

“Protocolo de diagnóstico y tratamiento de los trastornos peroxisomales del espectro Zellweger y de la condrodisplasia punctata rizomélica”

M^a Luisa Girós¹, Javier López Pisón², M^a Luisa Serrano³, Concha Sierra⁴, Laura Toledo⁵, Celia Pérez-Cerdá⁶.

¹Sección Errores Congenitos del metabolismo, IBC, Servicio de Bioquímica y Genética Molecular. CDB. Hospital Clinic. Barcelona. CIBERER U759

² Sección Neuropediatría Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza

³Servicio de Pediatría. Hospital Santa Bárbara. Soria.

⁴ Servicio Neuropediatría del Complejo Hospitalario de Jaén.

⁵ Servicio Neuropediatría Hospital Materno Infantil de Las Palmas de Gran Canarias.

⁶Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. CIBERER U746

1.- INTRODUCCIÓN

Los trastornos peroxisomales son enfermedades genéticas caracterizadas por la alteración de una o más funciones del peroxisoma ¹. Dependiendo de la extensión del defecto peroxisomal se dividen en tres grupos (Tabla I): **Grupo I**, trastornos de la biogénesis peroxisomal, con alteración de múltiples funciones peroxisomales ^{2 3}; **Grupo II**, deficiencia de una única proteína peroxisomal ^{4 5} y **Grupo III**, que incluye el síndrome de genes contiguos (CADD3), causado por una delección de parte del gen *ABCD1*, responsable de la adrenoleucodistrofia ligada al X y del gen *DXS1357E* en el cromosoma Xq28 ⁶. Las enfermedades peroxisomales tienen una incidencia de entre 1/20.000-1/100.000 recién nacido. Pueden manifestarse a cualquier edad pero son especialmente frecuentes en el periodo neonatal y en la primera infancia. A pesar de que presentan una clínica variable, la afectación neurológica es el síntoma guía en la mayoría de los casos. En este protocolo nos referiremos al **Grupo I** que son las enfermedades del espectro Zellweger (ZSS) y la condrodysplasia punctata rizomélica (CDPR) causadas por defectos en los genes *PEX* que codifican las peroxinas, proteínas necesarias para la biogénesis del peroxisoma y el importe de las proteínas de matriz y membrana peroxisomal y al **Grupo II**, concretamente a las deficiencias aisladas en enzimas de la β -oxidación peroxisomal y de la síntesis de plasmalógenos, clínicamente muy similares a las del Grupo I. La sospecha inicial de estas enfermedades se basa en la clínica predominante: a) síndrome polimalformativo en el síndrome de Zellweger clásico (ZW) y en la CDPR; b) síntomas neurológicos en la adrenoleucodistrofia neonatal (ALDN) y c) síntomas hepatodigestivos en la enfermedad de Refsum infantil (RI) ^{7 8 9}.

1.1 Los peroxisomas

Los peroxisomas son organelas celulares presentes en todas las células eucariotas, excepto en el eritrocito maduro. La matriz peroxisomal contiene más de 50 enzimas involucradas en multitud de funciones sintéticas y catabólicas esenciales para la célula. Éstas incluyen: la β -oxidación de los ácidos grasos de cadena muy larga (AGCML), α - y β -oxidación de los ácidos largos ramificados (ácidos fitánico y pristánico), la síntesis de plasmalógenos, ácidos biliares, ácidos poliinsaturados (PUFAS), colesterol, leucotrienos, glioxalato, glutaril-CoA, ácido piperólico y el metabolismo del peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Tabla 1.- Clasificación de las enfermedades peroxisomales

Grupo I.- trastornos de la biogénesis peroxisomal

Espectro Zellweger (ZSS)

- Síndrome cerebrohepatorrenal (ZS)
- Adrenoleucodistrofia neonatal (ALDN)
- Enfermedad de Refsum infantil (RI)

Condrodisplasia punctata rizomélica (CDPR) tipo I

Grupo II.- deficiencia de una única proteína peroxisomal.

Defectos de la β -oxidación de ácidos grasos

- Adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X (X-ALD)
- Deficiencia de acil coA oxidasa (ACOX1)
- Deficiencia de proteína bifuncional (DBP)
- Deficiencia de la proteína carrier esterol (SCP_x)
- Deficiencia de metil acilCoA racemasa (AMACR)

Defectos en la biosíntesis de los eterfosfolípidos (Plasmalógenos)

- Deficiencia de dihidroxiacetona fosfato aciltransferasa (DHAPAT; CDPR tipo II)
- Deficiencia de la alquil-dihidroxiacetona fosfato sintasa (ADHAPS; CDPR tipo III)

Defectos de la α -oxidación de ácidos grasos

- Deficiencia de fitanoilCoA hidroxilasa o Enfermedad de Refsum adulto

Otros

- Deficiencia de glutaril CoA oxidasa o aciduria glutárica tipo 3
- Hiperoxaluria tipo I
- Acatlasemia

Grupo III

Síndrome de la delección de los genes ABCD1/DXS1357E contiguos (CADD5)

El término biogénesis del peroxisoma incluye los mecanismos de acoplamiento de las proteínas de membrana peroxisomales y la importación de las proteínas de matriz hasta el peroxisoma. Las proteínas que intervienen en todos estos procesos se denominan peroxinas (Pex).

La biogénesis del orgánulo resulta de la fisión de orgánulos preexistentes, con posterior proliferación mediante fisiones sucesivas. Sin embargo, parece existir también una síntesis de novo, sufriendo un proceso de maduración diferente al de proliferación¹⁰. Las proteínas peroxisomales se codifican por genes nucleares y se sintetizan en polirribosomas libres. Las proteínas peroxisomales de la matriz poseen una secuencia de aminoácidos, la *peroxisomal targeting sequence* (PTS), en la región carboxi terminal (PTS1) o en la aminoácido terminal (PTS2). La secuencia de aminoácidos es un auténtico código de entrada necesario para acceder al interior del peroxisoma. Las

proteínas de matriz se unen a las proteínas transportadoras Pex5 y Pex7 que las conducen a la membrana peroxisomal, donde son reconocidas, liberadas e internalizadas por un mecanismo dependiente de ATP. Las Pex5 y Pex7 vuelven al citoplasma donde se reutilizan para una nueva acción (Fig. 1) ¹¹.

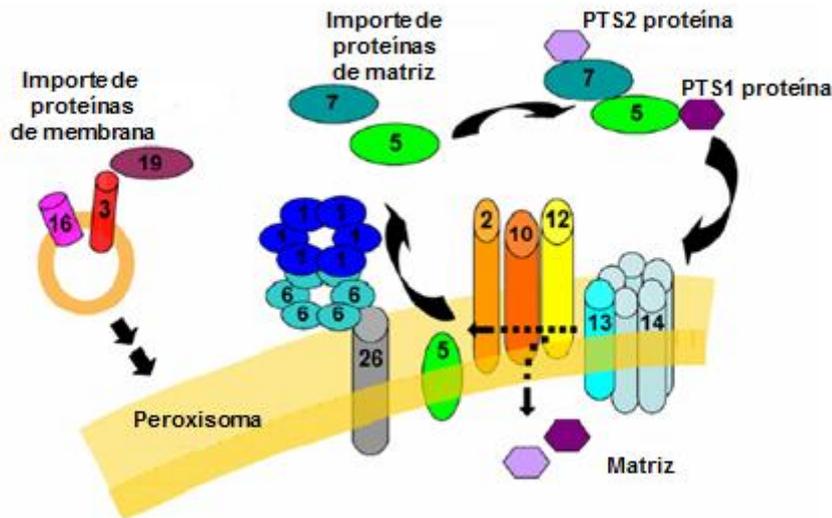


Figura 1- Modelo del importe de proteínas de matriz y de membrana al peroxisoma de mamífero. Según¹¹

1.2 Rutas metabólicas

De todas las vías metabólicas localizadas en el peroxisoma, trataremos de aquellas más relevantes y relacionadas con la patogénesis y el diagnóstico bioquímico de los trastornos de la biogénesis del peroxisoma. (Tabla II).

