

**ADRENOLEUCODISTRÒFIA L·LIGADA A L'X:  
PAPER DE LES PROTEÏNES ALDP I ALDRP EN EL METABOLISME DELS  
ÀCIDS GRASSOS EN MODELS MURINS «KNOCKOUT» I TRANSGÈNICS.  
IMPLICACIONS TERAPÈUTIQUES.**

**M<sup>a</sup> CARME CAMPS FEBRER**

**2005**

**ADRENOLEUCODISTRÒFIA LLIGADA A L'X:  
PAPER DE LES PROTEÏNES ALDP I ALDRP EN EL METABOLISME DELS  
ÀCIDS GRASSOS EN MODELS MURINS «KNOCKOUT» I TRANSGÈNICS.  
IMPLICACIONS TERAPÈUTIQUES.**

Memòria presentada per

**M<sup>a</sup> CARME CAMPS FEBRER**

per a optar al grau de

**Doctora en Biologia**

Tesi realitzada sota la co-direcció de la Dra. Aurora Pujol i de la Dra. Marisa Girós a l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (Strasbourg) i a l'Institut de Bioquímica Clínica (Barcelona).

Programa: Bioquímica Clínica i Patologia Molecular (opció B)

Tutor: Dr. Francesc González Sastre  
Universitat Autònoma de Barcelona

Dra. Aurora Pujol

Dra. Marisa Girós

M<sup>a</sup> Carme Camps

Barcelona, setembre de 2005

“A la realitat no ocorre *res* que correspongui  
rigurosament a la lògica”

Friedrich Nietzsche

# ÍNDIX DE MATÈRIES

<b>ABREVIATURES.....</b>	<b>1</b>
--------------------------	----------

## ***I. INTRODUCCIÓ***

<b>1. METABOLISME DELS ÀCIDS GRASSOS.....</b>	<b>3</b>
-----------------------------------------------	----------

<b>1.1. La síntesi d'àcids grassos.....</b>	<b>4</b>
---------------------------------------------	----------

<b>1.2. La degradació d'àcids grassos.....</b>	<b>7</b>
------------------------------------------------	----------

1.2.1. La $\beta$ -oxidació peroxisomal.....	10
----------------------------------------------	----

1.2.1.1. Mecanisme general de la $\beta$ -oxidació peroxisomal.....	10
---------------------------------------------------------------------	----

1.2.1.1.1. Activació i entrada dels substractes al peroxisoma.....	10
--------------------------------------------------------------------	----

1.2.1.1.2. Enzims implicats en la $\beta$ -oxidació.....	12
----------------------------------------------------------	----

1.2.1.1.3. Sortida dels productes finals de la $\beta$ -oxidació.....	13
-----------------------------------------------------------------------	----

1.2.1.2. La $\beta$ -oxidació dels àcids grassos insaturats.....	14
------------------------------------------------------------------	----

1.2.1.2.1. Mecanismes d'eliminació dels dobles enllaços.....	14
--------------------------------------------------------------	----

1.2.1.2.2. Implicacions d'aquests mecanismes en el metabolisme dels àcids grassos poliinsaturats.....	17
----------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

1.2.1.3. La vessant anabòlica de la $\beta$ -oxidació peroxisomal.....	17
------------------------------------------------------------------------	----

<b>2. ADRENOLEUCODISTRÒFIA LIGADA AL CROMOSOMA X.....</b>	<b>20</b>
-----------------------------------------------------------	-----------

<b>2.1. Aspectes clínics.....</b>	<b>20</b>
-----------------------------------	-----------

2.1.1. Fenotips clínics.....	20
------------------------------	----

2.1.1.1. Forma cerebral infantil.....	20
---------------------------------------	----

2.1.1.2. Forma cerebral adolescent.....	21
-----------------------------------------	----

2.1.1.3. Forma cerebral adulta.....	21
-------------------------------------	----

2.1.1.4. Adrenomieloneuropatia.....	21
-------------------------------------	----

2.1.1.5. Addison.....	23
-----------------------	----

2.1.1.6. Assimptomàtics/ pressimptomàtics.....	23
------------------------------------------------	----

2.1.1.7. Dones heterozigotes.....	23
-----------------------------------	----

2.1.2. Epidemiologia.....	24
---------------------------	----

2.1.3. Diagnòstic.....	24
------------------------	----

2.1.4. Patogènesi.....	25
------------------------	----

2.1.4.1. Patogènesi de la forma cerebral de la malaltia.....	26
--------------------------------------------------------------	----

2.1.4.1.1. La resposta inflamatòria.....	26
------------------------------------------	----

2.1.4.2. Patogènesi de l'Adrenomieloneuropatia.....	29
-----------------------------------------------------	----

2.1.4.3. Patogènesi de la glàndula adrenal.....	30
-------------------------------------------------	----

<b>2.2. Aspectes moleculars.....</b>	<b>32</b>
--------------------------------------	-----------

2.2.1. Genètica.....	32
2.2.1.1. La proteïna ALDP.....	35
2.2.1.1.1. Els transportadors de tipus “ATP-binding cassette” .....	36
2.2.1.1.1.1. La subfamília de transportadors ABCD.....	39
<b>2.3. Aspectes terapèutics.....</b>	<b>41</b>
2.3.1. L’oli de Lorenzo.....	41
2.3.2. Transplantament de moll d’òs.....	41
2.3.3. Teràpia gènica.....	42
2.3.4. Farmacoteràpia.....	43
2.3.4.1. Farmacogenètica.....	44
<b>2.4. Model murí de la X-ALD.....</b>	<b>46</b>

