gran proporción en los cerebrósidos y sulfátidos y en el fosfolípido esfingomielina, también especialmente localizado en la mielina. Por lo tanto, la cuantificación del 24:1 ω 9 nos proporcionará una idea bastante aproximada de la cantidad de mielina de un cerebro. Otros monoinsaturados, todos de la serie ω 9 (26:1 ω 9, 20:1 ω 9, e incluso el propio precursor de todos ellos, 18:1 ω 9), son buenos marcadores para seguir el proceso de mielinización. En cambio, como hemos mencionado antes, los ácidos grasos poliinsaturados son más característicos de glicerofosfolípidos (fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilcolina) que de esfingolípidos (cerebrósidos, sulfátidos, esfingomielina) y se hallan especialmente localizados en las membranas cerebrales no mielínicas (neuronas, glía) y de las células fotorreceptoras de la retina. Una excepción la constituyen los plasmalógenos. Estos glicerofosfolípidos, constituídos por una molécula de aldehído y otra de ácido graso (en una unión alquil-acil o vinil-eter-

ester-fosfátido), generalmente con etanolamina como base (fosfatidiletanolamina), se encuentran con preferencia en la mielina. También excepcionalmente, el ácido adrenico, que es un poliinsaturado de la serie $\omega 6$ (22:4 $\omega 6$), se encuentra preferentemente en la mielina, hasta el punto de ser un buen marcador del proceso de mielinización.

Por todo ello, decidimos completar nuestros trabajos anteriores con el estudio cuantitativo de los cambios madurativos de los distintos fosfolípidos cerebrales, durante el desarrollo normal del SNC. El estudio comprendía los fosfolípidos fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilcolina, esfingomielina y los plasmalógenos de etanolamina. Sobre estos últimos no existían datos en la literatura obtenidos durante el desarrollo humano, debido a dificultades de tipo técnico. Efectivamente, en los sistemas cromatográficos usuales empleados en la separación de fosfolípidos, los glicerofosfolípidos de etanolamina (forma diacil o fosfatidiletanolamina y forma alquilacil o plasmalógenos de etanolamina) migran conjuntamente, por lo que generalmente se da la composición en ácidos grasos de la mezcla. Sin embargo, dada la importancia de los plasmalógenos durante la mielinización, consideramos interesante conocer su composición durante este proceso, para lo que empleamos el sistema de

separación en capa fina doble-dimensional de Horrocks (27). Estos resultados están actualmente en prensa (28).

En resumen, encontramos que el DHA es el ácido graso poli-insaturado predominante en la fosfatidiletanolamina del cerebro, aumentando marcadamente con la maduración, mientras que en los plasmalógenos de etanolamina predominan el ácido araquidónico, adrenico y oleico, siendo éstos los que más aumentan durante el desarrollo (Fig. 19).

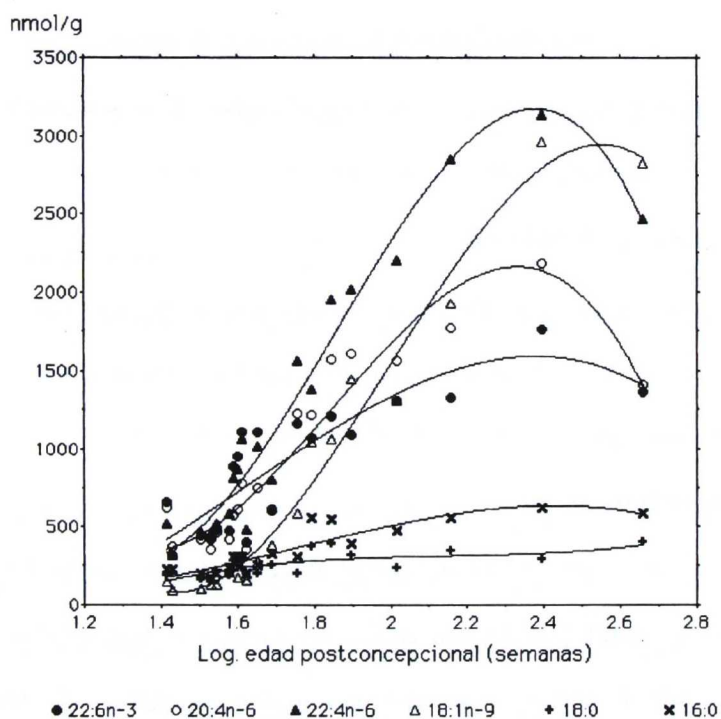


Fig. 19

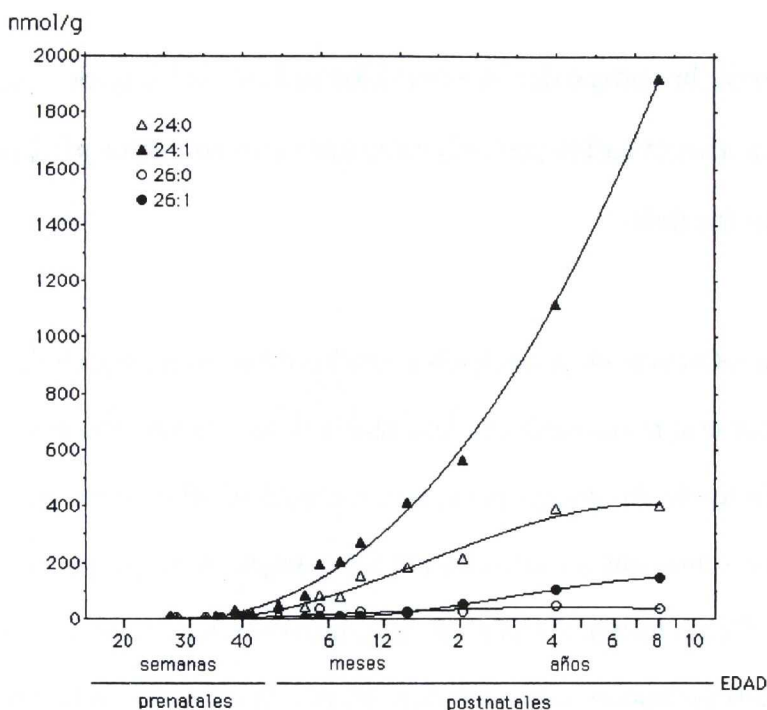


Fig 20

El ácido oleico también aumenta durante la mielinogénesis en la fosfatidilserina y fosfatidilcolina. En cambio su derivado principal, el ácido nervónico, aumenta marcadamente durante la mielinización en la esfingomielina (Fig. 20). Lo mismo puede decirse de los ácidos lignocérico (24:0), cerótico (26:0) y hexacosenoico (26:1 ω 9).

Estudio de la composición en ácidos grasos del hígado y cerebro en niños alimentados parenteralmente con una alta proporción de ácido linoleico

La influencia de la nutrición sobre los distintos tejidos en desarrollo no siempre está relacionada con la carencia de un compuesto esencial. En el caso de los ácidos grasos, el exceso de alguno de ellos puede ser tan pernicioso o más que su carencia, por los desequilibrios que puede originar. Como hemos mencionado anteriormente, los ácidos grasos insaturados pertenecen a tres familias: la $\omega 3$, la $\omega 6$ y la $\omega 9$. De ellas, la $\omega 3$ y la $\omega 6$ se originan en dos ácidos grasos esenciales, el α -linolénico y el linoleico, respectivamente. Estos precursores se llaman esenciales porque el organismo no los puede sintetizar y deben aportarse en la dieta. Sin embargo, no son éstos los únicos ácidos grasos poliinsaturados fundamentales. Hoy en día más bien se cree que son los productos de estos ácidos grasos los que son realmente importantes. Es lo que sucede con el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 ω 3), derivado del ácido α -linolénico, y con el ácido araquidónico (AA, 20:4 ω 6), derivado del ácido linoleico. La Fig. 21 muestra las principales rutas metabólicas de estas dos familias de ácidos grasos. Como veremos más tarde, la ruta clásica de la

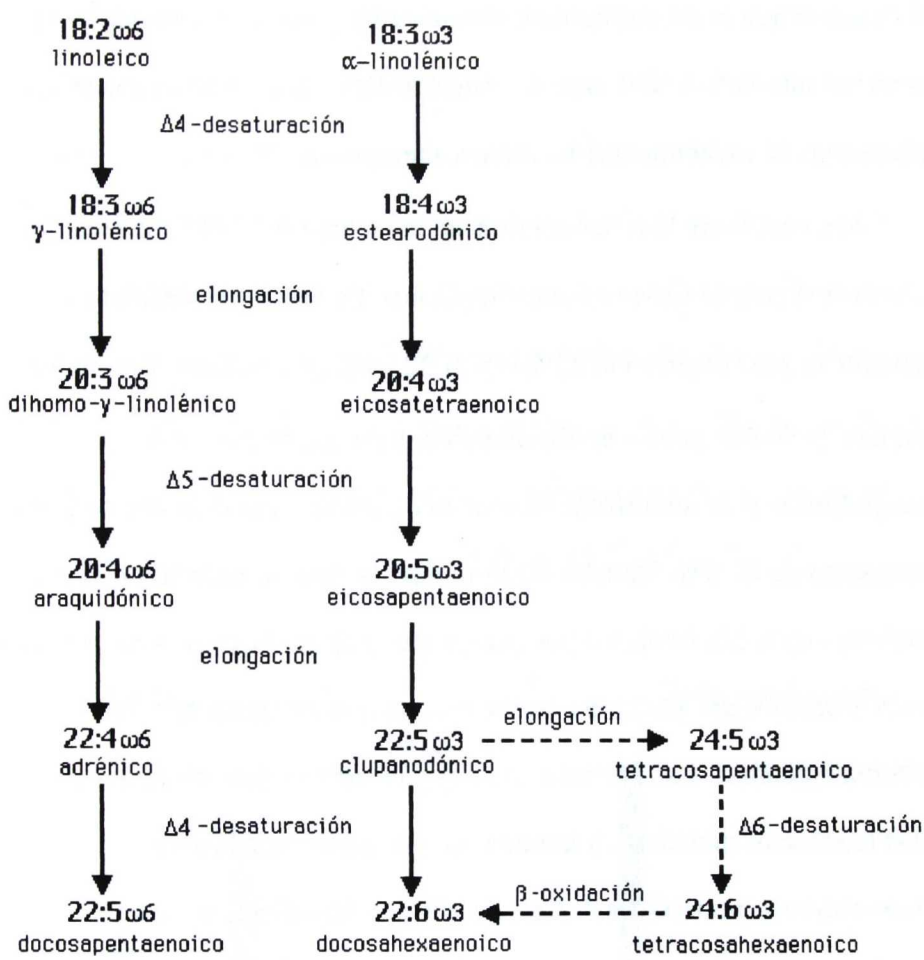


Fig. 21. Síntesis de los ácidos grasos poliinsaturados de las dos familias ω 3 y ω 6. Las flechas sólidas marcan la ruta metabólica clásica, las punteadas indican la nueva vía propuesta por el equipo de Sprecher (ref. 29).

$\Delta 4$ -desaturación se ha cuestionado ultimamente y se ha substituído por una nueva vía alternativa (29), que da origen al DHA por β -oxidación de un hexaeno de 24 carbonos (ácido tetracosahexaenoico, 24:6 ω 3).

Sea cual fuere la ruta operativa en la síntesis del DHA, se cree que es la misma para la serie ω 3 que para la ω 6. Es decir, las reacciones enzimáticas que conducen al 22:6 ω 3 y al 22:5 ω 6 son comunes para ambas familias de ácidos grasos poliinsaturados. Ello puede provocar desequilibrios si se administra un exceso de ácidos grasos de una serie con detrimento de la otra. Durante largo tiempo se han enriquecido diversos nutrientes en ácido linoleico por pensar que este ácido graso y su producto, ácido araquidónico, eran muy necesarios para el crecimiento y la integridad cutánea. Las fórmulas lácteas han sido las más afectadas por estas tendencias dietéticas, y también los productos utilizados en alimentación parenteral total. Uno de ellos, el Intralipid, ha sido ampliamente utilizado en aquellos casos en que la alimentación oral fisiológica no era posible. El Intralipid tiene un contenido en ácido linoleico cercano al 50% y, por tanto, el predominio ω 6 de este producto es muy marcado. El desequilibrio ω 6/ ω 3 al que se somete un paciente nutrido con Intralipid puede llegar a ser peligroso cuando se trata de un lactante durante el período de máxima vulnerabilidad cerebral. Así quedó

evidenciado en la composición de ácidos grasos de los principales fosfolípidos en el hígado y cerebro de un grupo de neonatos que habían recibido Intralipid durante unos pocos días (30). Uno de los neonatos había nacido algo prematuramente (35 semanas de edad gestacional) y el resto eran recién nacidos a término. La alimentación parenteral se instauró dentro de las primeras 24 horas de vida y se pudo administrar sólo durante un corto período de 4-12 días. A pesar de ello, el porcentaje de DHA en los glicerofosfolípidos de etanolamina y colina había ya quedado reducido a la mitad de su valor antes de recibir el Intralipid (Fig. 22 y 23).

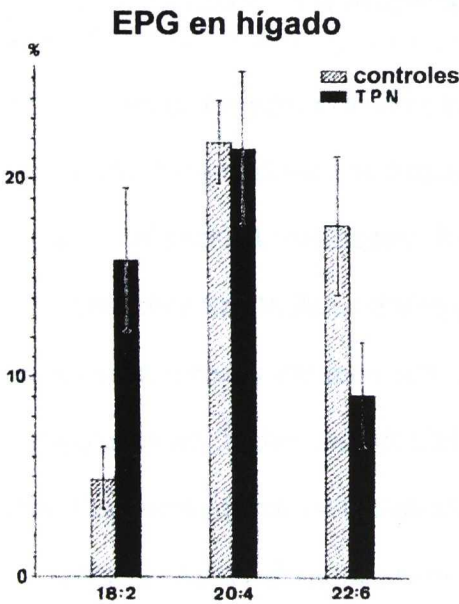


Fig. 22

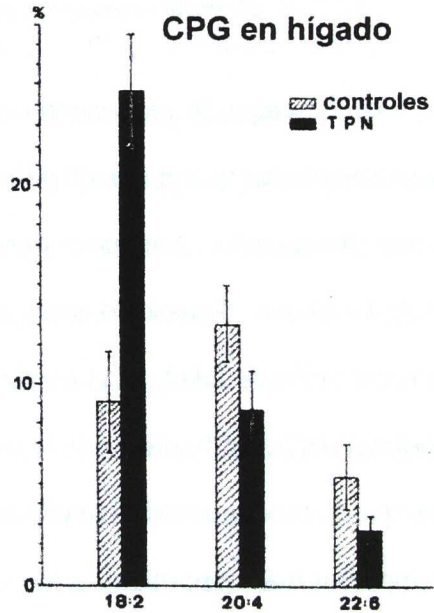


Fig. 23

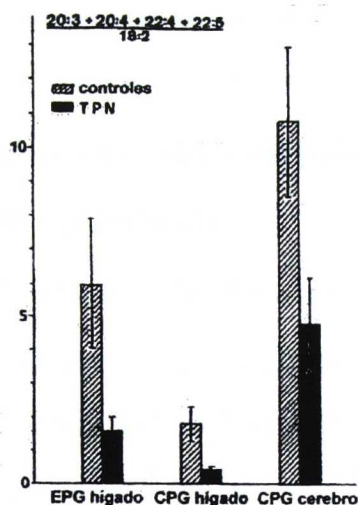


Fig. 24. El índice mostrado indica la transformación del ácido linoleico en sus productos. Su fuerte disminución en los niños que recibieron Intralipid indica que el exceso de 18:2 ω 6 inhibe la síntesis de sus derivados poliinsaturados.

Al mismo tiempo, la proporción de ácido linoleico había aumentado considerablemente, sin que ello sirviera para incrementar los niveles de ácido araquidónico. Aunque el tiempo de tratamiento había sido, probablemente, demasiado corto y, no bastaba para llegar a disminuir la concentración de DHA en el cerebro, sí que pudimos observar un aumento anormal del ácido linoleico en la fosfatidilcolina cerebral. La conclusión fué que el exceso de ácido linoleico, además de no servir para aumentar el compuesto más importante, ácido araquidónico, produce una peligrosa disminución de los niveles de DHA en el hígado del lactante.