Tabla II.- Funciones metabólicas del peroxisoma

- 1.- β -oxidación de los ácidos grasos
- 2.- Síntesis de ácidos biliares
- 3.- Biosíntesis de éterfosfolípidos (plasmalógenos)
- 4.- α -oxidación de ácido fitánico
- 5.- Biosíntesis de isoprenoides (Colesterol)
- 6.- Oxidación de ácido L- pipercolico
- 7.- Metabolismo del oxígeno: catalasa
- 8.- Biosíntesis de isoprenoides (Colesterol)
- 9.- Detoxificación del glioxalato :alanina glioxilato-amino transferasa

En la α y β la oxidación los enzimas son exclusivos del peroxisoma, mientras que en el resto de funciones sólo algunas de las enzimas se localizan en dicho orgánulo.

1.2.1. β -Oxidación peroxisomal

El sistema de β -oxidación peroxisomal funciona de la misma manera que el mitocondrial, por la acción secuencial de 4 reacciones enzimáticas en un ciclo que acorta la cadena carbonada de los sustratos lipídicos en dos átomos de carbono. Este ciclo puede repetirse un número de veces en concreto dependiendo del sustrato de la reacción. Los enzimas que intervienen son diferentes de los mitocondriales. Los sustratos lipídicos que utilizan exclusivamente la β -oxidación peroxisomal y que por lo tanto pueden ser marcadores de disfunción de esta vía son: **Los AGCML**, especialmente el ácido hexacosanoico (C26:0), que deriva tanto de la dieta como de la síntesis endógena. **El ácido pristánico**, es un ácido de cadena larga ramificado, procede exclusivamente de la dieta o bien como producto de la α -oxidación del ácido fitánico. **Los precursores de los ácidos biliares, di y trihidrocolestanoicos (DHCA y THCA)**, que son sintetizados a partir del colesterol y a través de un ciclo de β -oxidación se transforman en CoA ésteres de los ácidos quenodeoxicólico y cólico. **El ácido tetracosanoico (C24:6w3)**, ácido poliinsaturado (PUFA), que se transforma en ácido docosahexaenoico (C22:6w3) tras un ciclo de β -oxidación. **Los ácidos dicarboxílicos**, en especial, el ácido hexadecadioico que procede de la ω -oxidación del ácido palmítico y es oxidado exclusivamente en el peroxisoma.

Los AGCML requieren una activación previa a su forma CoA éster para poder ser internalizados en el peroxisoma. En la internalización participan proteínas transportadoras de membrana del tipo *ATP binding cassette* ALDP, alterada en la adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X.

En la β -oxidación peroxisomal participan los siguientes enzimas que actúan de una forma secuencial: la acil-CoA oxidasa, ACOX1 de los AGCML; la ACOX2 de los ácidos ramificados, como el pristánico y los DHCA y THCA; la enzima bifuncional, es un complejo multienzimático que actúa en los dos siguientes pasos, la hidratación y la deshidrogenación. Esta enzima actúa tanto en los productos de oxidación de los AGCML como en los de los ácidos pristánico, DHCA y THCA. Se denomina DBP (los productos resultantes son isómeros D) o MFP2. Existe otra enzima bifuncional que es específica para los ácidos dicarboxílicos; finalmente las tiolasas: PTH1 y PTH2 o SCPX2. Los productos de la β -oxidación de los AGCML utilizan ambas, mientras que los de los ramificados solo PTH2. Finalmente la 2-metil racemasa (AMACR) es exclusiva de los ácidos ramificados que son los que presentan isómeros R (**Figura 2**)⁵.

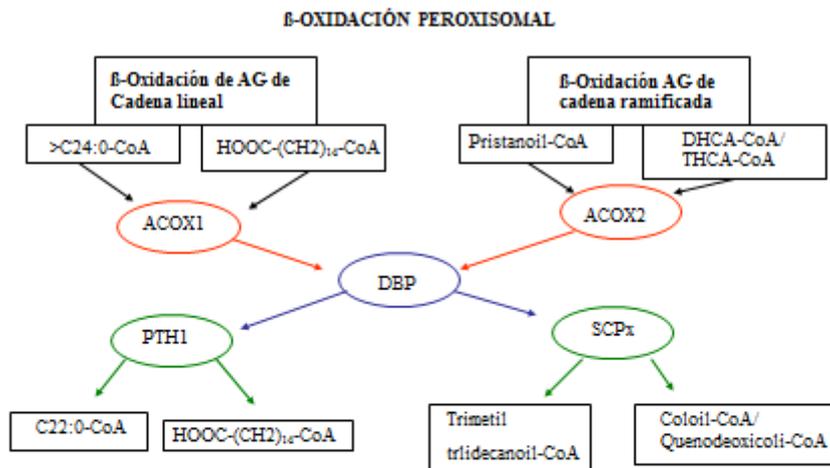


Figura 2.- Esquema de la β-oxidación peroxisomal.

AG: ácidos grasos; DHCA y THCA ácidos di y tri -hidroxicolestanoico ;ACOX1 y ACOX2: acil-CoA oxidasa; DBP : enzima bifuncional ; PTH1 y SCPX2: tiolasas.

1.2.2. α-Oxidación peroxisomal

Los ácidos grasos que presentan un grupo metilo en el tercer átomo de carbono no pueden ser metabolizados en la β-oxidación. El ejemplo mejor conocido es el ácido fitánico, un ácido graso muy particular que no es sintetizado de novo por el humano, pero que es ingerido en la dieta (se acumula en grasa de rumiantes, productos lácteos, carne y pescado). Para ser metabolizado, el ácido fitánico, utiliza la α-oxidación que supone una oxidación descarboxilativa. La maquinaria enzimática para llevarla a cabo

incluye: fitanoil CoA hidroxilasa, 2-hidroxifitanoil-CoA liasa y pristanal deshidrogenasa (no identificada en el humano).

En la **Fig. 3** se resumen los procesos de la β y α oxidación peroxisomal.

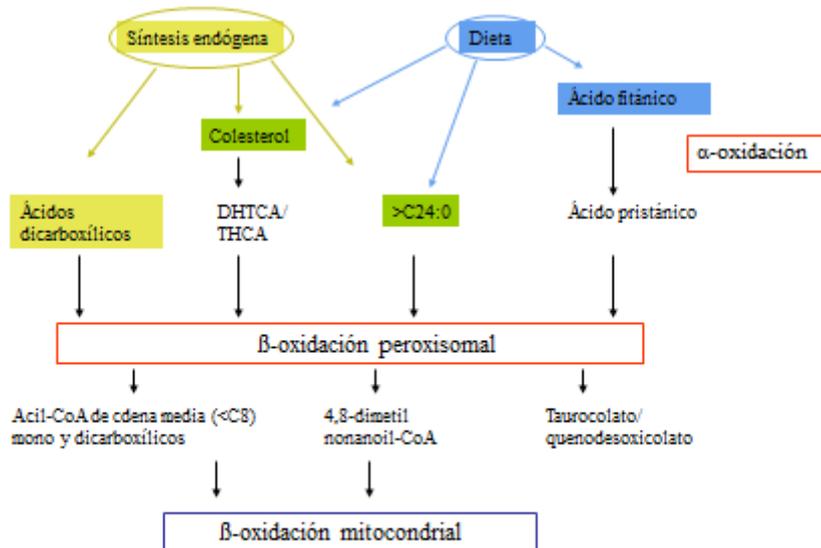
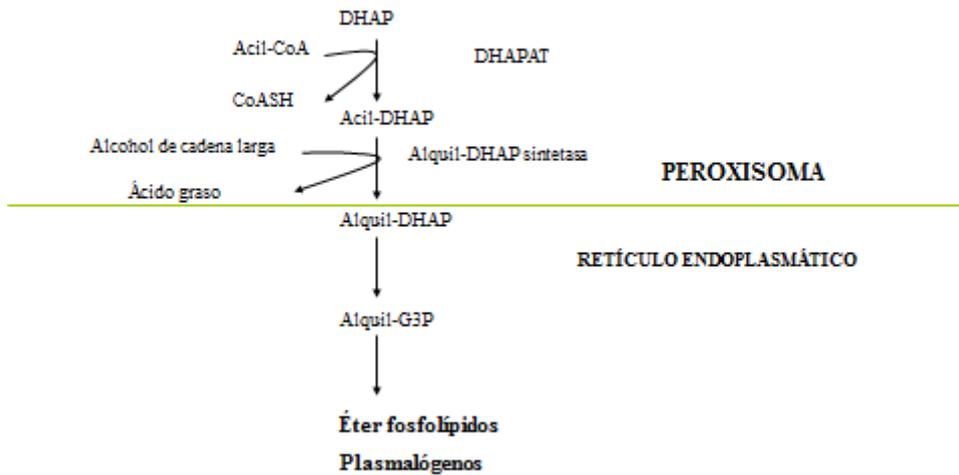