## **II.OBJECTIUS.....49**

### **III. PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS**

<b>1. MATERIAL.....</b>	<b>51</b>
<b>1.1. Animals.....</b>	<b>51</b>
1.1.1. Genotipatge dels ratolins.....	51
1.1.1.1. Extracció d’ADN a partir de les cues de ratolí.....	51
1.1.1.1.1. Material i reactius.....	51
1.1.1.1.2. Procediment.....	51
1.1.1.2. Condicions de PCR.....	52
1.1.1.2.1. Determinació del genotip Ald ko.....	52
1.1.1.2.2. Determinació del genotip Aldr ko.....	52
1.1.1.2.3. Determinació del genotip transgènic (tg, sobreexpressió d’ <i>aldr</i> ).....	53
<b>1.2. Mostres.....</b>	<b>53</b>
1.2.1. Òrgans.....	53
1.2.2. Sèrum.....	53
1.2.3. Fibroblastes embrionaris de ratolí (MEF).....	54
1.2.3.1. Obtenció dels cultius de MEF.....	54
1.2.3.1.1. Material i reactius.....	54
1.2.3.1.2. Procediment.....	54
1.2.3.2. Tractament dels cultius amb àcid hexacosanoic (C26:0).....	55
1.2.3.2.1. Material i reactius.....	55
1.2.3.2.2. Procediment.....	55
<b>2. MÈTODES.....</b>	<b>56</b>
<b>2.1. Cromatografia de gasos per a la determinació d’àcids grassos.....</b>	<b>56</b>

2.1.1. Obtenció d'extractes lipídics.....	56
2.1.1.1. Protocol 1.....	56
2.1.1.1.1. Material i reactius.....	56
2.1.1.1.2. Solucions.....	56
2.1.1.1.3. Procediment.....	57
2.1.1.2. Protocol 2.....	57
2.1.1.2.1. Material i reactius.....	57
2.1.1.2.2. Solucions.....	57
2.1.1.2.3. Procediment.....	57
2.1.2. Trans-esterificació de lípids.....	58
2.1.2.1. Material i reactius .....	58
2.1.2.2. Solucions.....	58
2.1.2.3. Procediment.....	59
2.1.3. Detecció dels esters de metil a través de cromatografia de gasos.....	59
2.1.4. Anàlisi estadística.....	60
<b>2.2. RT-PCR quantitativa.....</b>	<b>61</b>
2.2.1. Obtenció de l'ARN.....	62
2.2.1.1. Protocol 1.....	62
2.2.1.1.1. Material i reactius.....	62
2.2.1.1.2. Solucions.....	62
2.2.1.1.3. Procediment.....	62
2.2.1.2. Protocol 2.....	63
2.2.1.2.1. Material i reactius.....	63
2.2.1.2.2. Procediment.....	63
2.2.2. Transcripció reversa de l'ARN.....	63
2.2.3. Condicions de PCR.....	64
2.2.3.1. Disseny de l'experiment.....	64
2.2.3.2. Encebadors.....	64
2.2.3.3. Reacció de PCR.....	66
2.2.3.4. Programa de PCR.....	66
2.2.4. Quantificació.....	67
<b>2.3. Micromatrius de cADN (cDNA arrays).....</b>	<b>68</b>
2.3.1. Construcció de la micromatriu.....	68
2.3.2. Preparació i marcatge fluorescent de les mostres de cADN.....	70
2.3.3. Quantificació i normalització de les dades.....	71
2.3.4. Tractament estadístic de les dades obtingudes a través de la micromatriu de cADN.....	73

## **IV. RESULTATS I DISCUSSIÓ**

<b>1. EFECTE DE LA SOBREEXPRESSIÓ D'ALDR EN ELS NIVELLS DE VLCFAs EN TEIXITS DEL RATOLÍ ALD KO.....</b>	<b>75</b>
1.1. Nivells de C26:0 en els ratolins Ald ko i Ald/tg.....	75
1.2. Nivells de C24:0 en els ratolins Ald ko i Ald/tg.....	78
<b>2. ESTUDI DEL PAPER D'ALDP I D'ALDR EN EL METABOLISME DELS ÀCIDS GRASSOS.....</b>	<b>81</b>
2.1. Nivell d'expressió dels transportadors ABCD en teixits murins.....	81
2.2. Determinació de substractes específics d'ALDP i d'ALDRP a través de la composició d'àcids grassos en teixits dels diferents ratolins mutants.....	85
2.2.1. Composició tissular d'àcids grassos en el ratolí Wt: saturats, $\omega$ 9-MUFAs, $\omega$ 6- i $\omega$ 3-PUFAs.....	85
2.2.2. Composició tissular d'àcids grassos en els ratolins mutants.....	87
2.2.2.1. Sèrie dels àcids grassos saturats.....	88
2.2.2.1.1. L'àcid hexacosanoic.....	88
2.2.2.1.2. Els àcids grassos saturats de 18 a 24 carbonis.....	88
2.2.2.1.3. Implicacions d'ALDP i d'ALDRP en el metabolisme dels àcids grassos saturats.....	93
2.2.2.2. Sèrie dels $\omega$ 9-MUFAs: substractes potencials d'ALDRP.....	99
2.2.2.3. Sèrie dels $\omega$ 6-PUFAs.....	103
2.2.2.4. Sèrie dels $\omega$ 3-PUFAs.....	107
2.2.2.5. Correlació dels nivells d'àcids grassos amb els altres trets fenotípics dels ratolins mutants.....	110
2.3. Estudi de l'expressió dels gens implicats en el metabolisme lipídic: possible afectació en els ratolins mutants.....	112
2.3.1. Nivells d'expressió dels gens codificadors dels enzims de la via sintètica dels àcids grassos.....	112
2.3.1.1. Expressió en els ratolins mutants.....	117
2.3.2. Expressió de gens codificadors d'enzims implicats en processos del metabolisme lipídic que tenen lloc al peroxisoma: $\beta$ -oxidació i hipotètic sistema d'elongació.....	119
2.3.3. Els àcids grassos insaturats com a lligands de receptors nuclears.....	120