Desarrollo de la retina humana. Composición en ácidos grasos de los principales fosfolípidos: Influencia de la malnutrición

La retina es extraordinariamente rica en ácidos grasos poliinsaturados de larga cadena, en especial docosahexaenoico. El DHA llega a constituir más del 50% de los ácidos grasos de los fosfolípidos retinianos. Esta alta concentración llega a un máximo en los segmentos externos de los bastones, en los que se encuentran especies moleculares de fosfolípidos con un contenido doble de DHA. Se cree que el DHA es importante en el proceso visual y que favorece los movimientos de la rodopsina en las células fotorreceptoras de la retina. Estudios experimentales han demostrado que la carencia de ácidos grasos $\omega 3$ y, en especial, de DHA puede originar problemas visuales en el mono (31). En el ser humano, R.T Holman y colaboradores describieron un caso de un lactante con severas alteraciones visuales y neurológicas a causa de una disminución del DHA originada por un aporte excesivo de ácido linoleico y casi nulo de ácido α -linolénico en una fórmula parenteral (32).

En el estudio antes citado, realizado en fosfolípidos de la retina humana normal durante el desarrollo (24), pudimos ver que el DHA es el ácido graso poliinsaturado que aumenta más marcadamente, al menos

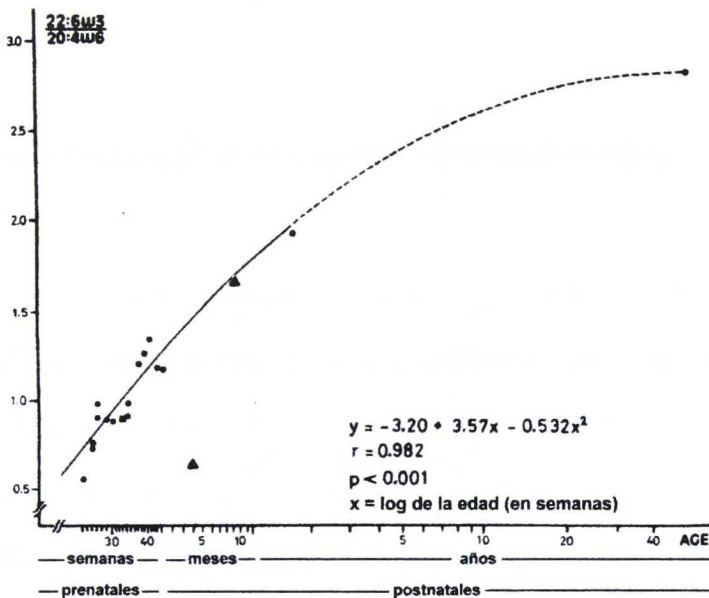


Fig. 25. Cociente DHA/AA en los fosfolípidos de etanolamina de la retina humana durante el desarrollo. Los dos triángulos llenos corresponden a la retina de dos niños desnutridos, uno de ellos prenatalmente. Nótese el bajo valor del índice DHA/AA en este niño.

hasta los dos años de edad. La proporción de ácido araquidónico (AA, 20:4 ω 6), por el contrario, tiende a bajar y el cociente DHA/AA aumenta de un modo parabólico durante el desarrollo de la retina. Estos perfiles madurativos normales contrastaron marcadamente con los bajos valores de DHA hallados en la retina de una niña pretérmino que había sido alimentada durante 4 meses con una fórmula muy desequilibrada, conteniendo una alta relación ω 6/ ω 3 (Fig. 25). Así pues, factores exclusivamente dietéticos habían originado en la retina de esta pequeña

una carencia franca de ácido docosahexaenoico, cuyos niveles apenas sobrepasaban el 50% de los valores normales.

Todo ello demuestra que, aún siendo el cerebro y la retina los tejidos que más se protegen contra agresiones nutricionales, los desequilibrios dietéticos en el aporte de ácidos grasos esenciales, en general producidos por un exceso de ácido linoleico, pueden llegar a originar francas carencias de DHA, carencias que en el animal de experimentación han demostrado tener consecuencias funcionales, tal vez irreversibles. Por eso, el niño prematuro, que nace durante este período vulnerable, tiene un mayor riesgo de sufrir anomalías en sus patrones de ácidos grasos y, probablemente, en su funcionalismo neurológico y visual si es sometido a dietas desequilibradas durante este período. La consecuencia de todo ello es que las fórmulas utilizadas para la alimentación del niño, sobre todo si es prematuro, deben ser equilibradas en su contenido de ácidos grasos esenciales y suplementadas con DHA en una proporción equivalente a la de la leche materna.

Influencia de la nutrición en los patrones de ácidos grasos de los hematíes

Estos efectos nocivos de lo que podríamos llamar “malnutrición por fórmulas desequilibradas en ácidos grasos esenciales” se pueden también detectar “in vivo” mediante el estudio de ácidos grasos en hematíes. El niño al nacer tiene un elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados en los fosfolípidos del hematíe. En especial, el contenido de DHA en hematíes de sangre del cordón umbilical es incluso mayor que en los hematíes maternos mientras que su precursor, 22:5 ω 3, se encuentra en concentraciones muy bajas. Este elevado nivel de DHA cae vertiginosamente en cuanto el neonato comienza a alimentarse y el de 22:5 ω 3 sube proporcionalmente. En efecto, al estudiar los hematíes de un grupo de niños prematuros (de 30 a 36 semanas gestacionales) alimentados con conocidas fórmulas lácteas comerciales que contenían una elevada proporción ω 6/ ω 3 (33), observamos descensos muy significativos del DHA (Fig. 26). En el prematuro alimentado con leche materna, este descenso de DHA era mucho menor. Además, comprobamos que, no por aportar mucho ácido linoleico se conseguía unos mejores niveles de ácido araquidónico, antes al contrario. Como en el caso del Intralipid, en niños

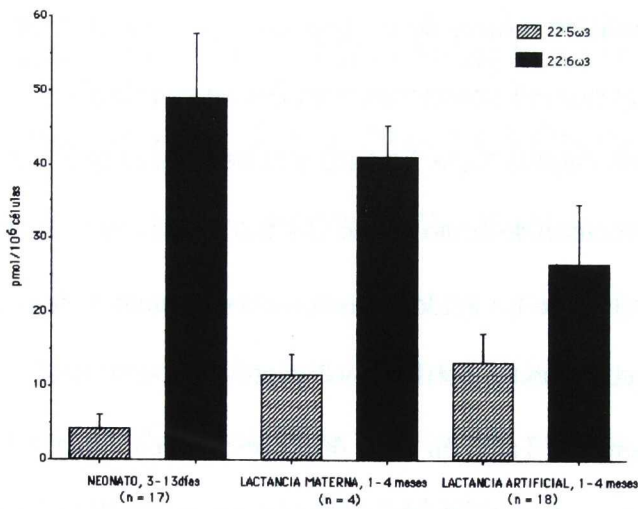


Fig. 26

lactados artificialmente, la disminución de la relación 20:4 ω 6/18 ω 6 indicaba que el exceso de ácido linoleico suministrado no puede transformarse en una cantidad adecuada de AA, probablemente debido a inhibición enzimática de la Δ 6-desaturasa por exceso de sustrato.

En contraste con las fórmulas lácteas, la leche materna tiene un bajo, aunque crucial, contenido de DHA. Esta pequeña cantidad de 22:6 ω 3 tiene una fuerte influencia en los patrones de ácidos grasos de los tejidos. En cambio, el DHA es totalmente indetectable en la leche de vaca. Si, además de ello, se le añade una elevada proporción de ácido linoleico, como sucede con la mayoría de fórmulas lácteas del comercio, no es de extrañar que se

produzca un desequilibrio a favor de la serie $\omega 6$ y que aparezca una carencia de ácidos grasos $\omega 3$ conducente a un descenso de DHA.

Otra diferencia entre la leche humana y la de vaca es que la primera tiene un elevado contenido de ácido oleico (18:1 ω 9). Ya hemos visto la importancia cuantitativa de los ácidos grasos monoinsaturados de larga y muy larga cadena provenientes del 18:1 ω 9 durante el proceso de mielinización del cerebro. También estas diferencias en cuanto al contenido de 18:1 ω 9 quedaban reflejadas en la composición de los hematíes de prematuros que recibían lactancia materna y artificial con fórmulas lácteas (33). Lo mismo sucedía con el ácido adrenico (22:4 ω 6), ácido graso especialmente concentrado en la mielina, que era ligeramente mayor en hematíes de niños que reciben lactancia natural (33), aunque las diferencias en este caso no eran significativas.

Podemos concluir que los neonatos prematuros alimentados con fórmulas lácteas desequilibradas por contener una proporción $\omega 6/\omega 3$ demasiado elevada, presentan ya a las pocas semanas alarmantes descensos del DHA en hematíes, lo que les convierte en potencialmente carentes en este importante poliinsaturado. Desgraciadamente, estas fórmulas han sido durante años las más utilizadas para la alimentación del lactante y aún siguen empleándose.

LABOR INVESTIGADORA ACTUAL EN RELACION A LA PREVENCION DE LAS DEFICIENCIAS

DESARROLLO CEREBRAL HUMANO PATOLÓGICO. INVESTIGACIONES RELACIONADOS CON LAS ENFERMEDADES PEROXISOMALES

Introducción

Antes de pasar a describir la tarea investigadora personal en el campo de las enfermedades peroxisomales, es conveniente resumir brevemente en qué consisten dichas enfermedades. Se trata de un grupo de enfermedades congénitas recientemente admitido como entidad nosológica, cuya característica primordial es la ausencia de peroxisomas normalmente formados en las células del paciente. El prototipo de estas enfermedades es el síndrome cerebro-hepato-renal de Zellweger, enfermedad rápidamente letal, ya conocida desde 1964 (34), aunque su relación con los peroxisomas data de 1973, cuando Goldfischer y colaboradores descubrieron la ausencia de peroxisomas en el hígado y tubulos proximales renales de estos niños

(35). Los enfermos con síndrome de Zellweger tienen profundas anomalías neurológicas, con alteraciones de la migración neuronal y de la mielinización, convulsiones, hipotonía severa, grave retraso psicomotor, ceguera y sordera de tipo neurosensorial, afectación hepática y, a menudo, quistes renales (de ahí el nombre de síndrome cerebro-hepato-renal), disfunción suprarrenal y anomalías esqueléticas. Son características la dismorfia craneofacial y una osificación anormal con punteado característico en las rótulas (condrodisplasia punctata) que, cuando aparece, es patognomónica. Los enfermos con síndrome clásico de Zellweger no suelen sobrepasar los 6 meses de edad. Existen variantes menos severas del síndrome de Zellweger, las más importantes son las llamadas adrenoleucodistrofia neonatal y la enfermedad de Refsum infantil, por orden decreciente de severidad. Todos estos enfermos están encuadrados dentro del grupo de las llamadas enfermedades peroxisomales generalizadas o enfermedades por defecto en la biogénesis de los peroxisomas (36), ya que se cree que lo que está afectado es la formación del peroxisoma, por fallo en la importación de las proteínas matriciales a su interior.

Los peroxisomas son pequeñas organelas o partículas subcelulares de 0,2-1 μm de tamaño, que están provistas de una extensa maquinaria

enzimática. Muchos de estos enzimas están relacionados con el metabolismo lipídico. En especial, los β -oxidación de los ácidos grasos de cadena muy larga (con más de 22 átomos de carbono) tiene lugar en los peroxisomas. Por ello, en los pacientes con enfermedades peroxisomales generalizadas, que carecen de peroxisomas, los ácidos grasos de cadena muy larga 26:0 y 26:1 ω 9 aumentan en plasma, lo que se utiliza para el diagnóstico de estos enfermos. También las dos primeras etapas enzimáticas en la síntesis de los plasmalógenos, fosfolípidos cuantitativamente importantes en la mielina y sustancia blanca cerebral, tienen lugar en los peroxisomas y su fallo produce una disminución de estos lípidos, dato que también se usa en el diagnóstico. Otras reacciones enzimáticas relacionadas con el metabolismo lipídico se efectúan también en los peroxisomas, tales como la síntesis del colesterol y ácidos biliares y la α -oxidación del ácido fitánico. Por ello, los enfermos peroxisomales presentan también otras anomalías bioquímicas, tales como una disminución de los ácidos biliares normales y colesterol con aumento de metabolitos biliares anormales y de ácido fitánico, un producto de la degradación del fitol, que normalmente no está presente en plasma más que en cantidades de trazas (36).

El cuadro clínico (36,37) de estos pacientes es siempre muy grave y la supervivencia suele ser muy corta. Aunque existen variantes menos graves que el síndrome de Zellweger clásico y algunos de estos enfermos han llegado a vivir bastantes años, lo habitual es que no pasen de la primera o, como máximo, la segunda infancia. Son niños que no medran, ni desde el punto de vista del desarrollo pondoestatural ni del psicomotor. Raramente hablan o llegan a andar y la sordera y ceguera son rápidamente progresivas. Son, por lo general, niños pequeños, con serios problemas de alimentación que a menudo requieren el uso de sonda nasogástrica. Tienen problemas hepatodigestivos, a menudo con esteatorrea. En los pacientes que viven más, la osteoporosis es constante y la falta de actividad la agrava, provocando además una propensión a la litiasis renal. Es frecuente la aparición tardía de insuficiencia suprarrenal.

La mielinización está profundamente afectada desde el principio en el síndrome de Zellweger. Se trata de una mielina que nunca llega a formarse normalmente (dismielinización) y, si se forma, es de mala calidad y se pierde posteriormente (desmielinización). En variantes tales como la enfermedad de Refsum infantil se ha dicho que la mielina es normal. Sin embargo, nuestra experiencia personal indica que, tarde o temprano, todos los enfermos peroxisomales acaban presentando imágenes

de mielina anormales en resonancia magnética cerebral. Esto es lo que sucede en la llamada adrenoleucodistrofia neonatal. Estos enfermos presentan un cierto grado de desarrollo inicial y, al cabo de un tiempo, generalmente después del año de edad, comienzan a degenerar, pierden las pocas funciones que habían adquirido y se desmielinizan, falleciendo en poco tiempo. En los pacientes que viven más, es raro encontrar una mielinización totalmente normal en resonancia magnética craneal, si bien la falta de un seguimiento clínico y neurorradiológico en la mayoría de enfermos no permite sacar conclusiones definitivas al respecto.

Una de las cuestiones que más ha preocupado a los investigadores en este terreno es el porqué estos pacientes presentan un cuadro clínico tan grave, letal en poco tiempo, por el hecho de no tener peroxisomas. ¿Cuál de las anomalías que presentan estos niños es la principal causante de las severas alteraciones neurológicas y la ceguera? ¿Es suficiente el aumento de los ácidos grasos 26:0 y 26:1 ω 9 para producir un daño neurológico tan profundo? En general, se admite que sí. Sin embargo, tanto el 26:0 como el 26:1 ω 9 son ácidos grasos fisiológicos, normalmente presentes en relativa abundancia en los cerebrósidos, y sufátidos de la mielina normal. Además, en un estudio que realizamos hace algunos años, pudimos demostrar que ni el 26:0 ni el 26:1 ω 9 están realmente elevados en el cerebro de pacientes

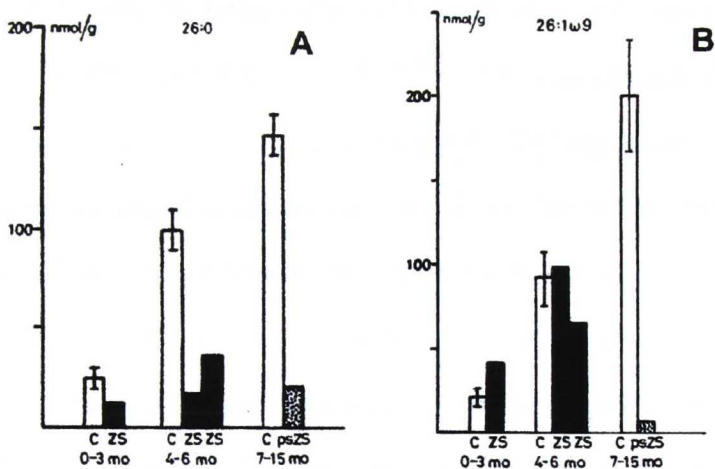


Fig. 27. Ácidos grasos de cadena muy larga (26:0 y 26:1ω9) en el cerebro de 4 pacientes peroxisomales (ZS, síndrome de Zellweger; psZS, síndrome de pseudo-Zellweger) comparados con controles (C) de su misma edad.

peroxisomales cuando se mide su concentración total por gramo de tejido cerebral. Es más, estos dos ácidos grasos de cadena muy larga se hallan incluso disminuídos en el cerebro de pacientes peroxisomales fallecidos en fases de desmielinización (Fig. 27), y ello es lógico si se considera que se trata de dos ácidos grasos propios de mielina.