Figura 3.- Resumen de los procesos de α -y β - oxidación peroxisomal y origen de los sustratos implicados

1.2.3. Biosíntesis de eterfosfolípidos

Los eterfosfolípidos son una clase de fosfolípidos que difieren de los diacilfosfolípidos por poseer un alcohol, en vez de un ácido, unido al grupo hidroxilo (OH) del carbono 1 del glicerol fosfato, formando un grupo éter. Cuando este alcohol contiene un doble enlace hablamos, en general, de plasmalógenos. La síntesis de los eterfosfolípidos requiere la acción concertada de enzimas localizadas en el peroxisoma y en el retículo endoplasmático. Los enzimas responsables de los dos primeros pasos de la biosíntesis de los eterfosfolípidos y plasmalógenos se localizan exclusivamente en el peroxisoma y son: la dihidroxiacetona fosfato aciltransferasa (DHAPAT), que cataliza la acilación de la dihidroxiacetona-P para formar un acil- DHAP, utilizando como donadores acil CoA derivados de ácidos grasos de cadena larga (acil-CoAs); y la alquil-dihidroxiacetona fosfato acil sintetasa (alquilDHAPS), que cataliza la sustitución del grupo acilo por un alcohol de cadena larga, dando lugar a un alquil-DHAP (**Fig. 4**).

Biosíntesis de éterfosfolípidos (Plasmalógenos)



DHAPAT: Dihidroxiacetona fosfato aciltransferasa ;DHAP: Dihidroxiacetona fosfato; Alquil G3P: alquil glicerol-3 fosfato

Figura 4.- Esquema de la síntesis de plasmalógenos.

2. FENOTIPOS CLÍNICOS

Las enfermedades peroxisomales de las que nos ocupamos tienen una gran heterogeneidad fenotípica, bioquímica y genética.

Desde el punto de vista clínico el conocimiento de tres fenotipos concretos: Zellweger (ZW), adrenoleucodistrofia neonatal (ALDN) y Refsum infantil (RI) ayuda a reconocer una posible enfermedad peroxisomal y a iniciar la evaluación del diagnóstico bioquímico apropiado. También cabe remarcar que la presentación de los síntomas clínicos guía es diferente en función de la edad de aparición sin que ello sea característico de una enfermedad en concreto. Es excepción la condrodismplasia punctata rizomelica (CDPR) que presenta un fenotipo característico^{12 13}. El fenotipo clínico comprende: a) signos físicos, crecimiento y desarrollo; b) los resultados de imagen en especial del sistema nervioso, esquelético, hígado y riñones y c) los resultados de la histopatología.

2.1. Espectro Zellweger (ZSS)

Los fenotipos ZW, ALDN y RI son los prototipos clínicos más representativos de estas enfermedades, sin embargo los defectos de la biogénesis del peroxisoma comprenden en realidad un continuo de situaciones que van desde la más grave, el ZW hasta la más leve, el RI; al conjunto de este espectro de síntomas que presentan estas enfermedades se les denomina espectro de Zellweger (ZSS) (**Tabla III**).

Tabla III.- Síntomas clínicos mayoritarios y su frecuencia en los trastornos del espectro Zellweger (ZSS) y la Condroadiplasia Punctata Rizomélica (CDPR)

	ZS	ALDN	RI	CDPR
Supervivencia (años)	0.76	2.2	6.4	1.0
Dismorfia facial	++	+	+	++
Cataratas	80%	45%	7%	42%
Retinopatías	71%	82%	100%	0
Sordera	100%	100%	93%	71%
Retraso psicomotor	++++	+++	+++	++++
Hipotonía	99%	82%	52%	+/-
Convulsiones neonatales	80%	82%	20%	+/-
Hepatomegalia	100%	79%	83%	0
Quistes renales	100%	0	0	0
Rizomelia	3%	0	0	93%
Condroadiplasia punctata	69%	0	0	100%
Defecto de migración neuronal	67%	20%	+/-	+/-
Desmielinización	22%	20%	0	0

%: indica el porcentaje de pacientes que presentan el síntoma.

Datos obtenidos de Moser HW¹²

ZS: síndrome de Zellweger; ALDN: Adrenoleucodistrofia neonatal; RI: Refsum infantil; CDPR: Condroadiplasia Punctata Rizomélica

Las alteraciones se presentan ya durante el período gestacional, con manifestaciones presentes desde el nacimiento o primeros meses de vida. La clínica viene determinada por asociación variable de las siguientes alteraciones:

- DISMORFIA CRANEOFACIAL con frente prominente, occipucio plano, inclinación mongoloide de los ojos, epicantus, raíz nasal baja y ancha, paladar ojival, micrognatia, fontanelas y suturas amplias, repliegue de piel en cuello, deformidad pabellón auricular y surco simiesco. El fenotipo junto a la hipotonía pueden recordar un síndrome de Down.
- FALLO DE CRECIMIENTO, trastornos digestivos

- ENCEFALOPATÍA con trastornos de la migración neuronal (displasia cortical y heterotopias neuronales) y disgenesia de cuerpo calloso, leucodistrofia sudanófila y atrofia cerebral. Clínicamente presentan hipotonía que evoluciona a tetraparesia espástica, retraso y deterioro psicomotor y convulsiones, que pueden ser de inicio neonatal. Pobre succión con necesidad de alimentación por sonda nasogástrica. Suele haber hiporreflexia o arreflexia. Nistagmus.
- HIPOACUSIA NEUROSENSORIAL.
- ALTERACIONES OCULARES: cataratas, turbiedad corneal, retinitis pigmentaria, atrofia o hipoplasia óptica, glaucoma y manchas de Brushfield.
- HEPATOPATÍA con variables cirrosis micronodular, fibrosis, colestasis y siderosis hepática. Son frecuentes hepatomegalia e ictericia.
- ANOMALÍAS ESQUELÉTICAS: pies zambos, torsión del pulgar y calcificaciones puntiformes patelares y acetabulares.
- QUISTES RENALES.
- ATROFIA ADRENAL y pobre respuesta al test de estímulo con ACTH.

Puede haber elevación de transaminasas y tendencia a la hipoglucemia, hipocolesterolemia, y aumento de hierro y transferrinas séricas.

2.2. Condrodisplasia Punctata Rizomélica (CDPR).

Presentan un severo retraso ponderoestatural con acortamiento rizomiélico de extremidades, dismorfia facial, espasticidad y retraso mental. Puede asociar ictiosis, hepatomegalia, cataratas y deformidades por contracturas. Son típicas las calcificaciones epifisarias y extraepifisarias. Hay fenotipos leves con displasia esquelética atípica, retardo mental y, en la mayoría de los casos, cataratas (**Tabla III**).

3. DIAGNÓSTICO BIOQUÍMICO

En el espectro ZSS, las disfunciones peroxisomales pueden estar causadas por la alteración en 12 peroxinas diferentes y al déficit aislado de dos enzimas de la β -oxidación peroxisomal, la ACOX1 y la DBP. En la CDPR las disfunciones son debidas a alteraciones en la Pex7, o en las enzimas DHAPAT y alquilDHAPS. El estudio bioquímico permitirá delimitar un poco más los fenotipos clínicos dirigiendo el diagnóstico hacia un defecto múltiple en peroxinas o un déficit aislado.