<b>3. MONITORITZACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA A GRAN ESCALA EN FIBROBLASTES EMBRIONARIS DE RATOLÍ.....</b>	<b>129</b>
<b>3.1. Efectes detectats en l'expressió gènica.....</b>	<b>130</b>
3.1.1. Efectes en l'expressió gènica basades en diferències a nivell de genotip (Ald ko vs Wt).....	130
3.1.2. Efectes en l'expressió gènica basades en el tractament amb àcid hexacosanoic. ....	136
<b>V. CONCLUSIONS I PERSPECTIVES.....</b>	<b>141</b>
<b>VI. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES.....</b>	<b>145</b>
<b>AGRAÏMENTS.....</b>	<b>159</b>

## ÍNDIX DE FIGURES

### I. INTRODUCCIÓ

Figura 1.1.....	5
Figura 1.2.....	8
Figura 1.3.....	11
Figura 1.4.....	15
Figura 1.5.....	19
Figura 1.6.....	22
Figura 1.7.....	22
Figura 1.8.....	37

### III) PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS

Figura 3.1.....	69
Figura 3.2.....	72
Figura 3.3.....	72

### IV) RESULTATS I DISCUSSIÓ

Figura 4.1.....	76
Figura 4.2.....	83
Figura 4.3.....	89
Figura 4.4.....	91
Figura 4.5.....	92
Figura 4.6.....	94



Figura 4.7.....	100
Figura 4.8.....	102
Figura 4.9.....	105
Figura 4.10.....	109
Figura 4.11.....	114
Figura 4.12.....	115

## ÍNDIX DE TAULES

### I. INTRODUCCIÓ

Taula 1.1.....	24
Taula 1.2.....	34
Taula 1.3.....	34
Taula 1.4.....	37

### III) PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS

Taula 3.1.....	70
----------------	----

### IV) RESULTATS I DISCUSSIÓ

Taula 4.1.....	83
Taula 4.2.....	106
Taula 4.3.....	116
Taula 4.4.....	132
Taula 4.5.....	137

#### **Taules amb les dades numèriques obtingudes de la quantificació d'àcids grassos en els diferents teixits murins.**

Taula A.1 (corresponent al Wt).....	123
Taula A.2 (corresponent a l'Ald ko).....	124
Taula A.3 (corresponent a l'Aldr ko).....	125
Taula A.4 (corresponent a l'Ald/aldr ko).....	126
Taula A.5 (corresponent al Wt/tg).....	127
Taula A.6 (corresponent a l'Ald/tg).....	128

## ABREVIATURES (per ordre alfabètic)

ABC	ATP-binding cassette
ACOX	Acil-CoA oxidasa
ACS	Acil-CoA sintetasa
ACTH	Adrenocorticotropina
ADN	Àcid desoxiribonucleic
Ald ko	Ratolí "knockout" per <i>ald (abcd1)</i>
Aldr ko	Ratolí "knockout" per <i>aldr (abcd2)</i>
Ald/aldr ko	Ratolí "knockout" per <i>ald (abcd1)</i> i <i>aldr (abcd2)</i>
Ald/tg	Ratolí "knockout" per <i>ald (abcd1)</i> i transgènic per <i>aldr (abcd2)</i>
ALDP	Proteïna deficient en l'adrenoleucodistrofia lligada a l'X (ABCD1)
ALDRP	Proteïna relacionada amb ALDP (ABCD2)
AMN	Adrenomieloneuropatia
ARN	Àcid ribonucleic
ATP	Adenosina trifosfat
C16:0	Àcid palmític
C18:0	Àcid esteàric
C18:1 $\omega$ 9	Àcid oleic
C18:2 $\omega$ 6	Àcid linoleic
C18:3 $\omega$ 6	Àcid $\gamma$ -linolènic
C18:3 $\omega$ 3	Àcid linolènic
C18:4 $\omega$ 3	Àcid estearidònic
C20:0	Àcid eicosanoic
C20:1 $\omega$ 9	Àcid 11-eicosenoic
C20:3 $\omega$ 6	Àcid 8,11,14-eicosatrienoic
C20:4 $\omega$ 6	Àcid 5,8,11,14-eicosatetraenoic, àcid araquidònic
C20:5 $\omega$ 3	Àcid 5,8,11,14,17-eicosapentaenoic
C22:0	Àcid docosanoic
C22:1 $\omega$ 9	Àcid 13-docosenoic, àcid erúic
C22:4 $\omega$ 6	Àcid 7,10,13,16-docosatetraenoic, àcid adrènic
C22:5 $\omega$ 3	Àcid 7,10,13,16,19-docosapentaenoic
C22:5 $\omega$ 6	Àcid 4,7,10,13,16-docosapentaenoic
C22:6 $\omega$ 3	Àcid 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic
C24:0	Àcid lignocèric
C24:1 $\omega$ 9	Àcid 15-tetracosenoic, àcid nervònic
C24:5 $\omega$ 6	Àcid 4,7,10,13,16-tetracosapentaenoic
C24:6 $\omega$ 3	Àcid 4,7,10,13,16,19-tetracosahexaenoic
C26:0	Àcid hexacosanoic
cADN	ADN complementari
CCALD	Childhood cerebral adrenoleukodystrophy
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane regulator
CHO	Chinese Hamster Ovary
CoA	Coenzim A
CromG	Cromatografia de gasos
C <sub>T</sub>	Cicle en el qual comença la fase exponencial d'amplificació durant la PCR quantitativa
DAG	Diacilglicerol
DBP	D-bifunctional protein
DGK	Diacilglicerol cinasa
DHCA	Dihydroxycholestanic acid
D5D/D6D	$\Delta$ 5 desaturase/ $\Delta$ 6 desaturase
ELOVL	elongasa