Se ha dicho que lo que probablemente produce el daño cerebral no es tanto la elevación del 26:0 y el 26:1ω9 como su ubicación errónea en lípidos que normalmente no los contienen, como por ejemplo los gangliósidos (38). Se ha especulado que, aún siendo ácidos grasos

fisiológicos en la mielina, el 26:0 y el 26:1 ω 9 podrían actuar como desencadenantes de la enfermedad, a modo de alérgenos, cuando se hallan situados en el lugar o lípido erróneo en el cerebro de un enfermo peroxisomal. Esta interpretación se apoya en la marcada similitud anatomopatológica que existe entre las lesiones mielínicas de tipo inflamatorio del enfermo con esclerosis múltiple y las del paciente con leucodistrofia peroxisomal (38). Sin embargo, esta teoría no está comprobada y existen otras posibilidades

¿Es más bien la carencia de plasmalógenos la que puede producir tan graves problemas en el paciente peroxisomal? Siendo los plasmalógenos una clase de fosfolípidos especialmente concentrada en la mielina, esta posibilidad no es despreciable. Sin embargo, se sabe que en un paciente con una variante de estas enfermedades, llamada síndrome de pseudo-Zellweger (39), los plasmalógenos no estaban disminuídos y, lo que es más llamativo, los peroxisomas estaban presentes en abundancia en el hígado del enfermo. Por ello, la patogenia del síndrome de Zellweger dista mucho, por el momento, de ser clara.

HALLAZGO DE UNA NUEVA ANOMALÍA BIOQUÍMICA EN PACIENTES CON ENFERMEDADES PEROXISOMALES

En febrero de 1987, al analizar el cerebro de un enfermo con síndrome cerebro-hepato-renal de Zellweger, encontramos una drástica disminución de los niveles de ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 ω 3), disminución que también aparecía en sangre, hígado y riñones de dicho enfermo. La anomalía era tan evidente y sumamente marcada que se podía detectar a simple vista examinando el trazado gascromatográfico (Fig. 28).

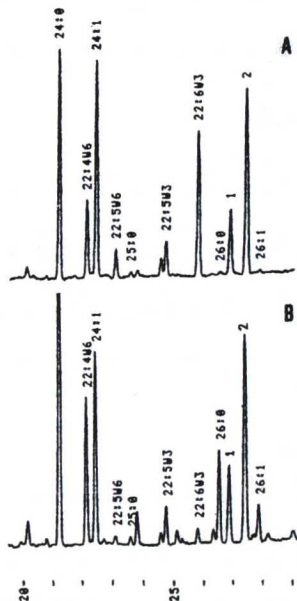


Fig. 28. B, gas-cromatograma de ácidos grasos de riñón de un paciente de 3 meses con síndrome de Zellweger, comparado con los de un niño normal de la misma edad (A).

Dado que, como hemos visto anteriormente, el DHA es un importante componente de las membranas cerebrales y de la retina, su carencia en enfermos peroxisomales, con profunda afectación neurológica, retraso psicomotor y ceguera, podía ser patogénica. Según los conceptos aceptados hasta el momento, la anomalía bioquímica hallada sugería la existencia de una deficiencia de la $\Delta 4$ -desaturasa, enzima que según la ruta clásica conduce a la síntesis de DHA y, con esta hipótesis, fué presentada por primera vez en la Reunión de la European Society for Neurochemistry celebrada en Göteborg, en Junio de 1988 (40) y, poco después, en la “NATO Advanced Research Workshop” sobre “Dietary $\omega 3$ and $\omega 6$ Fatty Acids: Biological Effects and Nutritional Essentiality” (41), apareciendo publicada por primera vez en 1989 en la revista *Lipids* (42). Como esta anomalía no había aún sido descrita, quisimos comprobar si era o no un dato constante en estos pacientes, cosa que quedó confirmada poco después, al analizar un número suficiente de muestras de cerebro y otros tejidos de varios enfermos más, amablemente proporcionadas por otros investigadores (Dres. R.J.A. Wanders y H.W. Moser). Efectivamente, todos los pacientes con defectos de la biogénesis peroxisomal (15 en total), sin excepción, tenían niveles bajísimos de DHA en el cerebro y otros tejidos (43-46).

Esta drástica y constante carencia de ácido docosahexaenoico es cuantitativamente tan importante que, a menudo, los niveles de DHA en el cerebro no sobrepasan el 20-25% de los valores normales (Fig.29).

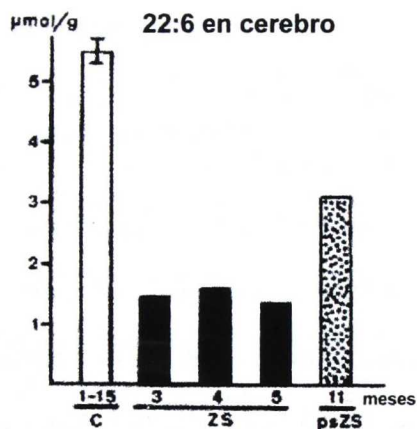


Fig. 29

En el hígado (Fig. 30) y en los riñones (Fig. 31) los valores de DHA pueden ser incluso más bajos.

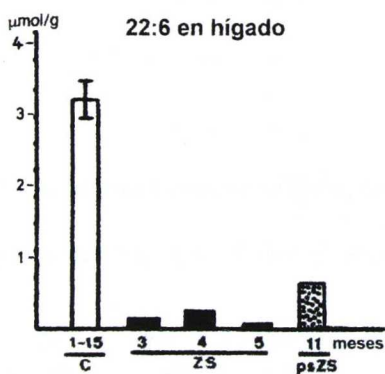


Fig. 30

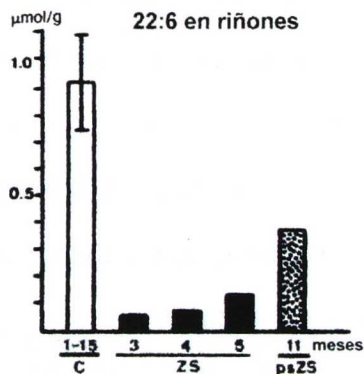


Fig. 31

La Fig. 32 muestra los niveles de DHA del cerebro en todos los enfermos peroxisomales estudiados frente a la curva normal de desarrollo de este poliinsaturado. La disminución es muy importante en todos los casos.

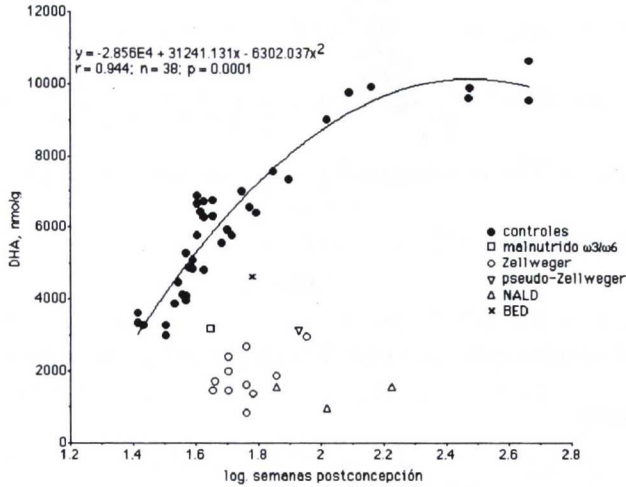


Fig. 32

En cambio, el ácido araquidónico (AA, $20:4\omega 6$) suele estar dentro de los límites normales o aumentado en el cerebro peroxisomal (Fig.33).

En cuanto al producto final de la serie $\omega 6$, el $22:5\omega 6$, está generalmente muy disminuído en el síndrome de Zellweger. Sin embargo, en dos enfermos diagnosticados de adrenoleucodistrofia neonatal encontramos un gran aumento de $22:5\omega 6$, como sucede en las carencias nutricionales de ácidos grasos $\omega 3$. En la retina, los niveles de DHA son practicamente nulos

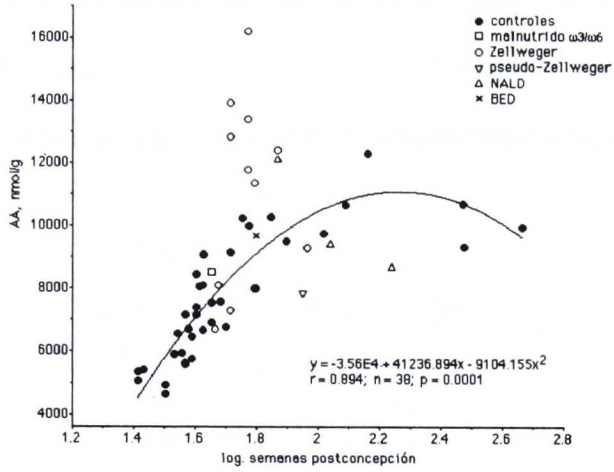


Fig. 33

(Fig. 34) mientras que los otros ácidos grasos poliinsaturados son normales (45).

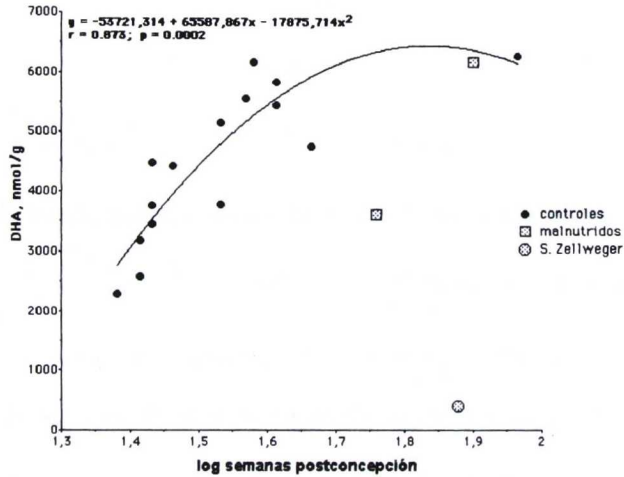


Fig. 34

Un hallazgo curioso que merece mencionarse por las posibles implicaciones que pueda tener en cuanto al metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados fué el fuerte aumento en los niveles de 22:5 ω 6 que encontramos en los cerebros de dos de los enfermos diagnosticados de adrenoleucodistrofia neonatal. En cambio, en los pacientes con síndrome de Zellweger el 22:5 ω 6 estaba muy disminuído. De hecho, esto fué lo que nos llevó a sospechar un defecto de la Δ 4-deasturasa en los pacientes peroxisomales (40-43). Como hemos visto, el 22:5 ω 6 es el producto final en la síntesis de poliinsaturados ω 6, del mismo modo que el 22:6 ω 3 lo es en la síntesis de los poliinsaturados ω 3, y esto es así tanto para la ruta metabólica clásica como para la nueva ruta de Sprecher (Fig. 21). Por ende, cualquier defecto en esta vía debería afectar a las dos familias de poliinsaturados y producir una disminución tanto del 22:6 ω 3 como del 22:5 ω 6. Sin embargo, como decimos, no fué así en dos de los enfermos con adrenoleucodistrofia neonatal (45-46).

La carencia de DHA puede fácilmente ser detectada “in vivo” en el plasma y hematíes de pacientes con enfermedades peroxisomales generalizadas. En un estudio multicéntrico que realizamos en colaboración con diversos países europeos y que formaba parte de un proyecto Biomed de la CE, pudimos comprobar que la carencia de DHA es bastante

específica de enfermedad peroxisomal generalizada, ya que en los pacientes con adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X (otra enfermedad peroxisomal, pero con fallo enzimático único) el DHA es normal (Fig. 35), al menos en sangre. (47,48). Fué curioso constatar en este estudio que, a diferencia del cerebro, el plasma de los pacientes con enfermedades peroxisomales generalizados tiene niveles bajos de AA (48).

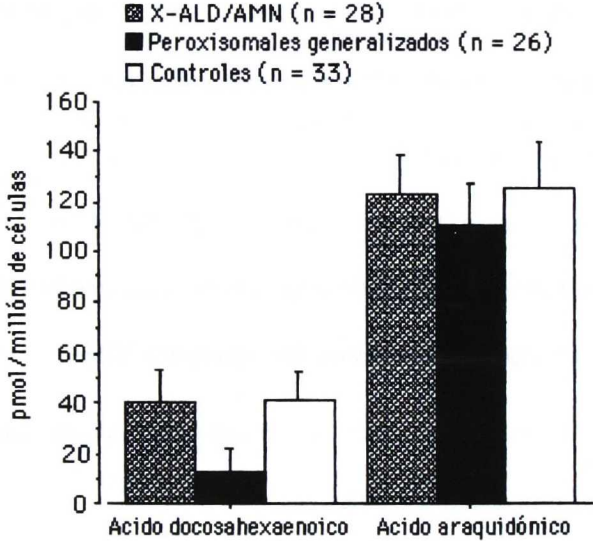


Fig. 35

Ácidos grasos de glicerofosfolípidos en el cerebro de pacientes con enfermedades peroxisomales generalizadas

En un último estudio que acabamos de enviar para su publicación (49), sobre la composición en ácidos grasos de los diversos fosfolípidos en el cerebro de niños con enfermedades peroxisomales generalizadas, hemos podido comprobar el aumento de ácido araquidónico en la mayoría de los pacientes. Esta desproporción entre los elevados niveles de AA y la carencia de DHA es especialmente evidente en la fosfatidiletanolamina del cerebro peroxisomal (Fig. 36), donde el ácido araquidónico contribuye

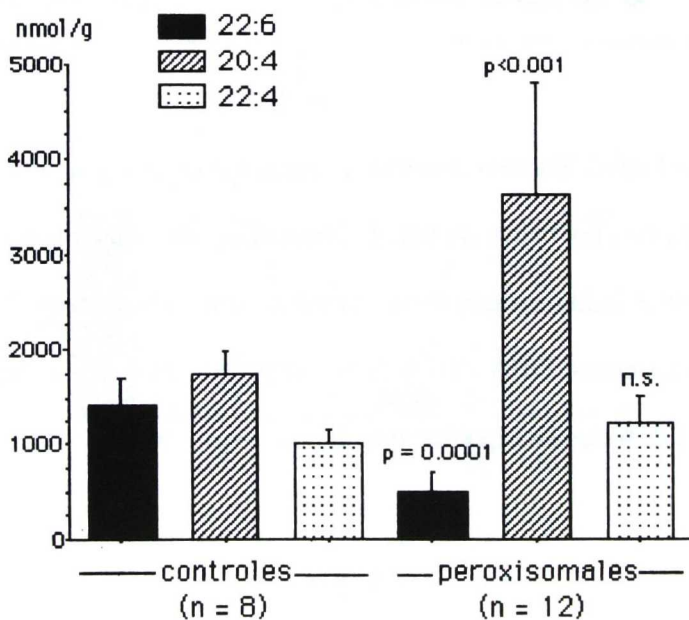


Fig. 36

especialmente al aumento de esta fracción fosfolípídica que se observa en estos enfermos (Fig. 37).

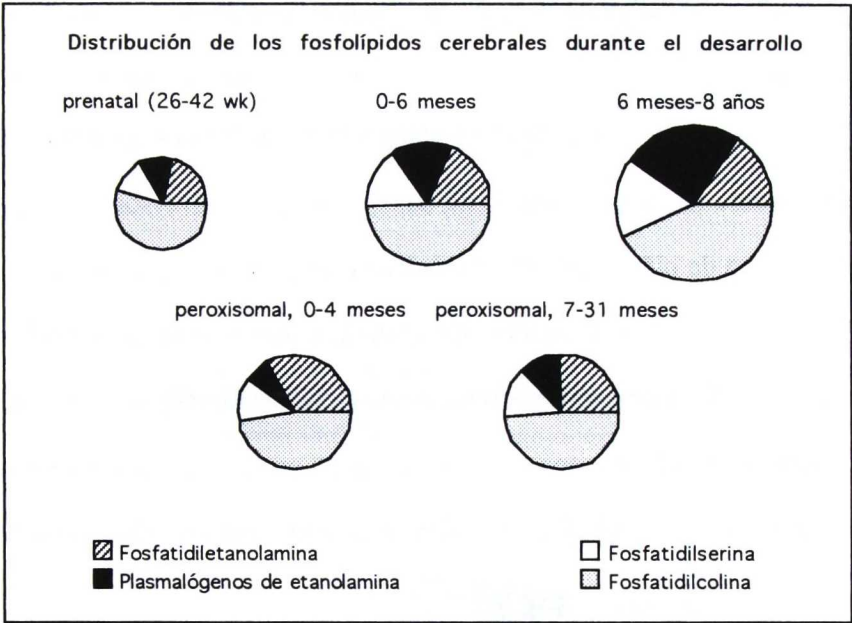


Fig. 37

También la fosfatidilserina muestra un aumento de AA y ácido adrenico en contraste con los bajos niveles de DHA (Fig. 38). En cambio, en los plasmalógenos hallamos una disminución bastante proporcionada de los tres poliinsaturados, DHA, AA y ácido adrenico (Fig. 39), si bien los niveles de DHA son siempre los más bajos.