3.1. Marcadores bioquímicos y algoritmos.

Para el diagnóstico bioquímico se utilizaran aquellos parámetros o marcadores que están alterados como consecuencia de la disfunción peroxisomal correspondiente ^{14 15}.

3.1.1. El incremento de los AGCML es el parámetro patognomónico de este grupo de enfermedades. El análisis de los AGCML se lleva a cabo por diferentes metodologías, en especial la cromatografía de gases capilar. En los pacientes del espectro ZSS los AGCML están incrementados en suero y/o fibroblastos.

En las enfermedades de la biogénesis del peroxisoma, existe un fenómeno, llamado mosaicismo peroxisomal, por el cual puede haber niveles altos de AGCML en plasma y niveles normales en fibroblastos¹⁶. En relación a este fenómeno han sido identificadas determinadas mutaciones en las peroxinas 12, 13 y 16 que conducen a los fenotipos más leves del espectro ZSS y presentan mosaicismo¹⁷. Los fibroblastos de estos pacientes presentan sensibilidad a la temperatura, es decir muestran las alteraciones bioquímicas características de los defectos de la biogénesis del peroxisoma cuando se cultivan a 40°C, pero dichas alteraciones son mínimas a la temperatura habitual de cultivo 37°C¹⁸. Este fenómeno ha sido descrito en otras enfermedades. La CDPR y los defectos aislados de la síntesis de plasmalógenos no muestran alteración en los niveles de AGCML.

3.1.2. La disminución de plasmalógenos está presente en la CDPR y en el espectro ZSS a excepción de las deficiencias aisladas de la β -oxidación, ACOX1 y DBP. Los plasmalógenos se determinan en células, ya sean sanguíneas como los eritrocitos o en fibroblastos cultivados. La disminución es muy importante en la CDPR mientras que en el espectro ZSS es muy variable, pudiendo llegar a ser prácticamente normal en los mosaicismos peroxisomales.

3.1.3. El incremento de los ácidos fitánico y pristánico, es característico del espectro ZSS, de la deficiencia de DBP y de la CDPR debida a mutaciones en la Pex7, siendo normal en las deficiencias aisladas de la síntesis de plasmalógenos (DHAPAT y ADHAPS) y en la deficiencia de ACOX1. Dado que los ácidos ramificados son de origen exógeno, estos metabolitos no está incrementados en los primeros meses de vida, no siendo útiles para el diagnóstico en este periodo.

3.1.4. El incremento de los precursores de los ácidos biliares, DHCA y THCA, en suero u orina requieren la utilización de cromatografía de gases -espectrometría de masas. Son especialmente útiles para establecer el diagnóstico diferencial entre las deficiencias de DBP y de ACOX1, ya que en el caso de neonatos afectados en la DBP, los ácidos ramificados todavía no están incrementados y son normales en los pacientes con déficit de ACOX1.

3.1.5. El incremento del ácido pipecólico puede ser también un marcador muy útil del espectro ZSS, aunque también se ha descrito aumentado en enfermedad hepática y como biomarcador de las convulsiones dependientes de piridoxina por mutaciones en el gen antiqitina.

3.1.6. La excreción aumentada de los ácidos dicarboxílicos y los epoxiácidos en orina es útil para la detección de este grupo de enfermedades frente a otros errores congénitos del metabolismo que puedan presentar un fenotipo clínico similar, sin embargo se ha de tener en cuenta que la excreción de ácidos dicarboxílicos puede ser secundaria a otras alteraciones y la presencia de epoxiácidos, aunque específica, es inconstante ¹⁴. Por otra parte, la hiperoxaluria está presente en el 80% de casos de enfermos del ZSS que sobreviven al año de vida.

3.1.7. La disminución del ácido docosahexaenoico (DHA) está presente en un número importante de pacientes del espectro ZSS. Dado que el DHA es un componente esencial de las membranas del sistema nervioso, su determinación posibilita la modificación dietética en los casos de mayor supervivencia.

En general, se recomienda, una vez llevado a cabo el estudio de los parámetros peroxisomales en sangre y orina, obtener biopsia de piel del paciente para poder llevar a cabo otros estudios bioquímicos, inmunocitoquímicos y moleculares que permitan completar el diagnóstico del caso índice y poder ofrecer un diagnóstico prenatal a las familias.

3.1.8. La disminución del número de peroxisomas en células y en especial en fibroblastos cultivados es una de las características específicas de las enfermedades peroxisomales con defecto en la biogénesis del orgánulo. Para determinar la presencia de peroxisomas se utilizan técnicas de inmunohistoquímica frente a proteínas peroxisomales. Las proteínas pueden ser de membrana, como la ALDP, que mostrará una alteración en el número y tamaño de las partículas, o bien de matriz, como la catalasa, en cuyo caso en ausencia de peroxisomas la localización será citoplasmática y no particulada. En relación a la catalasa, también es posible llevar a cabo el estudio de su solubilidad ¹⁹. Así mismo, la presencia de mosaicos peroxisomales podrá ser detectada mediante este análisis. La determinación inmunohistoquímica de la catalasa es el procedimiento de elección en los estudios de complementación (ver apartado de diagnóstico molecular).

3.1.9. Las determinaciones en fibroblastos cultivados de: a) la β -oxidación del ácido hexacosanoico o cerótico (C26:0), del lignocérico (C24:0) y del pristánico; b) la α -

oxidación del ácido fitánico; y c) la síntesis de plasmalógenos, son complementarias en el diagnóstico de las enfermedades del espectro ZSS y utilizadas para la caracterización bioquímica completa, pero no como primer abordaje diagnóstico, dada su complejidad metodológica. La síntesis de plasmalógenos puede utilizarse como prueba en el diagnóstico prenatal, ya que se valora directamente en vellosidades de corion, en aquellos casos en los que la síntesis de plasmalógenos esté alterada. La determinación de las actividades enzimáticas aisladas ACOX1, DBP, DHAPAT y ADHAPS también es posible en fibroblastos cultivados pero se realizan en contados laboratorios^{3 11}.

3.2 Los algoritmos diagnósticos para las enfermedades del espectro Zellweger (ZSS) y la CDPB, se muestran en las figuras 5 y 6, respectivamente.

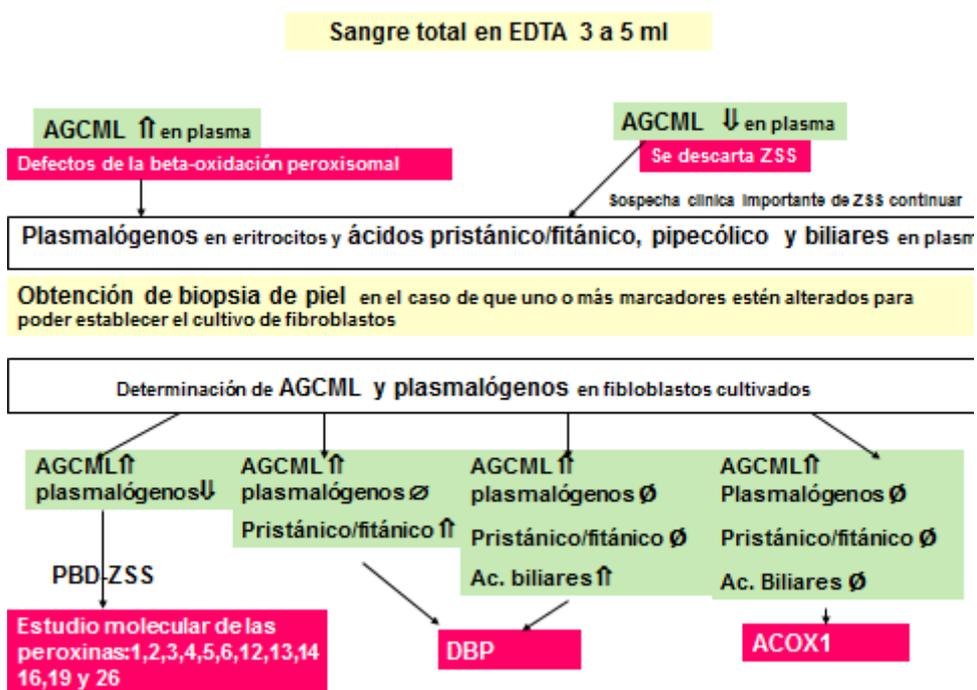


Figura 5.- Algoritmo diagnóstico de los trastornos del espectro Zellweger. ACOX1: acil-CoA oxidasa; DBP: enzima bifuncional; AGCML: ácidos grasos de cadena muy larga