---

EST	Expressed Sequence Tagg
FABP	Proteïna que uneix àcids grassos
FACL	Sintetasa d'àcids grassos
FAS	Fatty acid synthase
FATP	Proteïna transportadora d'àcids grassos
GTE	Glyceril trioerucate oil
GTO	Glyceril trioleate oil
HDL	Lipoproteïna d'alta densitat
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA
HPRT	hypoxanthine phosphoribosyl transferase
HSC	hematopoietic stem cell
IGBMC	Institute de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfat
IRM	Imatge de ressonància magnètica
LBP	L-bifunctional protein
LCFA	Long-chain fatty acid
LCS	Long-chain synthetase
LXR	Liver X receptor
mARN	ARN missatger
MCFA	Medium-chain fatty acid
ME	Microscopia electrònica
MEF	Mouse embryonic fibroblast
MRP	Multidrug resistant protein
MUFAs	Monounsaturated fatty acid
NBD	Nucleotide-binding domain
OSBP	Oxysterol binding protein-like
PBA (4PBA)	4-phenyl butyrate acid
PCR	Polymerase chain reaction
PECI	Peroxisomal enoil-CoA isomerase
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfat
PKC	Protein kinase C
PLC	Fosfolipasa C
PMP	Peroxisomal membrane protein
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PUFAs	Polyunsaturated fatty acid
RE	Reticle endoplasmàtic
RT-PCR	Retro-Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SCD	Stearoyl-CoA desaturase; $\Delta 9$ desaturase
SCFA	Short-chain fatty acid
SCP	Sterol carrier protein
SNC	Sistema nerviós central
SNP	Sistema nerviós perifèric
SREBP	Sterol regulatory element-binding protein
THCA	Trihydroxycholestanoic acid
TMD	Transmembrane domain
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
VLCFAs	Very long-chain fatty acids
VLCS	Very long-chain acyl-CoA synthetase
WT	Wild-type
Wt/tg	Ratolí transgènic per <i>aldr</i> ( <i>abcd2</i> )
X-ALD	Adrenoleucodistròfia lligada al X

Els àcids grassos són molècules constituïdes per una cadena hidrocarbonada i per un grup d'àcid carboxílic. Existeix una gran varietat d'àcids grassos que difereixen entre sí per la longitud de la seva cadena hidrocarbonada i pel nombre i posició de les insaturacions que contenen. En els éssers vius, els àcids grassos es troben majoritàriament esterificats en lípids, que són els elements estructurals de les membranes cel·lulars.

En mamífers, el metabolisme dels àcids grassos implica la participació de diferents orgànuls cel·lulars, inclosos la mitocondria, el reticle endoplasmàtic i el peroxisoma. Les mutacions que afectin a alguna de les proteïnes implicades en aquests processos poden donar lloc a alteracions del metabolisme lipídic que comportin greus patologies. En humans existeix una malaltia neurodegenerativa anomenada Adrenoleucodistrofia lligada al cromosoma X, la qual està causada per una alteració en la  $\beta$ -oxidació peroxisomal dels àcids grassos de cadena molt llarga. Aquesta patologia, així com la seva teràpia, han donat pas a la realització d'una gran varietat d'investigacions, entre les quals es pot incloure el treball que es presenta en aquesta memòria de tesi.

## 1. METABOLISME DELS ÀCIDS GRASSOS

En mamífers, els àcids grassos més abundants són els de 16 i 18 carbonis. Existeixen, però, àcids grassos de longitud major, com és el cas dels àcids grassos de cadena molt llarga (VLCFAs: very long-chain fatty acids). Dins d'aquest grup s'hi inclouen tots aquells que tenen 22 carbonis o més de longitud. Els VLCFAs són components d'una gran varietat de lípids, inclosos els glicerofosfolípids, esfingolípids i esters de colesterol. La seva longitud influeix en propietats físiques i químiques de la membrana com és la fluïdesa. Tot i que es troben en totes les cèl·lules, són especialment importants a cervell i testicles.