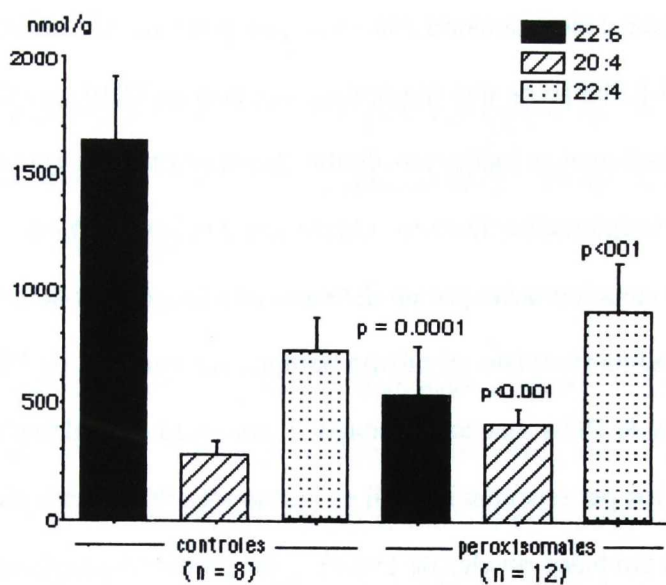


Fig. 38

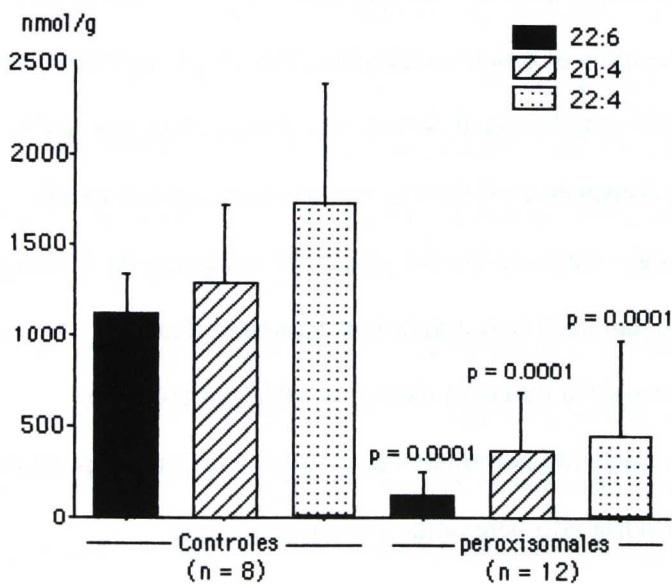


Fig. 39

No se sabe a ciencia cierta cual es la patogenia del síndrome de Zellweger y el hallazgo de una importante carencia de DHA en estos enfermos planteó nuevas incógnitas dentro de este campo de enfermedades metabólicas recientemente descrito. Efectivamente, ¿por qué en enfermedades caracterizadas por un defecto en la biogénesis de los peroxisomas celulares existe, al mismo tiempo, una carencia de DHA? ¿Es la carencia de DHA una consecuencia o una causa de la defectuosa biogénesis de los peroxisomas? ¿Cuál es la ruta metabólica más afectada y que conduce a tan bajos niveles de DHA? ¿Está el defecto enzimático situado en el peroxisoma o se trata más bien de un defecto de la $\Delta 4$ -deasturasa situado en el retículo endoplásmico o en la mitocondria? ¿Si la carencia de DHA está ligada al defecto del peroxisoma, por qué dicha carencia no es constante en todas las enfermedades peroxisomales con β -oxidación alterada, tanto en las del grupo del síndrome de Zellweger como en los defectos parciales tipo adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X? ¿Es posible corregir la carencia tisular de DHA en enfermos peroxisomales mediante administración exógena de este importante compuesto? ¿Podría ello beneficiar a estos enfermos?

TRATAMIENTO CON ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO EN LOS PACIENTES CON ENFERMEDADES PEROXISOMALES GENERALIZADAS

Tratando, en primer lugar, de responder a las dos últimas preguntas, que son las más importantes desde un punto de vista médico, iniciamos en 1991 un ensayo terapéutico en dos pacientes con enfermedades peroxisomales generalizadas con un derivado del DHA de elevado grado de pureza (90-95%) y altamente asimilable. El producto era el éster etílico del DHA, obtenido mediante una beca de los National Institutes of Health (NIH, Bethesda, EEUU). Desde entonces, hemos venido administrando DHA-etil éster (DHA-EE) oralmente a estos pacientes en dosis diarias de 200-500 mg.

De momento, el etil-éster de DHA facilitado por los NIH de Bethesda es el único concedido por esta institución para el tratamiento de enfermos peroxisomales. El producto no está comercializado en ningún país. En consecuencia, desde 1991 estamos tratando, personalmente y en colaboración con diversos hospitales internacionales, a varios pacientes con enfermedad peroxisomal generalizada. Estos enfermos vienen de diversas partes del mundo para comenzar el tratamiento con DHA-EE en nuestro

hospital Materno-Infantil Valle de Hebrón de Barcelona. Iniciamos el tratamiento con estrechos controles bioquímicos y clínicos, y dosis crecientes de DHA, durante aproximadamente un mes. Pasado este tiempo el paciente vuelve a su país de origen, a donde le enviamos el etil ester de DHA periódicamente, bajo control de los cambios en ácidos grasos que se puedan producir. Para el seguimiento clínico, nos mantenemos en contacto con las familias de los pacientes y sus médicos y, siempre que es posible, el enfermo vuelve a Barcelona cada 6 meses, aproximadamente, para controlar su evolución personalmente.

Resultados del tratamiento con DHA

La Tabla V muestra los pacientes tratados personalmente durante estos años y la duración del tratamiento hasta el momento. Los resultados han sido muy esperanzadores, e indican que el DHA está implicado en la patogenia de la enfermedad peroxisomal. Además de producirse una rápida normalización de los niveles de DHA en sangre (Fig.40), se han obtenido otros resultados bioquímicos y clínicos positivos, algunos de ellos inesperados. En efecto, la terapéutica con etil ester de DHA ha producido

Tabla. V. Pacientes con enfermedades peroxisomales generalizadas tratados con DHA-EE* por variables períodos de tiempo.

Caso n°	Diagnóstico inicial	Edad al inicio del tratamiento	Duración del tratamiento	Resultado del tratamiento
1	IRD	4 meses	6 meses	+
2	ZS	5 meses	3 meses †	+/-
3	IRD	5 meses	3 años	+++
4	NALD	6 meses	2 años	+
5	ZS	7 meses	4 años	++
6	NALD	9 meses	18 meses †	+++
7	NALD	9 meses	4 años	++
8	IRD	15 meses	4 años	++
9	NALD	15 meses	2 años	++
10	IRD	16 meses	2 años	++
11	IRD	3 años	5 meses	+
12	NALD	3 1/3 años	6 semanas †	+/-
13	IRD/NALD	5 años	4 años	++
14	NALD	5 1/2 años	2 años	+
15	NALD	7 años	7 años	+

*DHA-EE, etil ester del ácido docosahexaenoico; ZS, síndrome de Zellweger; NALD, adrenoleucodistrofia neonatal; IRD, enfermedad de Refsum infantil. +, ligera mejoría clínica. ++, mejoría clínica clara acompañada de avance o normalización de la mielinización cerebral en RM. +++, mejoría clínica marcada, RM cerebral normal. +/-, no cambios clínicos, sólo mejoría bioquímica. †, exitus a la edad indicada.

un aumento de plasmalógenos (lípidos de mielina que como hemos visto están normalmente muy disminuídos en los enfermos peroxisomales) (Fig. 41) y un descenso marcado de los niveles de ácidos grasos de cadena muy larga (patognomónicos de la enfermedad) (Fig. 42 y 43), junto con una mejoría hepática, neurológica y visual evidentes. Los primeros resultados clínicos y de laboratorio fueron presentados en 1991 en Philadelphia, en una reunión sobre oxidación de ácidos grasos (50), apareciendo publicados en 1992 (51). Más tarde, apareció un artículo completo en la revista *Neurology* (52) sobre los dos primeros enfermos tratados. Desde entonces, hemos seguido publicando los resultados obtenidos con esta nueva terapéutica, tanto en cuanto a casos nuevos como al seguimiento de todos ellos (53-57).

Dado que estas enfermedades, de suyo siempre gravísimas y de evolución fatal, son, sin embargo, variables en cuanto a grado de afectación, los resultados más espectaculares se han obtenido en aquellos niños con formas relativamente menos malignas y en los que el tratamiento ha comenzado a una edad lo más temprana posible. Ello sucedió, por ejemplo, en tres lactantes con variantes del síndrome de Zellweger, que comenzaron el tratamiento a los 3, 5 y 9 meses de edad, respectivamente. El primero (un paciente de Bruselas, tratado en

DHA EN HEMATIES (pmol/10⁶ células)

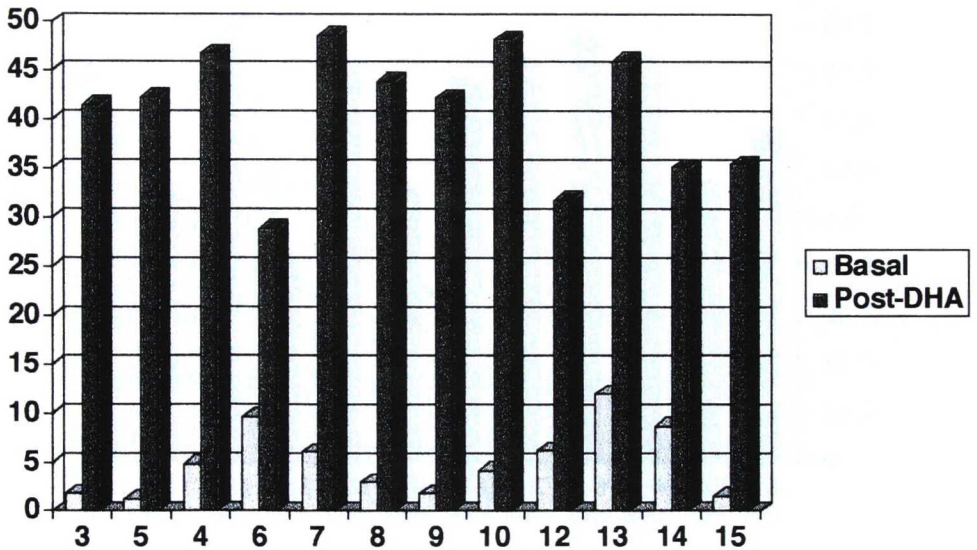


Fig. 40. Acido docosahexaenoico en hematíes, en 12 de los pacientes con variantes de síndrome de Zellweger tratados con DHA-EE. El paciente con síndrome de Zellweger clásico, que sólo sobrevivió tres meses, no está incluido aquí. Tampoco lo están los pacientes 1 y 11, por llevar muy poco tiempo de tratamiento. En ésta y las tres figuras siguientes, las barras claras (basales) son los valores obtenidos inmediatamente antes de comenzar el tratamiento. Las oscuras (post-DHA), son los últimos valores obtenidos al confeccionar la gráfica. Sin embargo, la normalización del DHA se produjo mucho antes, ya a las pocas semanas de iniciada la terapéutica.

18:0DMA/18:0 EN HEMATIES

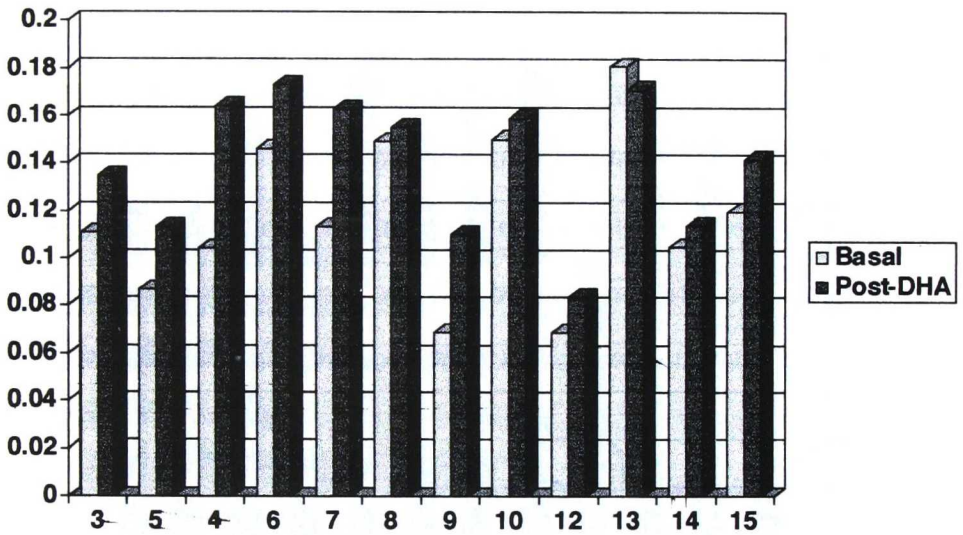


Fig. 41. Relación plasmalógeno/ácido graso de la especie 18:0 en hemáties de 12 de los pacientes tratados con DHA-EE, antes (barras claras) y después (barras oscuras) del tratamiento (ver comentarios a la Fig. 40).

26:0/22:0 EN PLASMA

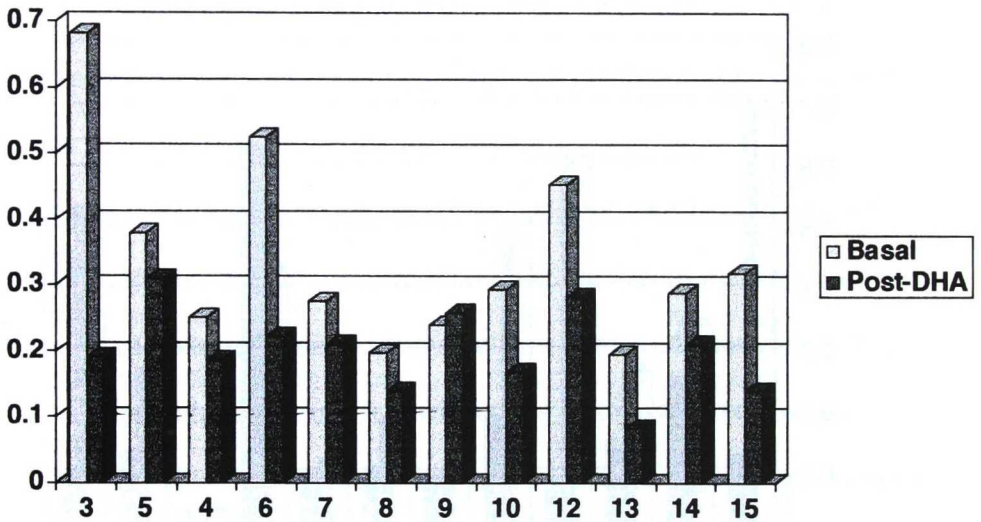


Fig. 42. Relación del ácido graso de cadena muy larga 26:0 al de cadena larga 22:0, en hematíes de 12 de los pacientes tratados con DHA-EE, antes (barras claras) y después (barras oscuras) del tratamiento (ver comentarios a la Fig. 40).

26:1/22:0 EN PLASMA

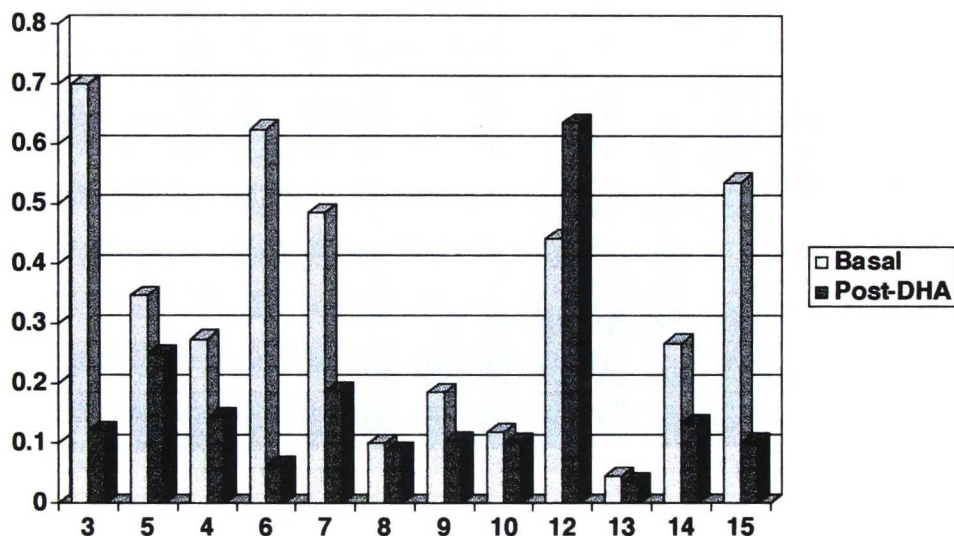


Fig. 43. Relación del ácido graso de cadena muy larga, 26:1 ω 9, al de cadena larga, 22:0, en hematíes en 12 de los pacientes tratados con DHA-EE, antes (barras claras) y después (barras oscuras) del tratamiento (ver comentarios a la Fig. 40).

colaboración con la Dra. A. Peltier y que no figura en la Tabla V), experimentó una clara mejoría hepática y neurológica que, según el Servicio de Neurorradiología del Hospital Saint Pierre, fué acompañada de una normalización de las anomalías típicas de síndrome de Zellweger detectadas por resonancia magnética cerebral antes del inicio de la terapéutica. Esta normalización o, como mínimo, mejoría en la resonancia magnética (RM) craneal la hemos podido comprobar personalmente en varios pacientes más y afecta principalmente a la mielina cerebral, como veremos más adelante.