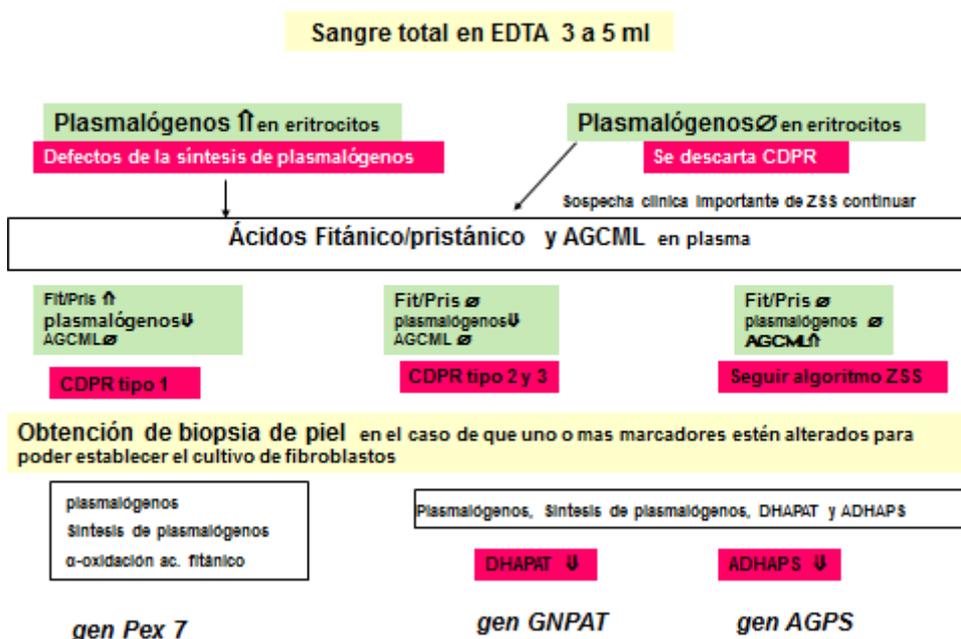


Figura 6- Algoritmo diagnóstico de la Condrosplasia Punctata Rizomélica. DHAPAT: dihidroxiacetona fosfato aciltransferasa; ADHAPS: alquil-dihidroxiacetona fosfato acil sintetasa; AGCML: ácidos grasos de cadena muy larga; ZSS: espectro Zellweger

4. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

El análisis de complementación es una herramienta muy útil para resolver si una enfermedad o grupo de enfermedades son genéticamente heterogéneos o no. En este caso, consiste en la transfección de fibroblastos cuyo defecto genético se desconoce con plásmidos que codifican los diferentes genes PEX para valorar la recuperación del ensamblaje peroxisomal. De entre los 24 genes PEX que codifican las proteínas peroxinas en células de mamífero, se han descrito mutaciones causantes de enfermedad en 13 de ellos asociados a grupos de complementación definidos hasta la fecha, 12 se corresponden con los trastornos del ZSS y uno con la CDPR²⁰. Además, mutaciones en los genes *ACOX1* (*ACOX1*)²¹ y *HSD17B4* (*DBP*)²² de la β -oxidación peroxisomal dan lugar a enfermedades del espectro ZSS y en los genes *GNPAT*²³ y *AGPS*²⁴ causan la CDPR tipo 2 y 3, respectivamente (**Tabla VI**). En el caso de la CDPR, es posible la selección clínica de pacientes para el estudio molecular de los genes *PEX7*, *GNPAT* y *AGPS* ya que todos presentan rasgos dismórficos característicos con acortamiento de extremidades²⁵. Esta selección clínica no es posible en los trastornos del ZSS, y hasta la fecha se han encontrado mutaciones en 12 genes PEX diferentes. Defectos en los 3

genes PEX1, PEX6 y PEX 26, implicados en el reciclamiento de las proteínas de matriz, dan cuenta del 85% de los pacientes con enfermedades del ZSS, en concreto, el 70% de todos ellos tienen mutaciones en el gen PEX1. Por otro lado, los genes PEX2, PEX10 y PX12 son deficientes en al menos otro 10% de los pacientes. Este hecho ha permitido el desarrollo de un algoritmo diagnóstico (PEX Gene Screen) por el grupo del Kennedy Krieger Institute, en el que mediante 14 amplificaciones por paciente de determinados exones de estos 6 genes PEX se identifica al menos una de las mutaciones en el 79% de los 91 casos estudiados ²⁶. También el grupo de Gottingen ha descrito recientemente una estrategia diagnóstica en la que combinando métodos de biología celular y genética molecular se identifican 174 alelos mutantes de 90 pacientes en estudio en los 12 genes PEX ²⁷. El desarrollo de estas aproximaciones diagnósticas utilizando DNA del paciente con sospecha de una enfermedad del ZSS permite un diagnóstico molecular más rápido. La caracterización del defecto genético contribuye al conocimiento de los

Tabla IV.- Genes PEX, grupos de complementación, locus génico, fenotipos clínicos asociados, frecuencias y mutaciones de los trastornos peroxisomales del espectro Zellweger y la condrodisplasia punctata rizomélica.

Gen	GC-Japón ⁴⁸	GC-KKI ²	Locus	Fenotipo clínico	Frecuencia	Mutaciones más frecuentes
PEX1	E	1	7q21-q22	ZS, NALD, IRD	70%	p.1700fs (c.2098insT) p.G843D (c.2528G>A) p.G973AfsX16(c.2916delA)
PEX2	F	10	8q13-21	ZS, IRD	3%	p.R119X(c. 355C>T)
PEX3	G	12	6q23-q24	ZS	<1%	IVS10-8T>G
PEX5		2	12p13.31	ZS, NALD	2%	p.N489K(c.1467T>G) p.R390X(c.1168C>T)
PEX6	C	4	6p21.1	ZS, NALD, IRD	10%	En exon 1
PEX7	R	11	6q22-q24	CDPR1	>100 casos	p.L292X(c.875T>A) p.A218V(c.653C>T) IVS+1G>C p.G217R(c649G>A) c.370-396del27bp
PEX10	B	7	1p36.22	ZS, NALD	3%	c.815-815delT
PEX12		3	17q12	ZS, NALD, IRD	5%	p.S320F (c.959C>T)
PEX13	H	13	2p15	ZS, NALD	<1%	p.I326T p.W324X
PEX 14	K		1p36.2	ZS	<1%	p.Q185X(c.553C>T)
PEX16	D	9	11p12-p11.2	ZS	<1%	p.R176X(c.526C>T)
PEX19	J	14	1q22	ZS	<1%	c.764insA
PEX26	A	8	22q11-21	ZS, NALD, IRD	5%	p.R98W (c.265G>A)
ACOX1			17q25	ZSS	22 casos	p.R148X (c.442C>T) p.T597X(c.1789_1792del)
HSD17B4			5q2	ZSS	>100 casos	p.16S (c.46G>A) p.N457Y(c.1369G>A)
GNPAT			1q42	CDPR 2	Algunos casos	p.R211H (c.632G>A)
AGPS			2q31	CDPR 3	Algunos casos	p.R419H (c.1256G>A)

La incidencia de los trastornos del espectro Zellweger, con deficiencia en alguna de las 12 peroxinas es de ~ 1:100.000 al igual que para la CDPR I. De las deficiencias de ACOX1, HSD17B4, GNPAT y AGPS se desconoce su incidencia.