Els àcids grassos insaturats es classifiquen en diferents sèries segons quina sigui la posició, respecte al darrer grup metil de la cadena (denominat  $\omega$ ), del doble enllaç que li és més proper. Les principals sèries d'àcids grassos insaturats en mamífers inclouen la dels monoinsaturats  $\omega$ 9 ( $\omega$ 9-MUFAs:  $\omega$ 9- monounsaturated fatty acids), i les dels àcids grassos poliinsaturats  $\omega$ 3 i  $\omega$ 6 ( $\omega$ 3-,  $\omega$ 6-PUFAs:  $\omega$ 3-,  $\omega$ 6-polyunsaturated fatty acids). Tots ells són crucials pel desenvolupament del sistema nerviós. L'àcid nervònic (C24:1 $\omega$ 9), per exemple, és un dels principals components de la mielina. L'àcid docosahexaenoic (C22:6 $\omega$ 3) és un compost abundant a cervell i

retina. La seva deficiència ha estat associada a una davallada de les funcions cognitives i a l'inici de la malaltia d'Alzheimer en adults <sup>1</sup>. L'àcid araquidònic (C20:4 $\omega$ 6) forma part dels fosfolípids de membrana implicats en la transducció de senyals i també és utilitzat per a la síntesi d'eicosanoids <sup>2</sup>. Els eicosanoids participen en processos fisiològics com són les respostes inflamatòries, la regulació de la pressió sanguínea i en funcions reproductives.

La síntesi dels àcids grassos es dona al citoplasma i al reticle endoplasmàtic (RE). La seva degradació, en canvi, té lloc a la mitocondria i al peroxisoma. A continuació es descriuran aquests dos processos amb més detall.

### 1.1. LA SÍNTESI D'ÀCIDS GRASSOS

Els àcids grassos són sintetitzats *de novo* al citoplasma a través d'una sèrie de reaccions mediades per la sintetasa d'àcids grassos (FAS: fatty acid synthase). Aquest complex multienzimàtic pren l'acetil-CoA com a primer substracte, i l'elonga en increments de 2 carbonis per cicle utilitzant malonil-CoA com a font de carboni i NADPH com a cofactor. D'aquesta manera, el compost més llarg sintetitzat pel FAS és l'àcid palmític, de 16 carbonis.

La síntesi dels àcids grassos saturats de més de 16 carbonis es dona al RE, al igual que la dels  $\omega$ 9-MUFAs i la dels  $\omega$ 3- i  $\omega$ 6-PUFAs. L'àcid pamític (C16:0), a més de generar els àcids grassos saturats de longitud major, també dona lloc als  $\omega$ 9-MUFAs. Per contra, els precursors dels PUFAs són els àcids linolènic (C18:3 $\omega$ 3) i linoleic (C18:2 $\omega$ 6), els quals provenen exclusivament de la dieta.

La via sintètica d'àcids grassos al RE inclou reaccions d'elongació i de desaturació, que s'han representat en vertical i en horitzontal, respectivament, a la figura 1.1. El procés d'elongació consisteix en un allargament de dos residus de la cadena carbonada d'un àcid gras. En aquest cas, les reaccions estan catalitzades per un altre complex multienzimàtic, diferent del FAS, que inclou un enzim condensador, una  $\beta$ -oxoacil-CoA reductasa, una  $\beta$ -hidroxiacil-CoA deshidratasa i una 2-enoil-CoA reductasa. En alguns estudis s'ha proposat l'existència de diverses vies d'elongació amb diferents especificitats de substracte, ja sigui a nivell de desaturacions i/o a nivell de longitud de la cadena carbonada <sup>3,4</sup>. D'acord amb aquesta hipòtesi, s'han identificat diversos gens que codifiquen per enzims relacionats amb processos d'elongació, anomenats genèricament elongases (*elovl*). Entre aquests gens hi ha *elovl6* (*Ice/mars*)