En el momento actual, llevamos tratados con nuestro etil ester de DHA 23 enfermos en total, de ellos sólo los 15 mostrados en la Tabla V los hemos seguido personalmente. Ultimamente, estamos además siguiendo a distancia, en colaboración con los respectivos médicos, con otros tres enfermos que están en tratamiento con DHA-EE en Europa (el mencionado paciente de Bruselas, otro en Francia y un tercero en Ginebra, que acaba de iniciar la terapéutica). Los otros 5 enfermos siguieron el tratamiento con otros médicos con fines experimentales durante un tiempo limitado (desde unos pocos meses a un año). Pasado este tiempo el tratamiento fué interrumpido. Es importante puntualizar que durante todo el tiempo los

enfermos siguieron la dieta restrictiva clásica de estos enfermos: baja en ácido fitánico y muy pobre en grasas. De estos 5 pacientes, 3 fallecieron y un cuarto quedó en estado vegetativo, todos ellos después de haber interrumpido el tratamiento. El quinto sobrevive y está tomando otro preparado de DHA.

De los 15 enfermos que hemos llevado personalmente ninguno ha interrumpido el tratamiento desde el momento de su instauración (a las edades expuestas en la Tabla V). En contraste con los otros enfermos tratados en Europa, nuestros pacientes han recibido siempre la terapéutica con DHA-EE dentro de una dieta completa y lo más nutritiva posible para la edad del niño. De estos 15 pacientes sólo uno tenía un síndrome de Zellweger clásico (Caso nº 2) y se encontraba en un estado crítico, con cuadros bronconeumónicos de repetición. Los demás tenían variantes menos severas (adrenoleucodistrofia neonatal o enfermedad de Refsum infantil). Aparte del enfermo con síndrome de Zellweger y de otra paciente que estaba ya en estado terminal cuando comenzamos la terapéutica (52), sólo otro de nuestros enfermos tratados (caso nº 6) ha fallecido hasta el momento, y fué de una enfermedad intercurrente totalmente inesperada. Se trataba de una niña que había mejorado espectacularmente durante el primer año de tratamiento (53) y que,

desgraciadamente, durante una infección aparentemente banal, sufrió una sepsis fulminante que acabó con su vida en pocas horas (54). Los otros 12 pacientes (más los 3 tratados en colaboración) sobreviven, y algunos llevan ya más de cuatro años de tratamiento

Hasta el momento, las mejorías más constantes han sido la visual (Fig. 44 y 45) y la hepática (Fig.46.48). Referente a la primera, aunque a veces sólo hemos conseguido obtener el seguimiento de un foco luminoso potente, otras veces la mejoría ha sido más marcada. Por ejemplo, una paciente que comenzó el tratamiento a los 9 meses de edad (caso nº 7 de la Tabla V) y que estaba ya aparentemente ciega, con movimientos anormales de los ojos y desviación conjugada de la mirada hacia arriba (Fig. 44a), comenzó a seguir un foco luminoso a los 6 meses de tratamiento y, a los 10 meses, seguía ya objetos (Fig. 44b). En la actualidad, esta niña tiene un contacto visual relativamente bueno y es capaz de reconocerse en el espejo (Fig. 44c) y jugar con su propia imagen durante largo rato. Otra paciente con adrenoleucodistrofia neonatal (caso nº 13 de la Tabla V), que a los 5 años de edad tenía ya una desmielinización avanzada y una pérdida de visión muy importante (Fig 45a), experimentó una clara mejoría visual (Fig. 45b) y auditiva durante el primer año de tratamiento. A pesar de su gran afectación motora y ataxia, esta niña comenzó a andar mejor y a



Fig. 44. Paciente con adrenoleucodistrofia neonatal (caso n° 7). A los 8 meses de edad (a), la niña estaba aparentemente ciega, con nistagmus continuo, movimientos oculares anormales y desviación conjugada de la mirada hacia arriba. A los 18 meses (b) podía seguir objetos y a los 3 años jugaba con su imagen en el espejo (c).

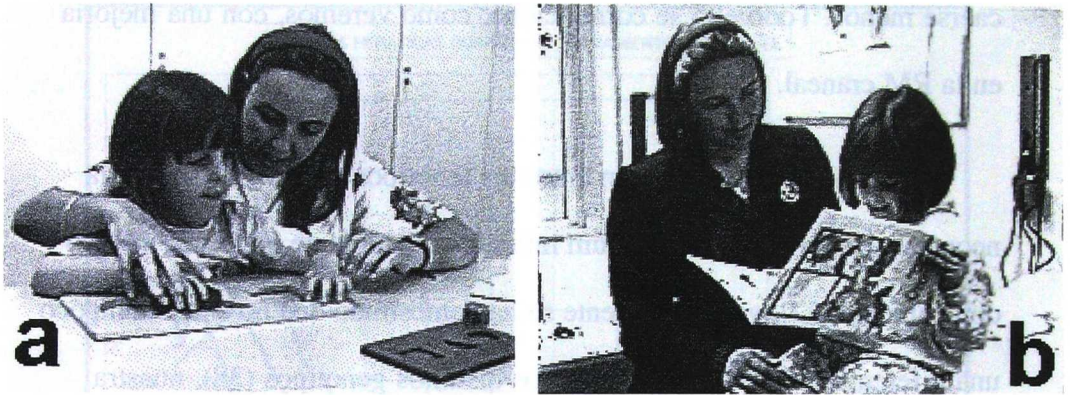


Fig. 45. Paciente con enfermedad peroxisomal generalizada (caso n° 13), que comenzó el tratamiento con DHA-EE a los 5 años de edad (a). Dentro de su marcado retraso psicomotor, la niña había tenido un desarrollo relativamente aceptable hasta los 3 años y había llegado a andar. A partir de esta edad, las funciones adquiridas empezaron a perderse y la audición, la visión y la marcha se deterioraron, apareciendo ataxia y caídas frecuentes. A pesar del diagnóstico inicial de enfermedad de Refsum infantil, el curso clínico y la RM craneal indicaron que esta niña tenía adrenoleucodistrofia neonatal; cuando llegó a nuestro hospital la paciente estaba en fase de desmielinización activa (Fig. 54) y la visión era ya muy pobre (a, nótese como la madre tiene que ayudar a la niña a encontrar y colocar las piezas del puzzle). Diez meses más tarde (b), la mejoría visual era evidente. La audición también había mejorado. A los 9 años de edad, la RM craneal indicó que el proceso de desmielinización sea había estacionado (ver más adelante y Fig. 54).

caerse menos. Todo ello se correlacionó, como veremos, con una mejoría en la RM craneal.

Aunque la diferenciación entre los fenotipos adrenoleucodistrofia neonatal y enfermedad de Refsum infantil es totalmente artificial, incluso clínicamente (37), y recientemente se ha demostrado que no existe tampoco una diferenciación molecular entre los distintos genotipos (38), nuestra experiencia indica que los enfermos catalogables como enfermedad de Refsum infantil, cuyo cuadro clínico está dominado por una afectación hepática y del desarrollo pondoestatural son los que mejor responden al tratamiento. Estos niños suelen presentar un cuadro de desnutrición severa (casos nº 3 y 6 de la Tabla V). Son niños marasmáticos por un mecanismo mixto de afectación hepática, con dificultad en la absorción intestinal, sobre todo de lípidos (esteatorrea), y dificultad a la alimentación. Como ya hemos mencionado anteriormente, el efecto del DHA-EE sobre el cuadro hepatodigestivo es a veces espectacular. La mejoría es rápidamente evidenciable en las pruebas de laboratorio. Las transaminasas (Fig. 46) y, a menudo, también la α -fetoproteína (Fig. 47-48) descienden abruptamente. Desde un punto de vista clínico, la mejoría del estado nutricional es también muy rápida. Las pacientes nº 3 y 6 (Tabla V) han constituido claros ejemplos de lo que llevamos dicho. La primera llegó a nuestro

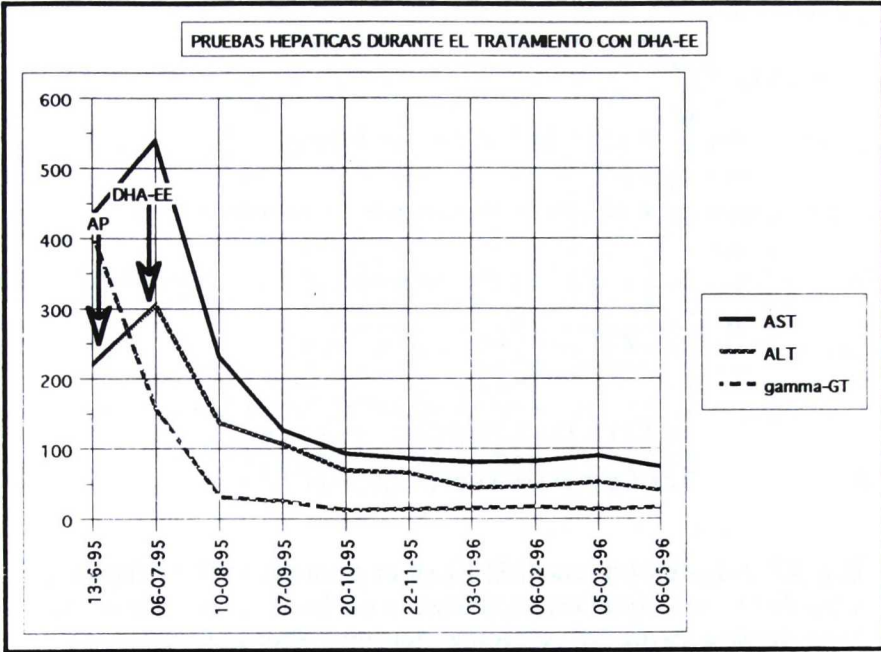


Fig. 46. Pruebas de funcionalismo hepático en la paciente nº 3. Las flechas indican los momentos de comienzo del tratamiento con aceite de pescado (AP) y con etil ester del ácido docosahexaenoico (DHA-EE). Obsérvese la bajada brusca de los tres enzimas a partir del momento en que se inició el tratamiento.

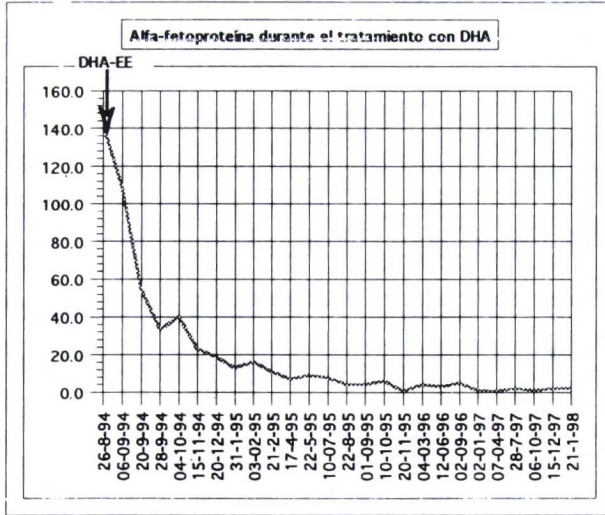


Fig. 47. Alfa-fetoproteína (AFP) en el paciente nº 9. Como en el caso de las otras pruebas hepáticas, la caída de los niveles de AFP es vertiginosa a partir del comienzo del tratamiento con DHA-EE

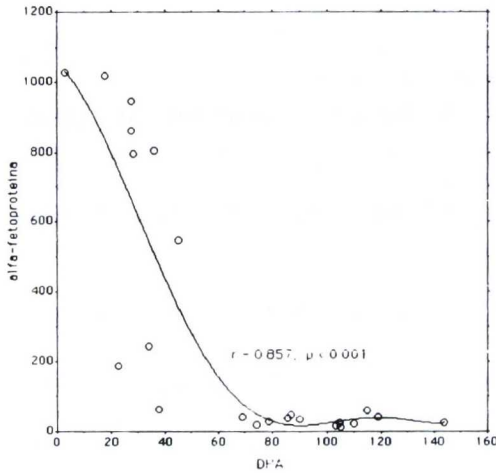


Fig. 48. Correlación entre los niveles de DHA en plasma y la actividad de la AFP en el paciente nº 3. Como en las figuras anteriores la caída en la AFP es muy brusca, normalizándose a partir de niveles plasmáticos de DHA de 80 nmoles/ml.

hospital con un cuadro severo de ictericia colestática y marasmo (Fig. 49a). La pequeña requería alimentación continua por sonda nasogástrica y presentaba una marcada hipoglicemia al ayuno. En sólo cuestión de días la paciente pudo alimentarse normalmente y sin sonda. El cuadro hepático mejoró rápidamente y a los dos meses de iniciado el tratamiento, la niña tenía un buen estado de nutrición (Fig. 49b) y la hipotonía axial y fuerza muscular habían mejorado notablemente (Fig. 49c). La evolución de la paciente nº 6 ha sido descrita ampliamente en dos publicaciones (53,54).

Aunque el paciente nº 1 lleva sólo 6 meses de tratamiento en este momento y por eso no está incluido en las Fig. 40-43, su mejoría ha sido tan rápida que podemos mencionarlo aquí, dentro de este grupo de pacientes con afectación especialmente hepática y del estado de nutrición. Este paciente tenía 4 meses cuando vino a nuestro hospital, con un escaso desarrollo pondoestatural y psicomotor, afectación hepática, esteatorrea e hipotonía axial. El pequeño vino tomando ya otro preparado de DHA de libre dispensación en los Estados Unidos (país de donde procedía), que le estaba siendo administrado por iniciativa materna desde hacía un mes. Curiosamente, si bien la madre refería una franca mejoría en cuanto a visión y contacto social, la esteatorrea era aún muy intensa (++++). Sin embargo y a pesar de asociar el tratamiento a una dieta mucho más rica en

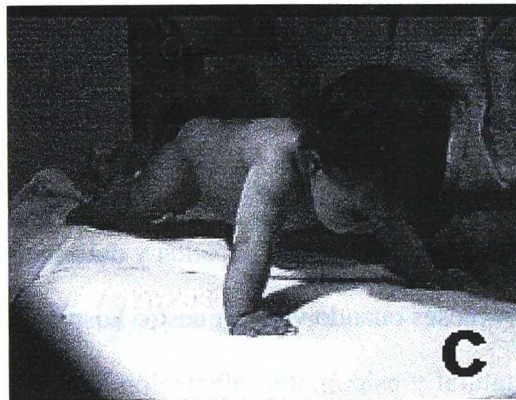
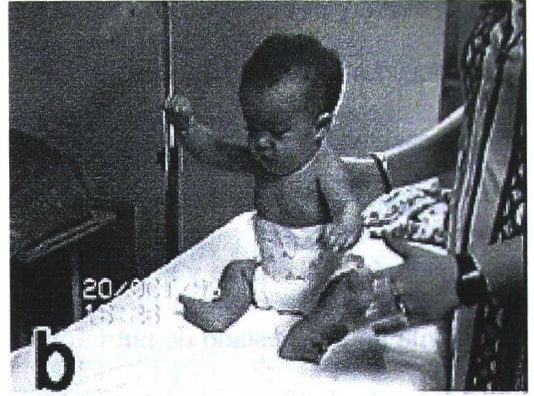
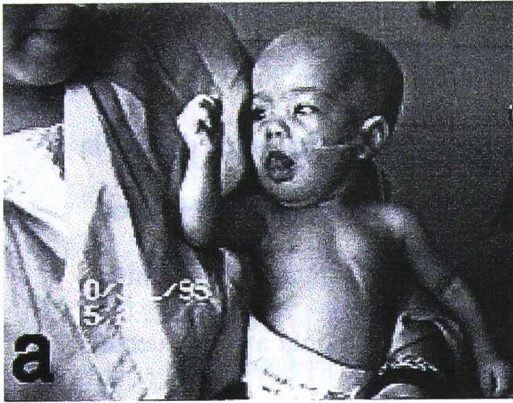


Fig. 49. Paciente con enfermedad de Refsum infantil (caso n° 3). A los 5 meses y medio de edad (a), la niña presentaba una gran hepatomegalia, con un cuadro severo de ictericia por colestasis y una profunda desnutrición (peso, 3900 g). Tenía una marcada hipoglucemia al ayuno, requiriendo alimentación por goteo continuo mediante sonda nasogástrica. El tono muscular estaba disminuido en tronco y sobre todo en cuello (hipotonía axial) y la visión era aparentemente nula. En cuestión de sólo unos pocos días de iniciado el tratamiento con DHA-EE, la mejoría hepática (Fig. 47) y del estado nutricional fueron claras y marcadas y, 3 meses más tarde, el aspecto de la niña había cambiado totalmente (b). A los 8 meses (c), la paciente tenía un tono y fuerza muscular normales.

grasa que la que recibía previamente, la esteatorrea desapareció casi totalmente durante las tres primeras semanas de tratamiento con DHA-EE. Esta supuesto efecto terapéutico superior del etil ester con respecto a otros preparados de DHA no es, por el momento, explicable y merece un ulterior estudio.