ZS: síndrome de Zellweger; ALDN: Adrenoleucodistrofia neonatal; RI: Refsum infantil; CDPR: Condrodisplasia Punctata Rizomélica

dominios funcionales de cada peroxina y puede tener también utilidad clínica. Se ha observado que el genotipo se correlaciona bastante bien con la gravedad del fenotipo ya que las mutaciones nonsense que generan proteínas (peroxinas) truncadas o deleciones de fragmentos esenciales en el dominio funcional de la proteína parecen asociarse con manifestaciones clínicas graves, mientras que mutaciones missense están asociadas a fenotipos clínicos más leves²⁸. La clarificación del defecto genético primario en los casos afectos es de gran utilidad sobre todo en aquellos casos que no cumplen los criterios clásicos desde el punto de vista bioquímico o clínico y es crucial para el consejo genético, diagnóstico prenatal y la identificación de portadores, que no es posible mediante el análisis bioquímico.

5. DIAGNÓSTICO PRENATAL y CONSEJO GENÉTICO

5.1 Diagnóstico prenatal

En las enfermedades de la biogénesis del peroxisoma es posible realizar el diagnóstico prenatal mediante análisis bioquímico y/o molecular. Está indicado en todos los casos de riesgo, puesto que son enfermedades neurológicas graves con herencia autosómica recesiva. Es importante confirmar el defecto bioquímico en cultivo de fibroblastos del individuo afecto (caso índice), ya que se han descrito pacientes con mosaicismo peroxisomal, en los que no se han podido detectar las alteraciones en los fibroblastos. El diagnóstico prenatal requiere de material fetal que por lo general es biopsia corial (entre la 10 y 12 semana de gestación). La amniocentesis (entre la 15 y 18 semanas de gestación) se utiliza en aquellos casos en los que se haya sobrepasado las semanas para la obtención de la biopsia de corion o bien no se disponga de material suficiente proveniente de la biopsia de corion. En el diagnóstico prenatal se pueden utilizar diferentes aproximaciones diagnósticas, pero siempre que sea posible se llevaran a cabo más de una. Los marcadores bioquímicos diagnósticos de enfermedad peroxisomal que más se utilizan son los **AGCML** y **plasmalógenos**. Estos metabolitos se analizan en vellosidad corial o en amniocitos cultivados^{29, 30}. Es importante tener en cuenta la posibilidad de error por contaminación con células maternas. Si el porcentaje de contaminación es importante puede dar un resultado falsamente negativo en un feto afecto, si bien, no es posible un falso positivo³¹.

El análisis de los peroxisomas mediante **inmunocitoquímica** es posible también en amniocitos y vellosidades coriales cultivados utilizándose siempre en paralelo con los AGCML y/o plasmalógenos³². Finalmente y en el caso de los mosaicismos

peroxisomales, se deben utilizar aquellos materiales donde los parámetros diagnóstico de enfermedad peroxisomal en el caso índice estén alterados (plasma y/o orina), como la sangre fetal y el sobrenadante del líquido amniótico para la determinación de AGCML y DHCA / THCA respectivamente.

La ventaja del diagnóstico prenatal molecular de las enfermedades del ZSS y CDPR es indiscutible³¹, el problema radica en la dificultad de conocer el gen alterado en cada caso (13 PEX) y la mutación/mutaciones causantes. En cualquier caso, el diagnóstico prenatal molecular requiere el conocimiento previo de las mutaciones en el caso índice. También sería posible el diagnóstico preimplantación. En los estudios de ADN es fundamental descartar la contaminación materna.

En conclusión, aunque el diagnóstico prenatal mediante el estudio molecular es el de elección en el ZSS y CDPR por la rapidez con la que se pueden conocer los resultados (vellosidades de corion directas), en el supuesto de que no se conozcan las mutaciones del gen en el caso índice es posible, en general, el diagnóstico prenatal mediante la determinación de AGCML y plasmalógenos en vellosidades de corion cultivadas.

5.2 Consejo genético

Ambos padres, clínicamente asintomáticos, son heterocigotos obligados y por tanto portadores de la enfermedad. Cada hermano del individuo afecto tiene un 25% de probabilidad de padecer la enfermedad, un 50% de probabilidad de ser portador asintomático y un 25% de estar sano y no ser portador. En cuanto a la descendencia, hay que tener en cuenta, que los pacientes de las formas clínicas graves no tienen posibilidad de reproducirse, pero aquellos con formas clínicas más leves podrían tener hijos, en cuyo caso todos los descendientes serían heterocigotos (portadores). Los hermanos de los padres del caso índice tienen un 50 % de posibilidades de ser portadores. La detección de portadores no es posible con marcadores bioquímicos, ya que éstos son normales. Se pueden realizar estudios de mutaciones de ADN en sangre si se conoce el gen y la/s mutación/es causante/s de la enfermedad en la familia.

6. PATOGÉNESIS

Diversos estudios demuestran que tanto el incremento de los AGCML como la deficiencia de plasmalógenos están en la base fisiopatológica de las enfermedades de la biogénesis del peroxisoma. Se han descrito inclusiones lamelares de ésteres de

colesterol de AGCML en sustancia blanca y en células adrenocorticales estriadas de pacientes con ZS³³. Los plasmalógenos constituyen una proporción muy significativa de los fosfolípidos de membrana de mamífero, siendo un 80-90% de los fosfolípidos de la mielina. Se han descrito niveles muy disminuidos de plasmalógenos en hígado, cerebro, riñón, corazón y músculo de pacientes con ZW³⁴. Existe una relación inversamente proporcional entre niveles de plasmalógenos y afectación clínica en humanos. Estudios en modelos murinos han permitido demostrar que los plasmalógenos son fosfolípidos estructurales que protegen a la célula de los agentes tóxicos en general. Específicamente, en las enfermedades del ZSS, el acúmulo de AGCML es un tóxico que produce diferentes efectos en función del tipo celular donde se acumule. En los espermatozoides, produce degeneración y apoptosis, en el sistema nervioso aparece gliosis, una desmielinización inflamatoria y axonopatía³⁵. La disminución de plasmalógenos acelera todos estos efectos.

Respecto de los precursores de los ácidos biliares, DHCA y THCA, se ha demostrado su mayor citotoxicidad respecto de los ácidos biliares por ser potentes inhibidores de la fosforilación oxidativa e incrementar la producción de ROS por la mitocondria por inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial³⁶. También se ha demostrado que los ácidos fitánico y pristánico disminuyen el potencial de membrana mitocondrial e inhiben la producción de ATP por la cadena respiratoria y producen stress oxidativo. Además niveles altos de ácido fitánico sin esterificar son tóxicos para la célula por sus efectos como protonóforo a nivel de membranas³⁷. En conjunto, el exceso de tóxicos, AGCML, DHCA, THCA y ácidos ramificados en ausencia o disminución de plasmalógenos, lípidos estructurales de membrana protectores de la misma, conducen a un daño celular irreparable. Recientemente se especula el efecto que las proteínas peroxisomales deslocalizadas puedan tener en la fisiopatología de estas enfermedades

38

7.- TRATAMIENTO Y PRONÓSTICO

Tanto las enfermedades del ZSS como la CDPR son enfermedades heterogéneas que afectan a multitud de órganos. En la actualidad no se dispone de tratamiento etiológico, siendo el sintomático la única alternativa. Éste va dirigido a evitar posibles manifestaciones clínicas de los diferentes órganos implicados y mejorar o frenar la progresión de las ya establecidas, para lo que se precisa un tratamiento precoz y multidisciplinario (neurológico, rehabilitador, ortopédico, fisioterapéutico, endocrino,

nutricional, oftalmológico, etc.), en donde cada profesional adecuará la terapéutica necesaria según las manifestaciones clínicas y progresión de cada variante del ZSS y de la CDPR.