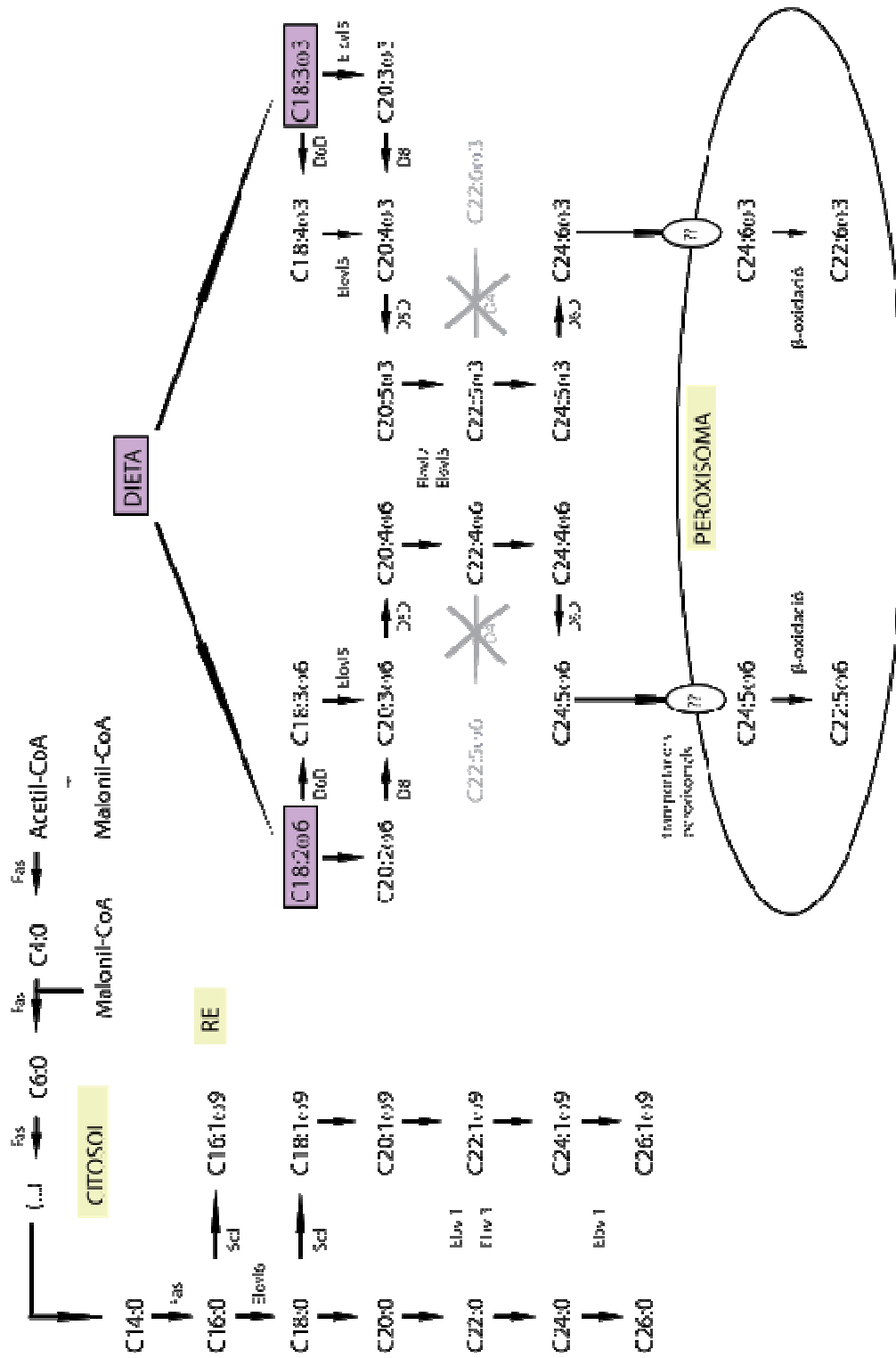


FIGURA 1.1. Vies d'elongació dels àcids grassos (Fas= fatty acid synthase; Scl: stearoyl-CoA desaturase; elox1= elongasa;

D5D, D6D= desaturasa 5 i 6; RE= reticle endoplasmàtic).

<sup>5,6</sup>, *elovl1 (ssc1)*, *elovl2 (ssc2)*<sup>7</sup> i *elovl3 (cig30)*<sup>8</sup>, tots ells identificats en ratolí, i *ELOVL5 (HELO1)*<sup>9</sup> i *ELOVL4*<sup>10</sup>, identificats en humà.

Pel que fa a les funcions de les elongases (ELOVL), representades a la figura 1.1, la ELOVL6 participa en l'elongació de l'àcid palmític (C16:0) a àcid esteàric (C18:0)<sup>5</sup>. La ELOVL1 i la ELOVL3 són els ortòlegs funcionals de SUR4 i FEN1 respectivament, les elongases implicades en la síntesi de VLCFAs a llevat, per la qual cosa es creu que tenen la mateixa funció en mamífers. De fet, s'ha demostrat que la reacció d'elongació del C24:0 a C26:0 està catalitzada exclusivament per la ELOVL1<sup>7</sup>. Aquests enzims també deuen intervenir, probablement, en la síntesi dels  $\omega$ 9-MUFAs de la mateixa longitud, ja que s'ha vist que aquests comparteixen el mateix sistema d'elongació amb els VLCFAs<sup>11</sup>.

Les funcions de les ELOVL2 i ELOVL5 estan relacionades amb la síntesi dels PUFAs (figura 1.1). Els substractes coneguts per a aquests dos enzims inclouen l'àcid araquidònic (C20:4 $\omega$ 6) i l'àcid eicosapentaenoic (C20:5 $\omega$ 3)<sup>7,9</sup>. A més s'ha demostrat que la ELOVL5 també pot dur a terme l'elongació de l'àcid  $\gamma$ -linolènic (C18:3 $\omega$ 6), de l'àcid  $\alpha$ -linolènic (C18:3 $\omega$ 3) i de l'àcid estearidònic (C18:4 $\omega$ 3). Finalment, la ELOVL4 és l'únic enzim pel qual encara no es coneix cap substracte, tot i que hi ha diversos tipus de distròfies maculars humanes que estan associades amb mutacions en el gen que el codifica<sup>12,13</sup>.

Les reaccions de desaturació estan catalitzades per enzims simples que introdueixen dobles enllaços entre residus definits de la cadena carbonada d'un àcid gras. En animals es coneixen tres desaturases:  $\Delta$ 6 (D6D),  $\Delta$ 5 (D5D) i  $\Delta$ 9 (SCD: stearoyl-CoA desaturase). Les dues primeres estan implicades en la síntesi dels PUFAs<sup>14,15</sup>, mentre que la  $\Delta$ 9 és responsable de la conversió dels àcids palmític i esteàric als seus corresponents  $\omega$ 9-MUFAs<sup>16</sup>. Els gens que codifiquen per cada un d'aquests enzims han estat identificats tant en ratolí com en humà<sup>17-20</sup>. S'ha mostrat l'existència d'una activitat desaturasa addicional, anomenada  $\Delta$ 8, en testicles humans<sup>21</sup> i de rata<sup>22</sup> però no en altres òrgans. També ha estat observada en línies cel·lulars de càncer de melsa<sup>23,24</sup> i en glioma<sup>25</sup>. De tota manera, l'enzim responsable d'aquesta activitat encara no ha estat purificat. Aquest representaria una alternativa a les desaturases  $\Delta$ 6 i  $\Delta$ 5 per a la síntesi d'àcid araquidònic (C20:4 $\omega$ 6) i d'àcid eicosapentaenoic (C20:5 $\omega$ 3), respectivament.