Desde el punto de vista neurológico y siempre que el daño no haya sido ya totalmente irreversible hemos constatado un avance del desarrollo psicomotor y tono muscular, especialmente en niños de pocos meses, en los que la maduración del sistema nervioso central aún no había finalizado. Sin duda, la prueba más objetiva de la mejoría neurológica la hemos encontrado en el seguimiento por resonancia magnética craneal de la mielinización cerebral de estos niños. Como queda dicho, los pacientes peroxisomales generalizados tienen alteraciones de la mielina (dismielinización y/o desmielinización). Pues bien, en 7 de los enfermos tratados hasta ahora (más el anteriormente mencionado de Bruselas) la mielina cerebral ha experimentado una clara mejoría, y en tres de ellos se ha normalizado totalmente. Los resultados obtenidos por resonancia magnética quedan resumidos en la Tabla VI y acaban de aparecer publicados en la revista *Neurology* (55). Otros, más recientes, están actualmente en prensa (56,57). Las figuras 50 a 56 muestran estos

Tabla VI. Resultados de la resonancia magnética cerebral en los enfermos peroxisomales tratados con DHA-EE*.

Caso nº	Basal	Ultima RM
1	4 meses, hipomielinización	-
2	5 meses, dismielinización, heterotopias, quistes endimarios	-
3	5 meses, no valorable	3 años, normal
4	6 meses, hipomielinización	4 años, normal
5	7 meses, hipomielinización	-
6	9 meses, hipomielinización	-
7	9 meses, hipomielinización	4 10/12 años, normal
8	15 meses, hipomielinización	4 10/12 años, normal
9	15 meses, hipomielinización	2 años, remielinización
10	16 meses, desmielinización	3 años, remielinización
11	3 años, casi normal	-
12	3 1/3 años, desmielinización	-
13	5 años, desmielinización	7 años, ligera remielinización
14	5 años, desmielinización	-
15	7 años, desmielinización	14 años, estabilización

*DHA-EE, etil ester del ácido docosahexaenoico. RM, resonancia magnética. Los guiones indican que aún no hemos estudiado una segunda RM o que no se pudo practicar. En la segunda y tercera columna se indican las edades de los pacientes, antes del tratamiento y la edad actual, respectivamente.

cambios en la mielinización cerebral detectados por RM en los citados 7 pacientes. Probablemente, la mejoría más significativa la obtuvimos en la niña cuya tratamiento empezó a los 5 años, y que presentaba ya una desmielinización avanzada (caso nº 13) y progresiva. La primera RM craneal con contraste intravenoso demostró que la desmielinización estaba en fase activa. Un año después del inicio del tratamiento, esta actividad había desaparecido y la mielina cerebral se había estabilizado, mostrando una tendencia a la remielinización (Fig. 56).

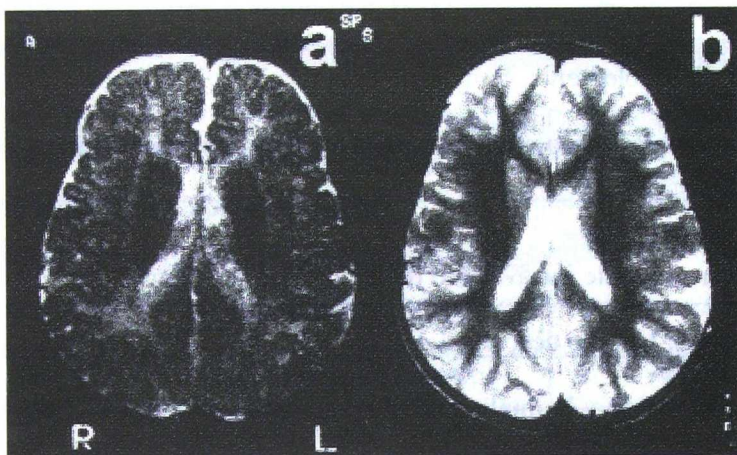


Fig. 50. RM potenciada en T2 en una paciente con enfermedad de Refsum infantil (caso n° 3), a los 5 meses y medio (a), antes de iniciar el tratamiento con DHA-EE, y a los 3 años de edad (b). Aunque la primera exploración es difícil de valorar, debido a la escasa edad de la paciente, en la segunda RM la mielinización es totalmente normal.

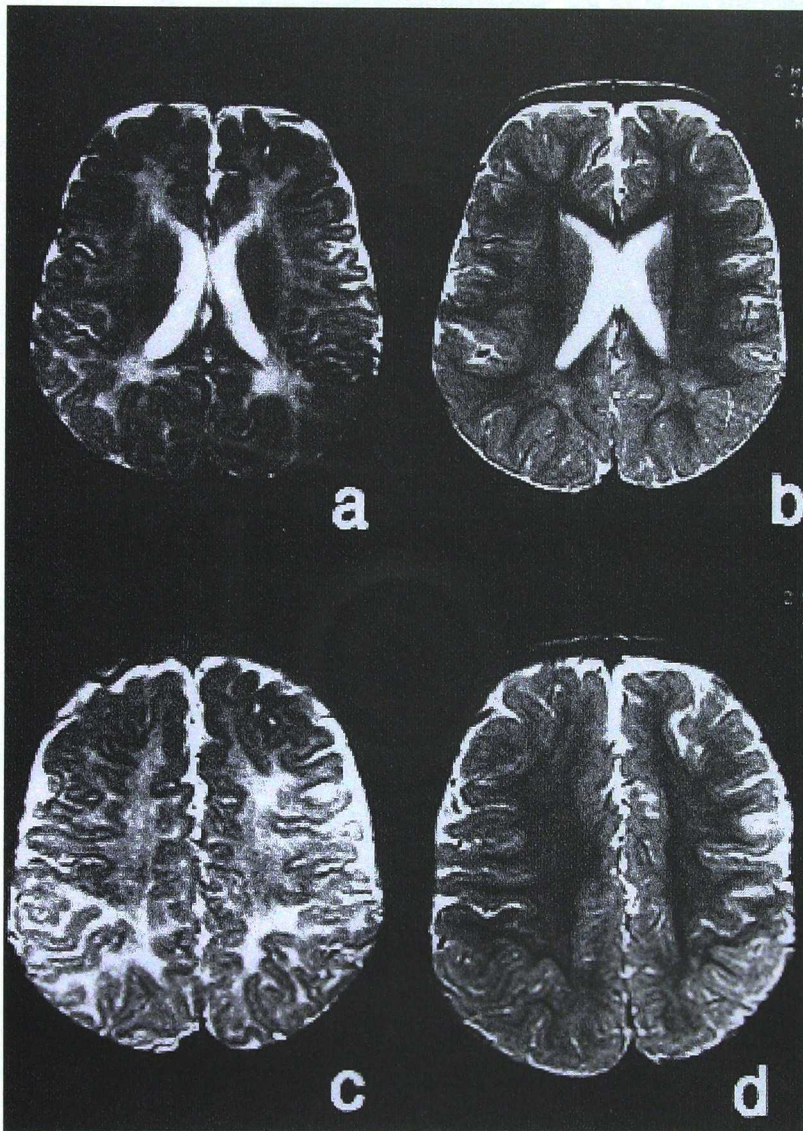


Fig. 51. RM craneal en un paciente diagnosticado de síndrome de Zellweger (caso n° 5), aunque no se detectaban alteraciones de migración neuronal, pero sí una franca hipomielinización a los 9 meses de edad (a,c). A los 36 meses, observamos una marcada mielinización de la sustancia blanca, tanto a nivel de los ventrículos laterales (b) como en el centro semioval (d), con un aspecto idéntico al de un cerebro maduro. Sólo persisten algunas zonas hipomielinizadas, probablemente terminales, por detrás de los trígonos de los ventrículos laterales.

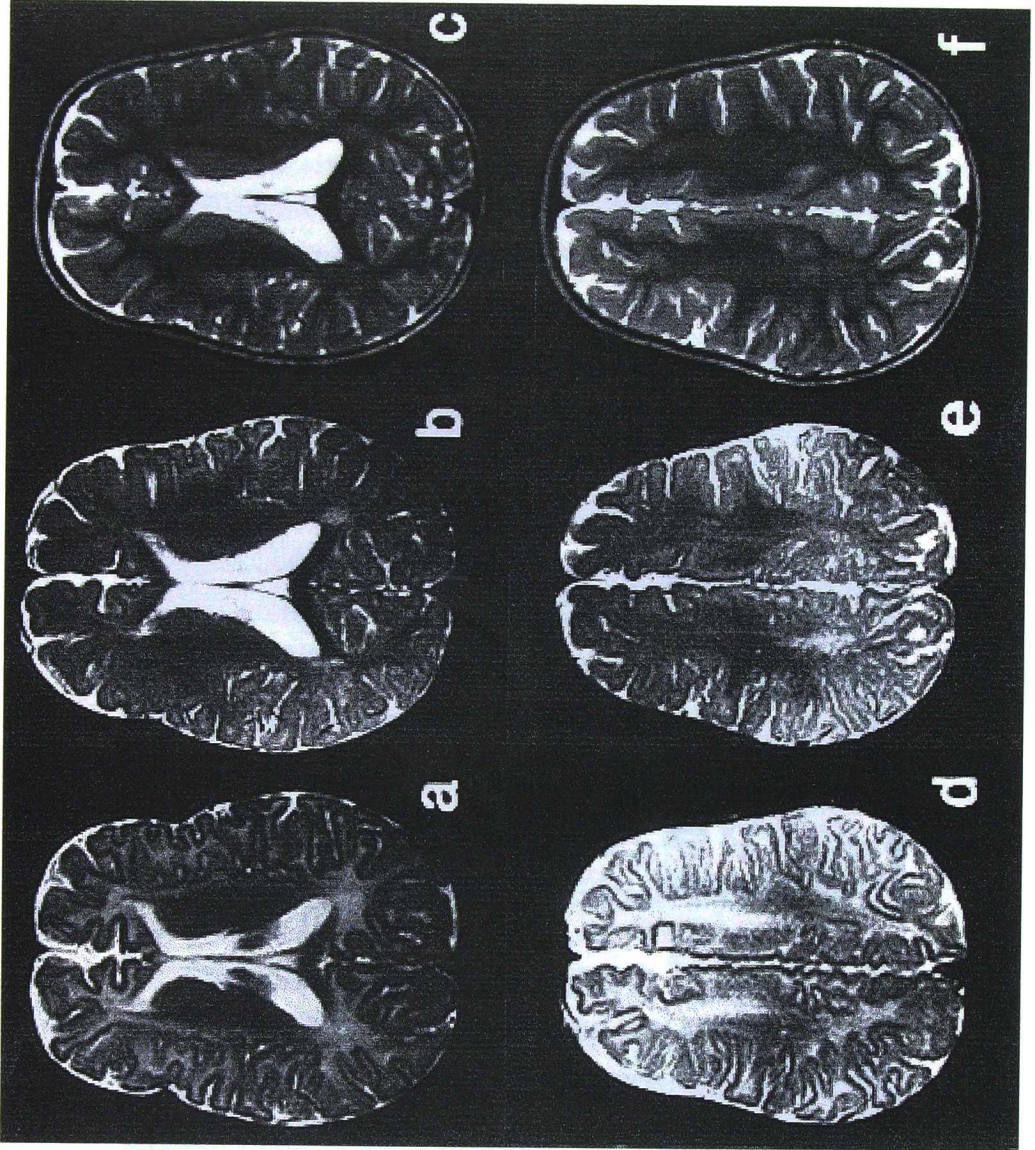


Fig. 52. Exploraciones por RM craneal potenciada en T2, practicadas a la paciente n° 7 a los 9 meses (a,d), a los 18 meses (b,e) y a los 4 años y medio (c,f) de edad. Obsérvese la escasez de mielina en la primera exploración (a,d) y el progreso alcanzado 8 meses más tarde (b,d), en que la mielinización es casi normal, restando sólo unas zonas de escasa mielina en áreas occipitales, que pueden corresponder a zonas terminales. En la última RM (c,f), la mielinización es ya totalmente normal.

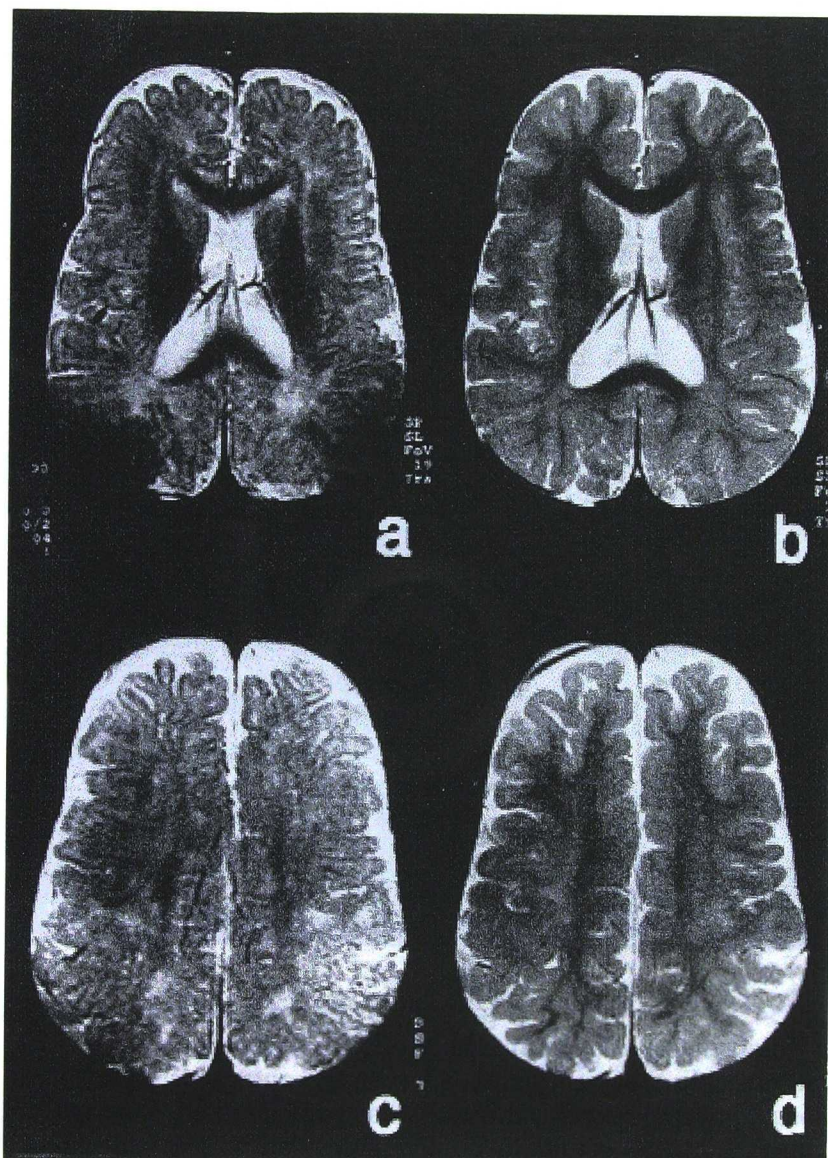


Fig. 53. RM craneal potenciada en T2 en el paciente nº 8, a los 15 meses y a los 3 años de edad. En la primera exploración por RM (a,c) se puede ver la ausencia de mielina en la sustancia blanca periventricular y lóbulos occipitales. En la última RM (b,d), la mielinización ha progresado significativamente, apareciendo una marcada arborización hipointensa de la sustancia blanca subcortical.