La dificultad del tratamiento reside en que el mayor deterioro se produce durante la gestación, no siendo posible, por el momento, el tratamiento prenatal. Sólo podemos intuir el tratamiento genético en el futuro sobre la base de los estudios de complementación realizados y de un mayor conocimiento de los mecanismos funcionales en el peroxisoma. No obstante, las mayores posibilidades terapéuticas sintomáticas las ofrecen la enfermedad RI y la ALDN, dado su fenotipo clínico más benigno, mediante terapéuticas de sustitución, manejo de la dieta (completa, equilibrada y nutritiva, evitando alimentos ricos en ácido fitánico) y resaltando la utilidad que el DHA ha prestado en estos procesos. El manejo multidisciplinario ha conseguido una mejoría considerable en algunos casos. No es así en el síndrome de Zellweger clásico y la CDPR, en donde su afectación y deterioro visible ya se manifiestan al nacimiento³⁹.

El DHA es un ácido graso altamente insaturado, componente fundamental de las membranas celulares de casi todos los tejidos, pero particularmente abundante en el tejido cerebral y la retina donde tiene un papel muy importante en el desarrollo y función del sistema nervioso y visual del feto y el recién nacido^{40 41 42}. En los trastornos del ZSS, el DHA está muy disminuido o es inexistente a nivel de cerebro, retina y plasma, por ello diferentes estudios postulan que su administración en forma de ester-etílico (EE) o de triglicéridos (TG), en las formas menos graves, y administrado de forma precoz en los primeros meses de vida, a dosis de 100-500 mg/día (dosis más empleada 200 mg/día) ajustada a la edad y a la adecuada respuesta bioquímica (aumento de DHA, plasmalógenos y disminución de AGCML), produce mejoría clínica (desarrollo ponderoestatural, psicomotor, visual y función hepática) y de la neuroimagen (aumento de la mielinización)⁴³. Así mismo, se está estudiando la administración de ácidos cólicos con el objetivo de reducir las concentraciones de productos intermedios de los ácidos biliares, con importante capacidad tóxica para el hígado⁴⁴. Estas terapéuticas, por ahora controvertidas, continúan en investigación⁴⁵.

7.1. Tratamiento

7.1.1. Manejo de los trastornos del espectro Zellweger

Evaluación de la extensión

- Nutrición-alimentación.

- Afectación neurosensorial: audición y visión.
- Función neurológica, hepática y suprarrenal.
- Neuroimagen.

Tratamiento de las manifestaciones:

- Para mantener una buena nutrición es necesario una alimentación completa y equilibrada sin dieta restrictiva pero con bajo contenido en grasa. Evitar alimentos ricos en ácido fitánico: verduras de hoja verde, leche de vaca y grasas animales.
- Tratamiento con DHA: Administrar en forma de EE o TG, de forma precoz. Dosis habitual: 200mg/día.
- Preservación de la audición actuando sobre todas sus posibilidades; y de la visión mediante intervención de cataratas, si las hubiera, y lentes correctoras.
- Suplementos de Vitamina K y liposolubles.
- Tratamiento de las complicaciones hepáticas y terapia esclerosante de varices esofágicas.
- Tratamiento con FAEs en las crisis epilépticas. No hay contraindicación de ningún FAE.
- Monitorización de la hiperoxaluria para evitar cálculos y fallo renal.
- Aplicación de medidas ortopédicas y fisioterapéuticas.

Vigilancia y controles periódicos:

- Controles anuales auditivos y oftalmológicos.
- Control cada 3 meses durante el primer año y posteriormente cada 6 meses de:
- Estudio de los factores de coagulación.
- Función hepática y suprarrenal.
- Controles bioquímicos: AGCML, plasmalógenos, ácido fitánico y DHA.

7.1.2. Manejo de la condrodisplasia punctata rizomélica:

Evaluación de la extensión:

- Parámetros de crecimiento ponderoestatural.
- Desarrollo psicomotor
- Exámenes oftalmológicos y auditivos
- Neuroimagen

Tratamiento de las manifestaciones:

- El manejo es de soporte y limitado a causa de las múltiples anomalías presentes al nacimiento
- y su pobre evolución.

- Preservación de la audición actuando sobre todas sus posibilidades; y de la visión mediante intervención de cataratas, si las hubiera, y lentes correctoras.
- Aplicación de medidas de fisioterapia y ortopédica para mejorar la funcionalidad.
- Restricción de ácido titánico, que en las formas leves-moderadas es muy beneficioso.
- Mantener las necesidades nutricionales adecuadas, mediante dieta completa y equilibrada.
- Fisioterapia y toilette respiratoria.
- Vacuna frente VRS e influenza, para prevenir las infecciones respiratorias de repetición que suelen presentar.

Vigilancia y controles periódicos:

- Controles anuales auditivos y oftalmológicos.
- Realizar cada 6 meses:
 - ✓ Control de curva de crecimiento ponderoestatural.
 - ✓ Control neurosensorial, de desarrollo psicomotor y crisis epilépticas.
 - ✓ Medidas ortopédicas y fisioterapéuticas.
 - ✓ Prevención de infecciones respiratorias.
 - ✓ Controles bioquímicos: plasmalógenos , ácido fitánico y DHA

7.2 Pronóstico

En el pronóstico de las enfermedades del ZSS, la precocidad de su expresión clínica va ligada de forma inversamente proporcional a la supervivencia, siendo el RI la enfermedad que presenta mayor supervivencia, llegando incluso a superar la segunda década de la vida⁴⁶ En nuestro medio, la máxima supervivencia corresponde a un paciente con 18 años. El síndrome de Zellweger, en contraposición, tiene la expresión clínica más grave, con una supervivencia que no supera el año de vida. La ALDN presenta una supervivencia intermedia, con una media de 2- 3 años, que junto con el RI se ve favorecida con el manejo terapéutico y la dieta adecuada. El pronóstico de la CDPR, es más próximo al síndrome de Zellweger, en donde en la mayoría de los casos la expresión clínica está presente en el nacimiento y no sobreviven mas allá de los dos años de vida, aunque se han descrito formas menos severas con supervivencia superior incluso a los 10 años⁴⁷.

Bibliografía

1. Poll-The BT, Aubourg P, Wanders RJA. Peroxisomal disorders. In Fernandes J, Saudubray JM, van den Berghe G, Walter JH eds. *Inborn Metabolic Diseases* 4th edition. Springer Medezin Verlag Heidelberg, 2006:509-521
2. Gould SJ, Raymon GV, Valle D. The peroxisome biogenesis disorders. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D eds. *The Metabolic and Molecular bases of Inherited Disease* 8th edition. McGraw Hill, 2001:3181-3218
3. Wanders RJ, Waterham HR. Peroxisomal disorders I: biochemistry and genetics of peroxisome biogenesis disorders. *Clin Genet.* 2005;67:107-133
4. Wanders RJA, Barth PG, Heymans, HAS. Single peroxisomal enzyme deficiencies. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D eds. *The Metabolic and Molecular bases of Inherited Disease* 8th edition. McGraw Hill, 2001:3219-3256
5. Wanders RJ, Waterham HR. Peroxisomal disorders: the single peroxisomal enzyme deficiencies. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1763:1707-1720
6. Corzo D, Gibson W, Johnson K et al. Contiguous deletion of the X-linked adrenoleukodystrophy gene (ABCD1) and DXS1357E: a novel neonatal phenotype similar to peroxisomal biogenesis disorders. *Am J Hum Genet.* 2002;70:1520-1531
7. Caceres-Marzal C, Vaquerizo-Madrid J, Giros M et al. [Zellweger syndrome. Reports on two new cases]. *Rev Neurol.* 2003;36:1030-1034
8. Lopez-Pison J, Perez-Delgado R, Garcia-Oguiza A et al. [Our experience in the diagnosis of peroxisomal diseases with an abnormal fatty acid profile]. *Rev Neurol.* 2008;47:1-5
9. Lopez-Terradas JM. [Introduction to the study of peroxisomal disorders]. *Rev Neurol.* 1999;28 Suppl 1:S34-37
10. Wanders RJ. Peroxisomes, lipid metabolism, and peroxisomal disorders. *Mol Genet Metab.* 2004;83:16-27
11. Steinberg SJ, Dodt G, Raymond GV et al. Peroxisome biogenesis disorders. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1763:1733-1748
12. Moser HW. Genotype-phenotype correlations in disorders of peroxisome biogenesis. *Mol Genet Metab.* 1999;68:316-327
13. Wanders RJ. Peroxisomal disorders: clinical, biochemical, and molecular aspects. *Neurochemical research.* 1999;24:565-580
14. Giros M, Ruiz M, Ribes A, Pampols T. [The diagnosis of peroxisomal disorders in Spain during the period 1987-1997]. *Rev Neurol.* 1999;28 Suppl 1:S40-44
15. Giros ML, Pampols T. Enfermedades por alteración de los peroxisomas. *Medicina Interna Farreras-Rozman* 2008 ; 228: 1918 -1922
16. Pineda M, Giros M, Roels F et al. Diagnosis and follow-up of a case of peroxisomal disorder with peroxisomal mosaicism. *J Child Neurol.* 1999;14:434-439
17. Gootjes J, Schmohl F, Mooijer PA et al. Identification of the molecular defect in patients with peroxisomal mosaicism using a novel method involving culturing of cells at 40 degrees C: implications for other inborn errors of metabolism. *Hum Mutat.* 2004;24:130-139