El peroxisoma també està implicat en la síntesi dels PUFAs, concretament en la dels àcids  $\omega$ 6-docosapentaenoic (C22:5 $\omega$ 6) i docosahexaenoic (C22:6 $\omega$ 3). Aquests compostos resulten de la  $\beta$ -oxidació peroxisomal dels àcids  $\omega$ 6-tetracosapentaenoic (C24:5 $\omega$ 6) i  $\omega$ 3-tetracosahexaenoic (C24:6 $\omega$ 3), respectivament. En un principi, però, es creia que el C22:5 $\omega$ 6 i el C22:6 $\omega$ 3 eren sintetitzats al RE a partir de la desaturació, en posició 4, del C22:4 $\omega$ 6 i del C22:5 $\omega$ 3, respectivament (veure figura 1.1). Aquest mecanisme es va descartar quan s'arribà a la conclusió que la desaturasa  $\Delta$ 4 no existeix<sup>26,27</sup>. La primera evidència sobre la relació del peroxisoma amb la síntesi d'aquests compostos va ser-ne la detecció de baixos nivells en teixits procedents de pacients afectats per la Síndrome de Zellweger<sup>28,29</sup>, una malaltia caracteritzada per l'absència de peroxisomes. Les successives investigacions han culminat amb la caracterització de la via i dels enzims implicats en el procés  $\beta$ -oxidatiu, tal com veurem més endavant, tot i que encara no se sap qui és el responsable del transport dels precursors al peroxisoma.

El procés de biosíntesi dels àcids grassos està regulat transcripcionalment a través de SREBP (sterol regulatory element-binding protein).

## 1.2. LA DEGRADACIÓ D'ÀCIDS GRASSOS

La  $\beta$ -oxidació és el principal mecanisme d'oxidació d'àcids grassos. El peroxisoma i la mitocòndria contenen dos sistemes de  $\beta$ -oxidació anàlegs<sup>30</sup>, amb els quals s'aconsegueix, en cada cicle, l'eliminació de dos residus de la cadena carbonada d'un àcid gras. En ambdós orgànuls el procés de la  $\beta$ -oxidació requereix una activació prèvia dels àcids grassos a esters de Coenzim A (CoA). La  $\beta$ -oxidació implica quatre reaccions consecutives (figura 1.2): (i) oxidació de l'acil-CoA per donar lloc a 2-trans-enoil-CoA, (ii) hidratació de 2-trans-enoil-CoA per donar pas a 3-hidroxiacil-CoA, (iii) obtenció de 3-cetoacil-CoA a través d'una deshidrogenació de 3-hidroxiacil-CoA i (iv) el 3-cetoacil-CoA és tallat per una tiolasa donant pas a un acil-CoA de cadena més curta i a una unitat d'acetyl-CoA. En la mitocòndria, la primera reacció està catalitzada per una deshidrogenasa acoblada a la cadena respiratòria. En el peroxisoma, per contra, ho està per una oxidasa que dóna lloc a la producció de peròxid d'hidrogen, el qual és destruït per una catalasa a la matriu peroximal. Pel què fa a la resta de reaccions de la  $\beta$ -oxidació, no hi ha diferències entre els dos orgànuls, tot i que cadascú té la seva pròpia bateria d'enzims codificats per gens diferents<sup>31</sup>.