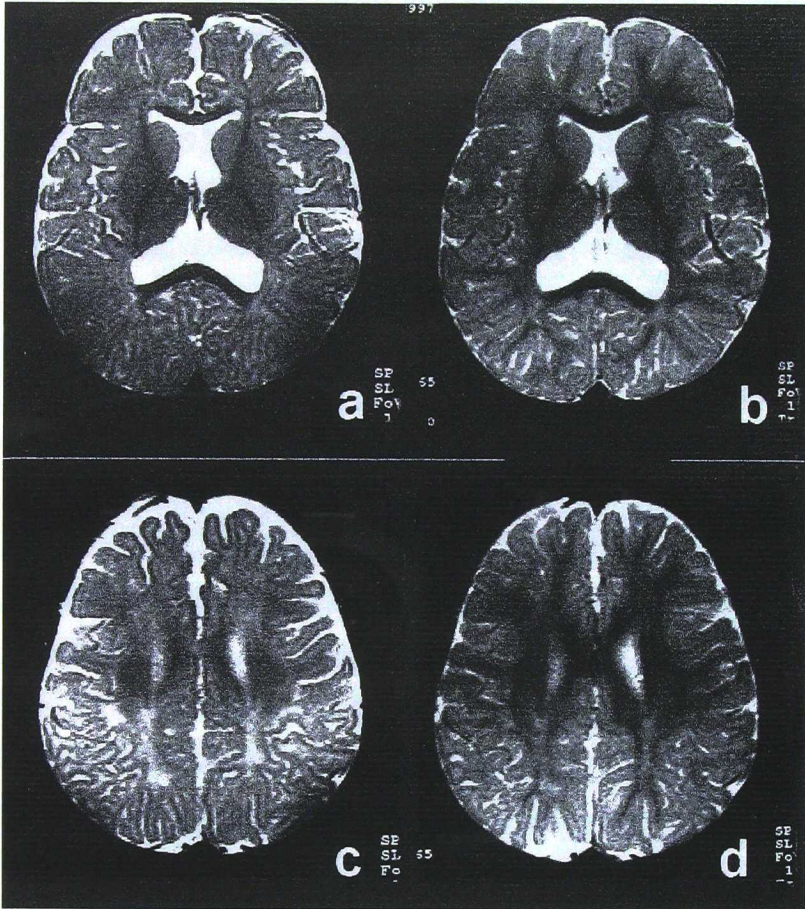


Fig. 54. RM cerebral en el paciente n° 10. **a,c** imágenes potenciadas en T2 obtenidas a los 16 meses de edad, que muestran una mielinización escasa, limitada a los brazos anterior y posterior de la cápsula interna, cuerpo calloso y áreas paracentrales. La sustancia blanca frontal y occipital tiene una intensidad de señal sugestiva de desmielinización. **b,c**, en las RM repetidas, a la edad de 26 meses, se observa un progreso significativo en la maduración de la sustancia blanca, con un marcado aumento de mielina en los lóbulos frontales y finas arborizaciones de la sustancia blanca subcortical.

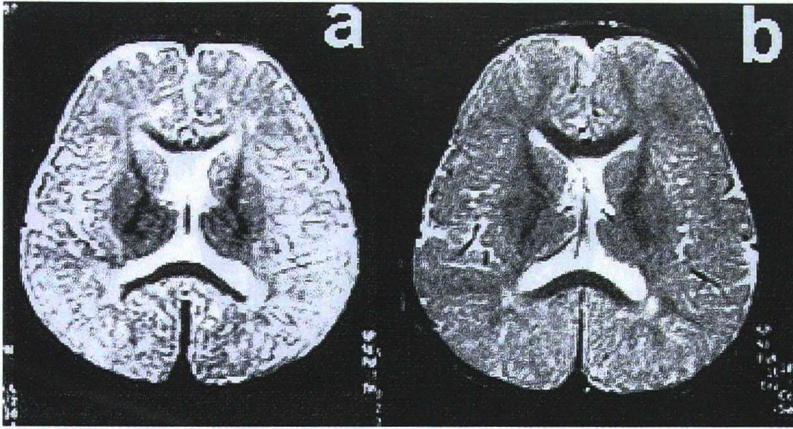


Fig. 55. RM cerebral en el paciente n° 9. **a**, Imágen axial potenciada en T2, obtenida a los 15 meses de edad. Observamos mielina (hipointensa) a nivel de cápsulas internas y cuerpo callosos, con gran escasez de mielinización del resto de sustancia blanca. **b**, Imágen potenciada en T2 al mismo nivel que la anterior, realizada 8 meses más tarde. El progreso en la mielinización es evidente, sobre todo en lóbulos frontales, aunque también en sustancia blanca subcortical occipital.

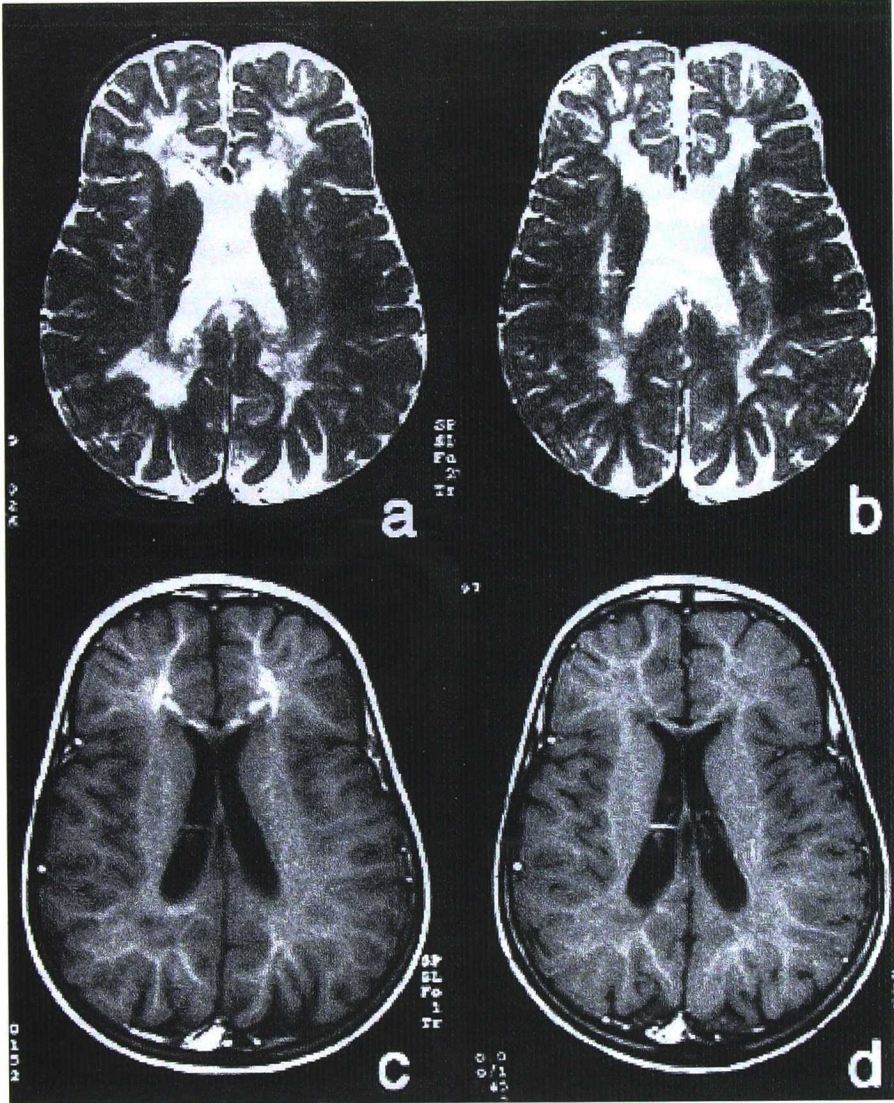


Fig. 56. RM craneal en una paciente con adrenoleucodistrofia neonatal (caso n° 13), a los 5 años (a,c), antes del tratamiento con DHA-EE, y a los 7 años (b,d). En las RM potenciadas en T2 (a,b) puede observarse una discreta tendencia a la remielinización. Sobre todo, en las exploraciones potenciadas en T1, realizadas con contraste endovenoso (gadolinio), puede observarse una marcada captación del contraste en la RM practicada antes del tratamiento (c), indicando que existía una desmielinización activa en ese momento. En la segunda RM practicada dos años más tarde, la desmielinización había cesado, como queda reflejado en la ausencia de captación de contraste en d.

Discusión

Los efectos positivos sobre la visión en nuestros enfermos están en consonancia con la importante función que se atribuye al DHA en la retina y con estudios en el mono y en el ser humano (31,32). Asimismo, el hecho de que la mielinización haya mejorado en varios de nuestros pacientes apoya estudios en el animal de experimentación, que han demostrado un efecto pernicioso de la carencia ω 3 sobre la mielinización (58). En cuanto al mecanismo de acción, es difícil saber a qué se debe el efecto positivo sobre la mielinogénesis, ya que la mielina en sí no tiene un alto contenido de DHA. Sin embargo, la membrana del oligodendrocito, como la de las neuronas y la mayoría de las células, sí tiene fosfolípidos ricos en DHA. El ácido docosahexaenoico podría pues jugar su papel a nivel de oligodendrocito formador de mielina. Siendo los plasmalógenos lípidos fundamentalmente mielínicos, otro posible mecanismo podría estar relacionado con el aumento de los niveles de plasmalógenos producido en nuestros pacientes por el DHA-EE.

En cualquier caso, la carencia de ácido docosahexaenoico debe corregirse cuanto antes. Como hemos visto, el desarrollo cerebral es un proceso perinatal en la especie humana. La sinaptogénesis y la

mielinogénesis comienzan ya en el tercer trimestre de vida intrauterina (como vimos a las 32 semanas de gestación) y el desarrollo de la retina es aún más temprano. Los lípidos que forman estas estructuras se necesitan pues especialmente durante el tercer trimestre de la gestación. Las enfermedades peroxisomales se fraguan antes de ese tiempo y, además, existe esa carencia marcada de un ácido graso poliinsaturado importante, como es el DHA, que no está cuando más se necesita. Aunque la mielinización prosigue postnatalmente y el oligodendocito conserva su capacidad de formar mielina durante años, no podemos jamás esperar restituir funciones actuando tarde, ni aún en el caso improbable de que la carencia de DHA fuera el único o el más importante factor en la enfermedad. Por lo tanto, lo ideal sería iniciar el tratamiento con ácido docosahexaenoico lo antes posible, en seguida de nacer o incluso antes, suministrando DHA-EE a la madre gestante. Ninguno de nuestros pacientes ha comenzado el tratamiento lo suficientemente pronto y la mayoría lo ha iniciado tarde o muy tarde (después de los 6 meses o incluso del año de edad), lo que hace que los efectos beneficiosos obtenidos sean más significativos.

Aunque es obvio que estos niños no podrán ser nunca normales, creemos que el tratamiento con DHA contribuye a mejorar su calidad de

vida y su supervivencia de un modo importante. Por lo tanto, aconsejamos administrarlo a todos los pacientes con enfermedades peroxisomales generalizadas, con la posible excepción de los que tienen síndrome de Zellweger clásico, en los que las alteraciones al nacer son ya tan profundas que poco se puede hacer por estos niños por pronto que se inicie el tratamiento. Lógicamente, será en las formas menos severas de la enfermedad, tratadas tempranamente, en las que cabrá esperar mejorías más significativas.

Conclusiones

En resumen, podemos extraer las siguientes conclusiones en cuanto a los ácidos grasos poliinsaturados, desarrollo cerebral y enfermedades peroxisomales generalizadas:

1. Los ácidos grasos poliinsaturados, en especial el docosahexaenoico (DHA), son de fundamental importancia en el cerebro y la retina y su acreción es máxima durante el tercer trimestre de la gestación y el período perinatal. Es en este momento cuando carencias o desequilibrios en el suministro de ácidos grasos esenciales pueden conducir a alteraciones neurológicas o visuales.

2. En las enfermedades peroxisomales generalizadas (síndrome de Zellweger y variantes) existe una marcada carencia de DHA en el cerebro y la retina, carencia que podría explicar, al menos en parte, el daño neurológico y visual de estos enfermos.

3. Cuando se administra etil ester de DHA a pacientes con enfermedades peroxisomales los niveles de DHA se normalizan rapidamente en sangre y se obtienen además otras mejorías bioquímicas que indican que el DHA puede estar implicado en la patogenia de la enfermedad peroxisomal.

4. El tratamiento con DHA produce mejorías en la mielinización cerebral, detectables por resonancia magnética cerebral. Estas mejorías sugieren que el DHA es necesario para una correcta mielinogénesis.

5. El tratamiento con etil ester de DHA es una terapéutica oral fisiológica e inocua, consistente en corregir la carencia de un compuesto fundamental para el cerebro y la retina. Por consiguiente, este tratamiento debe administrarse a todos los pacientes peroxisomales que presenten una carencia de DHA.

6. Dado que el período vulnerable es perinatal en el niño, el tratamiento debería comenzarse antes de que termine este momento crítico, es decir, lo más cerca posible del nacimiento, a fin de que el daño cerebral no sea ya irreversible.

PERSPECTIVAS FUTURAS

La existencia de una importante carencia de DHA en enfermos con fallo enzimático múltiple debido a una biogénesis defectuosa de los peroxisomas plantea una serie de preguntas, algunas de las cuales pertenecen al terreno de la bioquímica básica. Incluso, la propia síntesis del DHA no está completamente aclarada. Aunque la nueva ruta de Sprecher (29) es la generalmente aceptada en la actualidad, los cambios bioquímicos en nuestros enfermos sugieren que la Δ^4 -desaturación clásica puede ser la afectada en estos pacientes. En efecto, en el síndrome de Zellweger verdadero los dos productos directos de la Δ^4 desaturación (DHA y 22:5 ω 6) están disminuídos, mientras que sus precursores (22:4 ω 6 y 22:5 ω 3) no lo están, o incluso están algo aumentados como si hubiera un bloqueo a este nivel (40-44). En cambio, los precursores del DHA según la nueva ruta (24:5 ω 3 y 24:6 ω 3) no son detectables en los enfermos peroxisomales. Otra dificultad con respecto a la ruta de Sprecher es que con ella resulta difícil explicar porqué los enfermos con adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X, otra enfermedad peroxisomal con β -oxidación afectada, no tienen una carencia de DHA. Si el ácido docosaheptaenoico se forma verdaderamente por β -oxidación del precursor

24:6 ω 3, y sólo por esta vía, entonces el DHA debería estar disminuído también en esta enfermedad. Pero como hemos visto no es así.

Un hallazgo curioso que merece profundizarse, por las posibles implicaciones conceptuales que pueda tener en cuanto al metabolismo de los ácidos grasos, fué el fuerte aumento en los niveles de 22:5 ω 6 que encontramos en los cerebros de dos de los enfermos diagnosticados de adrenoleucodistrofia neonatal. En cambio, en los pacientes con síndrome de Zellweger el 22:5 ω 6 estaba muy disminuído. De hecho, esto fué lo que nos llevó a sospechar un defecto de la Δ 4-deasturasa en los pacientes peroxisomales (40-43). Como hemos visto, el 22:5 ω 6 es el producto final en la síntesis de poliinsaturados ω 6, del mismo modo que el 22:6 ω 3 lo es en la síntesis de los poliinsaturados ω 3, y esto es así tanto para la ruta metabólica clásica como para la nueva ruta de Sprecher (Fig. 21). Por ende, cualquier defecto en esta vía debería afectar a las dos familias de poliinsaturados y producir una disminución tanto del 22:6 ω 3 como del 22:5 ω 6. Sin embargo, como decimos, no fué así en dos de los enfermos con adrenoleucodistrofia neonatal (45-46). ¿A qué se debe este comportamiento metabólico tan diferente en unos y otros enfermos?

¿Por qué los productos de una ruta que se creía común se mueven en sentidos opuestos? ¿Existen en realidad dos sistemas enzimáticos distintos para las dos familias $\omega 3$ y $\omega 6$, en contra de lo que se ha venido aceptando hasta ahora?

Otro hecho inexplicable por el momento y que hemos podido comprobar en nuestro último estudio en fosfolípidos de enfermos peroxisomales (49) es que el ácido araquidónico esté preservado, e incluso francamente aumentado en el cerebro de estos pacientes, aunque en el plasma suele estar disminuído. El aumento del precursor de la serie, ácido linoleico (18:2 $\omega 6$), y de la relación 18:2 $\omega 6$ /20:4 $\omega 6$ sugiere un bloqueo a nivel de la $\Delta 6$ -desaturasa, cuya existencia está por comprobar.

En cuanto al tratamiento, no está claro si el preparado de DHA que se administre puede tener alguna influencia sobre su efectividad. La principal ventaja del etil ester es su elevado grado de pureza (superior al 90%). En cambio, el contenido de DHA de las mezclas comerciales de triglicéridos no llegan al 50%. Las mezclas de fosfolípidos y el aceite de pescado tienen niveles de DHA aún más bajos. El último, además, tienen un elevado contenido de ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 $\omega 3$) que, estando situado antes que el DHA en su ruta metabólica, teóricamente podría resultar perjudicial. A este respecto, fué curiosa nuestra experiencia sobre

la mejoría de la esteatorrea en un paciente cuando tomó etil ester de DHA, mejoría que no se había producido con una mezcla de triglicéridos que contenía un sólo un 40-45% de DHA. Aunque al ser una observación aislada este hecho podría ser casual, no podemos descartar que el etil ester de DHA se absorba y/o se incorpore en los tejidos más fácilmente que otros derivados. La pureza del preparado podría también tener una influencia sobre su efectividad. Cuando se usa una mezcla lipídicos, existe siempre el peligro de que los efectos del DHA queden neutralizados por otros ácidos grasos. En cualquier caso, las posibles diferencias entre los distintos preparados deberían estudiarse más profundamente.