18. Hashimoto K, Kato Z, Nagase T et al. Molecular mechanism of a temperature-sensitive phenotype in peroxisomal biogenesis disorder. *Pediatr Res.* 2005;58:263-269
19. Wanders RJ, Kos M, Roest B et al. Activity of peroxisomal enzymes and intracellular distribution of catalase in Zellweger syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984;123:1054-1061
20. Shimozawa N. Molecular and clinical aspects of peroxisomal diseases. *J Inherit Metab Dis.* 2007;30:193-197
21. Ferdinandusse S, Denis S, Hogenhout EM et al. Clinical, biochemical, and mutational spectrum of peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase deficiency. *Hum Mutat.* 2007;28:904-912
22. Ferdinandusse S, Denis S, Mooyer PA et al. Clinical and biochemical spectrum of D-bifunctional protein deficiency. *Ann Neurol.* 2006;59:92-104
23. Ofman R, Hetteema EH, Hogenhout EM et al. Acyl-CoA:dihydroxyacetonephosphate acyltransferase: cloning of the human cDNA and resolution of the molecular basis in rhizomelic chondrodysplasia punctata type 2. *Hum Mol Genet.* 1998;7:847-853
24. de Vet EC, Ijlst L, Oostheim W et al. Alkyl-dihydroxyacetonephosphate synthase. Fate in peroxisome biogenesis disorders and identification of the point mutation underlying a single enzyme deficiency. *J Biol Chem.* 1998;273:10296-10301
25. Purdue PE, Zhang JW, Skoneczny M, Lazarow PB. Rhizomelic chondrodysplasia punctata is caused by deficiency of human PEX7, a homologue of the yeast PTS2 receptor. *Nat Genet.* 1997;15:381-384
26. Steinberg S, Chen L, Wei L et al. The PEX Gene Screen: molecular diagnosis of peroxisome biogenesis disorders in the Zellweger syndrome spectrum. *Mol Genet Metab.* 2004;83:252-263
27. Krause C, Rosewich H, Gartner J. Rational diagnostic strategy for Zellweger syndrome spectrum patients. *Eur J Hum Genet.* 2009;17:741-748
28. Krause C, Rosewich H, Thanos M, Gartner J. Identification of novel mutations in PEX2, PEX6, PEX10, PEX12, and PEX13 in Zellweger spectrum patients. *Hum Mutat.* 2006;27:1157
29. Wanders RJ, van Wijland MJ, van Roermund CW et al. Prenatal diagnosis of Zellweger syndrome by measurement of very long chain fatty acid (C26:0) beta-oxidation in cultured chorionic villous fibroblasts: implications for early diagnosis of other peroxisomal disorders. *Clin Chim Acta.* 1987;165:303-310
30. Rocchiccioli F, Aubourg P, Choiset A. Immediate prenatal diagnosis of Zellweger syndrome by direct measurement of very long chain fatty acids in chorionic villus cells. *Prenat Diagn.* 1987;7:349-354
31. Steinberg S, Katsanis S, Moser A, Cutting G. Biochemical analysis of cultured chorionic villi for the prenatal diagnosis of peroxisomal disorders: biochemical thresholds and molecular sensitivity for maternal cell contamination detection. *J Med Genet.* 2005;42:38-44
32. Suzuki Y, Shimozawa N, Kawabata I et al. Prenatal diagnosis of peroxisomal disorders. Biochemical and immunocytochemical studies on peroxisomes in human amniocytes. *Brain Dev.* 1994;16:27-31
33. Powers JM, Tummons RC, Caviness VS, Jr. et al. Structural and chemical alterations in the cerebral maldevelopment of fetal cerebro-hepato-renal (Zellweger) syndrome. *Journal of neuropathology and experimental neurology.* 1989;48:270-289

34. Heymans HS, Schutgens RB, Tan R et al. Severe plasmalogen deficiency in tissues of infants without peroxisomes (Zellweger syndrome). *Nature*. 1983;306:69-70
35. Brites P, Mooyer PA, El Mrabet L et al. Plasmalogens participate in very-long-chain fatty acid-induced pathology. *Brain*. 2009;132:482-492
36. Ferdinandusse S, Denis S, Dacremont G, Wanders RJ. Toxicity of peroxisomal C27-bile acid intermediates. *Mol Genet Metab*. 2009;96:121-128
37. Komen JC, Distelmaier F, Koopman WJ et al. Phytanic acid impairs mitochondrial respiration through protonophoric action. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64:3271-3281
38. Thoms S, Gronborg S, Gartner J. Organelle interplay in peroxisomal disorders. *Trends in molecular medicine*. 2009;15:293-302
39. Martinez M, Vazquez E, Garcia-Silva MT et al. [Treatment of generalized peroxisomal disorders with docosahexaenoic acid ethyl ether]. *Rev Neurol*. 1999;28 Suppl 1:S59-64
40. Martinez M. Severe deficiency of docosahexaenoic acid in peroxisomal disorders: a defect of delta 4 desaturation? *Neurology*. 1990;40:1292-1298
41. Farquharson J, Cockburn F, Patrick WA et al. Infant cerebral cortex phospholipid fatty-acid composition and diet. *Lancet*. 1992;340:810-813
42. Innis SM, Nelson CM, Rioux MF, King DJ. Development of visual acuity in relation to plasma and erythrocyte omega-6 and omega-3 fatty acids in healthy term gestation infants. *The American journal of clinical nutrition*. 1994;60:347-352
43. Martinez M. Restoring the DHA levels in the brains of Zellweger patients. *J Mol Neurosci*. 2001;16:309-316; discussion 317-321
44. Setchell KD, Bragetti P, Zimmer-Nechemias L et al. Oral bile acid treatment and the patient with Zellweger syndrome. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 1992;15:198-207
45. Keane MH, Overmars H, Wikander TM et al. Bile acid treatment alters hepatic disease and bile acid transport in peroxisome-deficient PEX2 Zellweger mice. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2007;45:982-997
46. Poll-The BT, Gootjes J, Duran M et al. Peroxisome biogenesis disorders with prolonged survival: phenotypic expression in a cohort of 31 patients. *Am J Med Genet A*. 2004;126A:333-338
47. White AL, Modaff P, Holland-Morris F, Pauli RM. Natural history of rhizomelic chondrodysplasia punctata. *Am J Med Genet A*. 2003;118A:332-342
48. Shimozawa N, Suzuki Y, Zhang Z et al. Genetic basis of peroxisome-assembly mutants of humans, Chinese hamster ovary cells, and yeast: identification of a new complementation group of peroxisome-biogenesis disorders apparently lacking peroxisomal-membrane ghosts. *Am J Hum Genet*. 1998;63:1898-1903