Finalmente, hay algunas cuestiones básicas que se refieren a los peroxisomas como organelas posiblemente responsables de la carencia de DHA en enfermos con síndrome de Zellweger y que están aún por resolver. Clasicamente se había creído que los ácidos grasos poliinsaturados se generan en el retículo endoplásmico. Sin embargo la ruta de Sprecher sitúa dicha síntesis en el peroxisoma. Ello tiene la ventaja de relacionar la carencia de DHA con el defecto peroxisomal. No obstante, nuestros resultados con el tratamiento, al obtenerse una disminución de los ácidos grasos de cadena muy larga, parecen sugerir que la carencia de DHA podría ser la causa más bien que la consecuencia

del malfuncionamiento peroxisomal. Una disquisición teórica interesante sobre este tema ha aparecido recientemente (59). Todas estas incógnitas y otras más que indudablemente irán apareciendo deberán tener una respuesta en investigaciones futuras.

REFERENCIAS

1. Dobbing J. Vulnerable periods in developing brain. En Davison AN, Dobbing J, ed. Applied Neurochemistry. Edinburgo: Blackwell, 1968: 287-316.
2. Dobbing J. y Sands J. Vulnerability of developing brain. IX. The effect of nutritional growth retardation on the timing of the brain growth-spurt. Biol. Neonate 1971; 19: 363-378.
3. Davison AN and Dobbing J. The developing brain. En Davison AN, Dobbing J, ed. Applied Neurochemistry. Edinburgo: Blackwell, 1968: 253-286.
4. Culley WJ, Lineberger RO. Effect of undernutrition on the size and composition of the rat brain. J. Nutr. 1968; 96: 375-381.
5. Wiggins RC, Fuller GN. Relative synthesis of myelin in different brain regions of postnatally undernourished rats. Brain Res. 1979; 162: 103-112.
6. Conde C, Martínez M, Ballabriga A. Some chemical aspects of human brain development. I. Neutral glycosphingolipids, sulfatides, and sphingomyelin. Pediat Res 1974; 8: 89-92.

7. Martínez M. Estudio bioquímico comparativo del desarrollo del cerebelo y cerebro humanos durante el período de máxima vulnerabilidad. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Medicina, 1976.

8. Martínez M, Ballabriga A. A chemical study on the development of the human forebrain and cerebellum during the brain “growth spurt” period. I. Gangliosides and plasmalogens, *Brain Res*, 1978; 159: 351-362.

9. Purpura D.P. Morphogenesis of the visual cortex in the preterm infant. En Brazier MAB, ed. *Growth and Development of the Brain*. New York: Raven Press, 1975: 33-49.

10. Martínez, M. Myelin Lipids and Gangliosides During early Human Brain Development in Normal and Undernourished Children, In O. Thalhammer, K. Baumgarten and A. Pollak (Ed.) *Perinatal Medicine*, Georg Thieme Publishers, Stuttgart, 1979: 174-181.

11. Martínez M. Myelin lipids in the developing cerebrum, cerebellum, and brain stem of normal and undernourished children, *J. Neurochem.* 1982; 39: 1684-1692.

12. Nonaka G. y Kishimoto Y. Levels of cerebroside, sulfatide, and galactosyl diglycerides in different regions of rat brain. Change during maturation and distribution in subcellular fractions of gray and white matter of sheep brain. *Biochim. Biophys. Acta* 1979; 572: 432-441.

- 13.** Martínez M. Biochemical changes during early myelination of the human brain. En *Developmental Neurobiology*. Evrard P., Minkovski A, eds. New York : Raven Press, 1989;. 185-200.
- 14.** Martínez M. Myelin in the developing human cerebrum, *Brain Res.* 1986; 364: 220-232.
- 15.** Agrawal H.C., Banik N.L., Bone A.H., Davison A.N., Mitchell R.F. y Spohn M. The identity of a myelin-like fraction isolated from developing brain. *Biochem. J.* 1970; 120: 635-642.
- 16.** Savolainen H., Palo J., Riekkinen P., Mörönen P. y Brody L.E. Maturation of myelin proteins in human brain. *Brain Res.* 1972; 37: 253-263.
- 17.** Banik N.L., Davison A.N., Ramsey R.B. y Scott T. Protein composition in developing human brain myelin. *Dev. Psychobiol.* 1974; 7: 539-549.
- 18.** Wiggins R.C., Fuller G.N.. Early postnatal starvation causes lasting hypomyelination. *J. Neurochem* 1978; 30: 1231-1237.
- 19.** Morell P., Quarles R.H. y Norton W.T. Formation, structure, and biochemistry of myelin. En *Basic Neurochemistry*. Siegel G., Agranoff B., Albers R.W. y Molinoff P., eds. New York : Raven Press, 1989;. 109-136.

20. Martínez M, Conde C, Ballabriga A. Some chemical aspects of human brain development. II. Phosphoglyceride fatty acids, *Pediat. Res.* 1974; 8: 91-102.

21. Martínez M, Conde C, Ballabriga A. A chemical Study on Prenatal Brain Development in Humans. En *Nutrition, Growth and Development*. Canosa CA, ed. *Mod. Probl. Paediat.*, 1975; 14: 100-109.

22. Ballabriga, A. and Martinez, M., A chemical study on the development of the human forebrain and cerebellum during the brain "growth spurt" period. II. Phosphoglyceride fatty acids, *Brain Res.*, 1978; 159: 363-370.

23. Martínez M. Dietary polyunsaturated fatty acids in relation to neural development in humans, en *Dietary Omega-3 and Omega-6 Fatty Acids*, C. Galli y A.P. Simopoulos (Ed.), New York : Plenum Publishing Corporation, 1989; 123-133.

24. 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: 484-490.

25. Martínez M. Tissue levels of polyunsaturated fatty acids during early human development. *J Pediat* 1992; 120: S129-138.

- 26.** Clandinin, M.T., Chappell, J.E., Leong, S., Hein, T., Swyer, P.R. y Chace, J.W. (1980) Extrauterine fatty acid accretion in infant brain: implications for fatty acid requirements, *Early Hu. Dev.* 4: 131-138.
- 27.** Horrocks L.A. The alk-1-enyl group content of mammalian myelin phosphoglycerides by quantitative two-dimensional thin-layer chromatography. *J. Lipid Res.* 1968; 9: 469-472.
- 28.** Martínez M, Mougán I. Fatty acid composition of human brain phospholipids during normal development *J Neurochem* 1998; 71; 2528-2533.
- 29.** Voss A, Reinhart M, Sankarappa S, Sprecher H. The metabolism of 7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid to 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid in rat liver is independent of a 4-desaturase. *J Biol Chem* 1991; 266: 19995-20000.
- 30.** Martínez, M., and Ballabriga, A., Effects of parenteral nutrition with high doses of linoleate on the developing human liver and brain, *Lipids* 22: 133-138, 1987.
- 31.** 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: 4021-4025.

32. Holman RT, Johnson SB, Hatch TF. A case of human linolenic acid deficiency involving neurological abnormalities. *Am J Clin Nutr* 1982; 35:617-623.

33. Martínez, M., Requerimientos de ácidos grasos insaturados y desarrollo cerebral del niño. En *Alimentación en el Niño*, Heller S, ed. Asociación Mexicana de Pediatría. Editorial Interamericana-McGraw Hill 1995; 23-40.

34. Bowen, P., Lee, C.S.M, Zellweger, H. y Lindenberg, R. (1964) A familial syndrome of multiple congenital defects, *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 114: 402-414.

35. Goldfischer S, Moore CL, Johnson AB, Spiro AJ, Valsmis MP, Wisniewski HK, Ritch RH, Norton WT, Rain I, Gartner LM. Peroxisomal and mitochondrial defects in the cerebro-hepato-renal syndrome. *Science* 1973; 182: 62-64.

36. Lazarow PB, Moser HW. Disorders of Peroxisome Biogenesis, *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. En Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, ed. 1995: 2287-2324, 7th edition, McGraw-Hill (New York).

37. Martínez M. Sintomatología clínica de las enfermedades peroxisomales generalizadas. *Rev. Neurología* 1988 (en prensa).

38. Powers JM, Moser HW. Peroxisomal disorders: genotype, phenotype, major neuropathologic lesions, and pathogenesis. *Brain Pathol* 1988; 8: 101-120.

39. Goldfischer S., Collins J., Rapin I., Neumann P., Neglia W. Spiro A.J., Ishii T., Roels F., Vamecq J. and Van Hoof F. Pseudo-Zellweger syndrome: Deficiencies in several peroxisomal oxidative activities. *J. Pediat.* 1986; 108: 25-32.

40. Martínez M. Altered unsaturated fatty acid patterns in Zellweger syndrome. *Neurochem Int* 1988; suppl 1: 148.

41. Martínez M. Changes in the polyunsaturated fatty acid profiles in Zellweger syndrome suggesting a new enzymatic defect: Δ -4 desaturase deficiency, en *Dietary Omega-3 and Omega-6 Fatty Acids*, editado por C. Galli y A.P. Simopoulos, Plenum Publishing Corporation, New York 1989; 369-372.

42. Martínez M. Polyunsaturated fatty acid changes suggesting a new enzymatic defect in Zellweger syndrome. *Lipids* 1989; 24: 261-265.

43. Martínez M. Severe deficiency of docosahexaenoic acid in peroxisomal disorders: A defect of D4 desaturation? *Neurology* 1990; 40: 1292-1298.

44. Martínez, M. Developmental Profiles of polyunsaturated fatty acids in the brain of normal infants and patients with peroxisomal diseases: Severe deficiency of docosahexaenoic acid in Zellweger's and pseudo-Zellweger's syndromes, In A.P. Simopoulos (Ed.), World Review of Nutrition and Dietetics, S. Karger, Basilea 1991;. 87-102.

45. Martínez M. Severe changes in polyunsaturated fatty acids in the brain, liver, kidney, and retina in patients with peroxisomal disorders, In N. Bazan (Ed.), Neurobiology of Essential Fatty Acids, Plenum, New York, 1992; 347-359.

46. Martínez M. Abnormal profiles of polyunsaturated fatty acids in the brain, liver, kidney and retina of patients with peroxisomal disorders. Brain Res 1992; 583: 171-182.

47. Martínez M. Polyunsaturated fatty acids in the developing human brain, red cells and plasma: Influence of nutrition and peroxisomal disease. En Galli C, Simopoulos AP, Tremoli E, ed. Fatty Acids and Lipids: Biological aspects, Basel:S. Karger, 1994; 75: 70-78.

48. Martínez M., Mougan, I., Roig, M. and Ballabriga, A., Blood polyunsaturated fatty acids in patients with peroxisomal disorders. A multicenter study, Lipids 1994; 29: 273-280.

49. Martínez M, Mougan I. Fatty acid composition of brain glycerophospholipids in peroxisomal disorders. *Brain Res.* (enviado para publicación).

50. Martínez, M. Docosahexaenoic acid: A new therapeutic approach to peroxisomal patients. *ULF News* 1992; 9: 2-4.

51. Martínez, M. Treatment with docosahexaenoic acid favorably modifies the fatty acid composition of erythrocytes in peroxisomal patients. In PM Coates and K Tanaka (Eds) *New Developments in Fatty Acid Oxidation*, Wiley-Liss, New York, 1992; 389-397

52. Martínez, M., Pineda, M., Vidal, R., and Martin, B., Docosahexaenoic acid - A new therapeutic possibility to peroxisomal-disorder patients: Experience with two cases, *Neurology* 1993; 43: 1389-1397.

53. 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.

54. Martínez M. Docosahexaenoic acid therapy in DHA-deficient patients with disorders of peroxisomal biogenesis. *Lipids* 1996; 31: S145-152.

55. Martínez M, Vázquez L. Treatment with docosahexaenoic acid ethyl ester improves myelination in patients with generalized peroxisomal disorders. *Neurology* 1998; 51: 26-32.

56. Martínez M, Vázquez E, García-Silva MT, Manzanares J., Bertran, J.M., Castelló, F. y Mougán Y. Therapeutical effects of docosahexaenoic acid ethyl ester in patients with generalized peroxisomal disorders. *Am J Clin Nutr* 1998 (en prensa).

57. Martínez M, Vázquez E, García-Silva MT, Bertran JM, Castelló F, Mougán I. Tratamiento de las enfermedades peroxisomales generalizadas con ácido docosahexaenoico. *Rev. Neurol.* 1998 (en prensa).

58. Bourre JM, Pascal G, Durand G et al. Alterations in the fatty acid composition of rat brain cells (neurons, astrocytes, and oligodendrocytes) and of subcellular fractions (myelin and synaptosomes) induced by a diet devoid of n-3 fatty acids. *J Neurochem* 1984, 43: 342-348.

59. Infante JP, Huszagh VA. On the molecular etiology of decreased arachidonic (20:4n-6), docosapentaenoic (22:5n-6) and docosahexaenoic (22:6n-3) acids in Zellweger syndrome and other peroxisomal disorders. *Mol Cell Biochem* 1997; 168: 101-115.

Nomenclatura empleada

En bioquímica, los ácidos grasos insaturados se designan teniendo en cuenta la posición del primer doble enlace, contando a partir del grupo metilo terminal ($-\text{CH}_3$). Es la terminología “omega” (ω), llamada así porque comienza a contar los átomos de carbono de la cadena alifática por el extremo opuesto al usado oficialmente en química orgánica, el cual los numera desde el grupo carboxilo ($-\text{COOH}$), contiguo a la posición α . La razón de preferir la terminología omega en bioquímica es de tipo metabólico, ya que tanto la síntesis como la oxidación de los ácidos grasos tiene lugar por el extremo $-\text{COOH}$. En cambio el terminal metilo y el primer doble enlace permanecen fijos y son los que marcan la serie o familia a la que un ácido graso dado pertenece. Cuando se trata de un poliinsaturado, los otros dobles enlaces se van añadiendo en dirección al grupo carboxilo, siempre separados por un grupo CH_2 .

Tres son las principales familias de ácidos grasos insaturados: la $\omega 3$, la $\omega 6$ y la $\omega 9$, aunque ultimamente se tiende a usar preferentemente la nomenclatura n-3, n-6 y n-9 en su lugar. Aunque mucho menos abundantes, hay otras familias de ácidos grasos, como la $\omega 7$, $\omega 11$, $\omega 5$, etc. En la notación que se emplea para designar los ácidos grasos abreviadamente, la primera cifra indica el número de átomos de carbono,

que va separada por dos puntos del número de dobles enlaces, si los hay, y de la ω (o n-) de la familia a que pertenece. Así, por ejemplo, 18:0 indica un ácido grasos saturado (ningún doble enlace) de 18 átomos de carbono, mientras que 22:6 ω 3 es un ácido graso poliinsaturado de 22 átomos de carbono y 6 dobles enlaces, el primero de los cuales (a contar desde el terminal - CH₃) está en la posición 3 y le siguen otros 5, separados de entre si por grupos CH₂.

Los ácidos grasos tienen nombres populares, que se emplean con frecuencia y conviene recordarlos aquí. Son los siguientes:

- 12:0 ácido laúrico
- 14:0 ácido mirístico
- 16:0 ácido palmítico
- 16:1 ω 7 ácido palmitoleico
- 18:0 ácido esteárico
- 18:1 ω 9 ácido oleico
- 18:1 ω 7 ácido vaccénico
- 18:2 ω 6 ácido linoleico
- 18:3 ω 6 ácido γ -linolénico
- 18:3 ω 3 ácido alfa-linolénico

18:4 ω 3	ácido ácido estearodónico
20:0	ácido aráquico
20:1 ω 9	ácido gadoleico
20:2 ω 6	ácido eicosadienoico
20:3 ω 9	ácido eicosatrienoico
20:3 ω 6	ácido dihomo- γ -linolénico
20:4 ω 6	ácido araquidónico, AA
20:5 ω 3	ácido eicosapentaenoico, EPA
22:0	ácido docosanoico
22:1 ω 9	ácido erúcico
22:4 ω 6	ácido adrénico
22:5 ω 6	ácido eicosapentaenoico
22:5 ω 3	ácido clupanodónico
22:6 ω 3	ácido docosahexaenoico, DHA
24:0	ácido lignocérico
24:1 ω 9	ácido nervónico
26:0	ácido cerótico
26:1 ω 9	ácido hexacosenoico