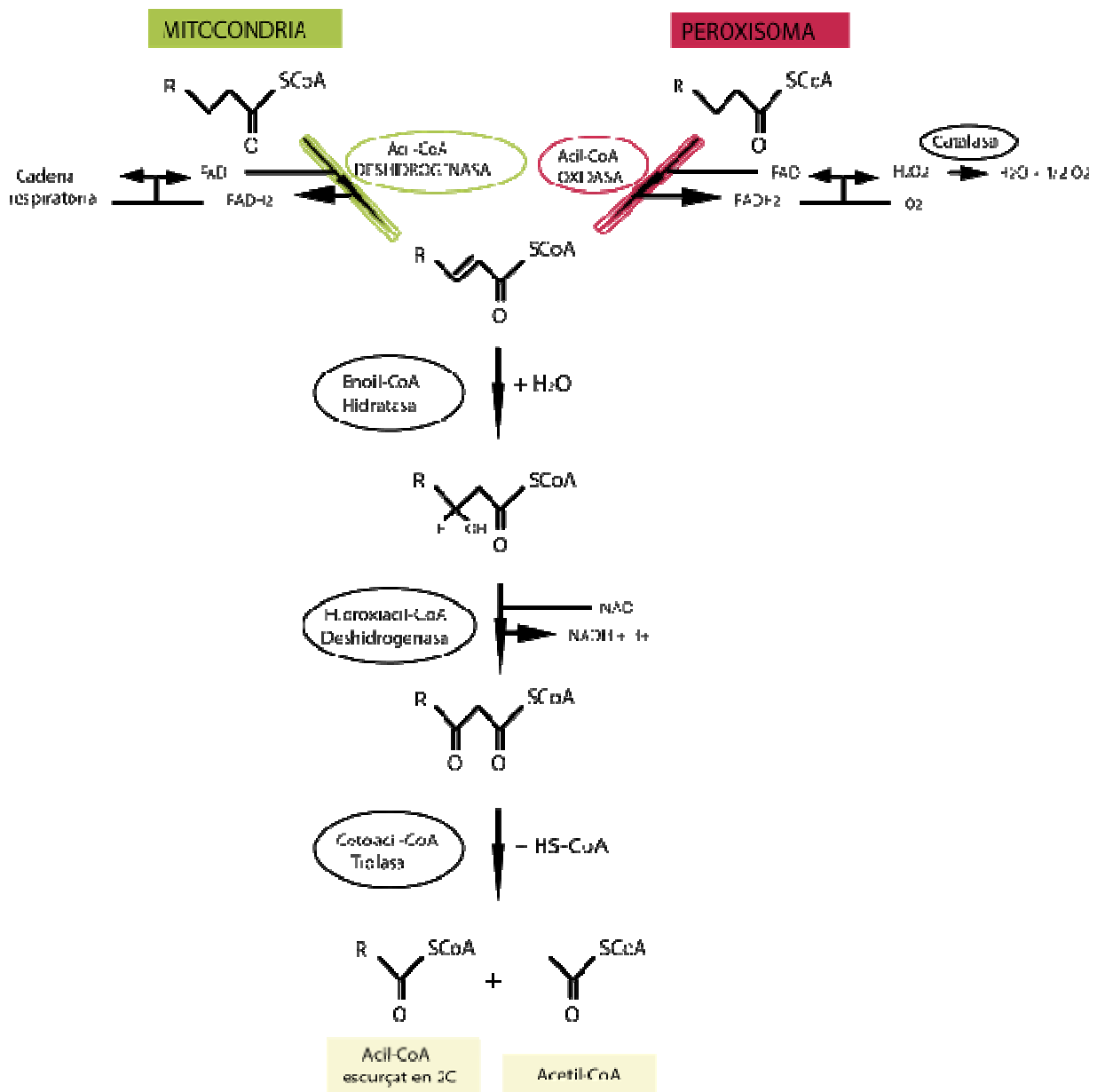


FIGURA 1.2. Reaccions de la  $\beta$ -oxidació mitocondrial i peroxisomal

Els dos sistemes  $\beta$ -oxidatius mostren tres grans diferències. La primera d'elles, molt important a nivell fisiològic, és l'especificitat de substrate. La mitocòndria realitza, bàsicament, la  $\beta$ -oxidació dels àcids grassos de cadena curta, mitjana i llarga (SCFA, MCFA, LCFA: short-, medium- and long- chain fatty acids) que provenen de la dieta. Pel què fa al peroxisoma, els substractes de la  $\beta$ -oxidació inclouen VLCFA, LCFAs, MUFAs i PUFAs de cadena llarga, àcid pristànic, àcids di- i trihidroxicolestanoic (DHCA, THCA: Di-, Trihydroxycholestanoic acid), àcids dicarboxílics de cadena llarga, certs leucotriens i prostaglandines, i les cadenes laterals d'alguns xenobiòtics.

La segona gran diferència entre ambdós processos es troba a nivell dels productes finals resultants. La mitocòndria és capaç de degradar completament els àcids grassos fins a l'obtenció d'una última unitat d'acetil-CoA, mentre que això no és possible en el peroxisoma. Les oxidases peroxisomals tenen molt poca afinitat, per no dir nul·la, pels acil-CoA de cadena curta <sup>32</sup>. Els substractes peroxisomals poden ser sotmesos a diversos cicles consecutius de  $\beta$ -oxidació, donant lloc a uns productes de cadena més curta que podran ser transportats a la mitocòndria per tal de ser oxidats de forma completa. Finalment, el procés de  $\beta$ -oxidació mitocondrial produeix energia en forma d'ATP, mentre que l'energia generada durant el procés de  $\beta$ -oxidació peroxisomal es dissipa en forma de calor.

Tot i que la  $\beta$ -oxidació és el mecanisme d'oxidació per a la majoria d'àcids grassos, n'hi ha alguns que no hi poden ser sotmesos degut a l'estructura de la seva molècula. Aquest és el cas dels àcids grassos que posseeixen un grup metil en posició 3, com l'àcid fitànic. Aquest compost passa per un procés anomenat  $\alpha$ -oxidació <sup>33,34</sup>, el qual té lloc al peroxisoma i finalitza amb la formació d'àcid pristànic. L'àcid pristànic, a diferència de l'àcid fitànic, és un substrate apte per a la  $\beta$ -oxidació peroxisomal, per la qual cosa continua el seu procés de degradació per aquesta via.

Els defectes en els mecanismes de degradació dels àcids grassos poden causar greus patologies. Un exemple n'és l'adrenoleucodistrofia lligada al cromosoma X, la qual és matèria del nostre estudi. Aquesta malaltia és deguda a un defecte en la  $\beta$ -oxidació peroxisomal que condueix a una acumulació de VLCFAs. És per això que en els següents apartats es descriurà amb més detall el procés  $\beta$ -oxidatiu a peroxisoma.

### 1.2.1. LA $\beta$ -OXIDACIÓ PEROXISOMAL.

La  $\beta$ -oxidació peroxisomal és un procés àmpliament estudiat. La majoria de coneixements estan basats en l'estudi de la  $\beta$ -oxidació dels VLCFAs, àcid pristànic i DHCA/THCA, ja que són marcadors de malalties peroxisomals. Els VLCFAs són àcids grassos de cadena lineal, mentre que la resta són àcids grassos de cadena ramificada. L'àcid pristànic, a més de ser obtingut a través de la  $\alpha$ -oxidació de l'àcid fitànic, també pot provenir de la dieta. Els DHCA i THCA són sintetitzats al fetge a partir del colesterol i són els precursors dels àcids biliars.

A continuació veurem el mecanisme general d'aquest procés, que hem dividit en tres etapes: (i) activació i entrada dels substractes al peroxisoma, (ii) enzims implicats en la  $\beta$ -oxidació i (iii) sortida dels productes finals.

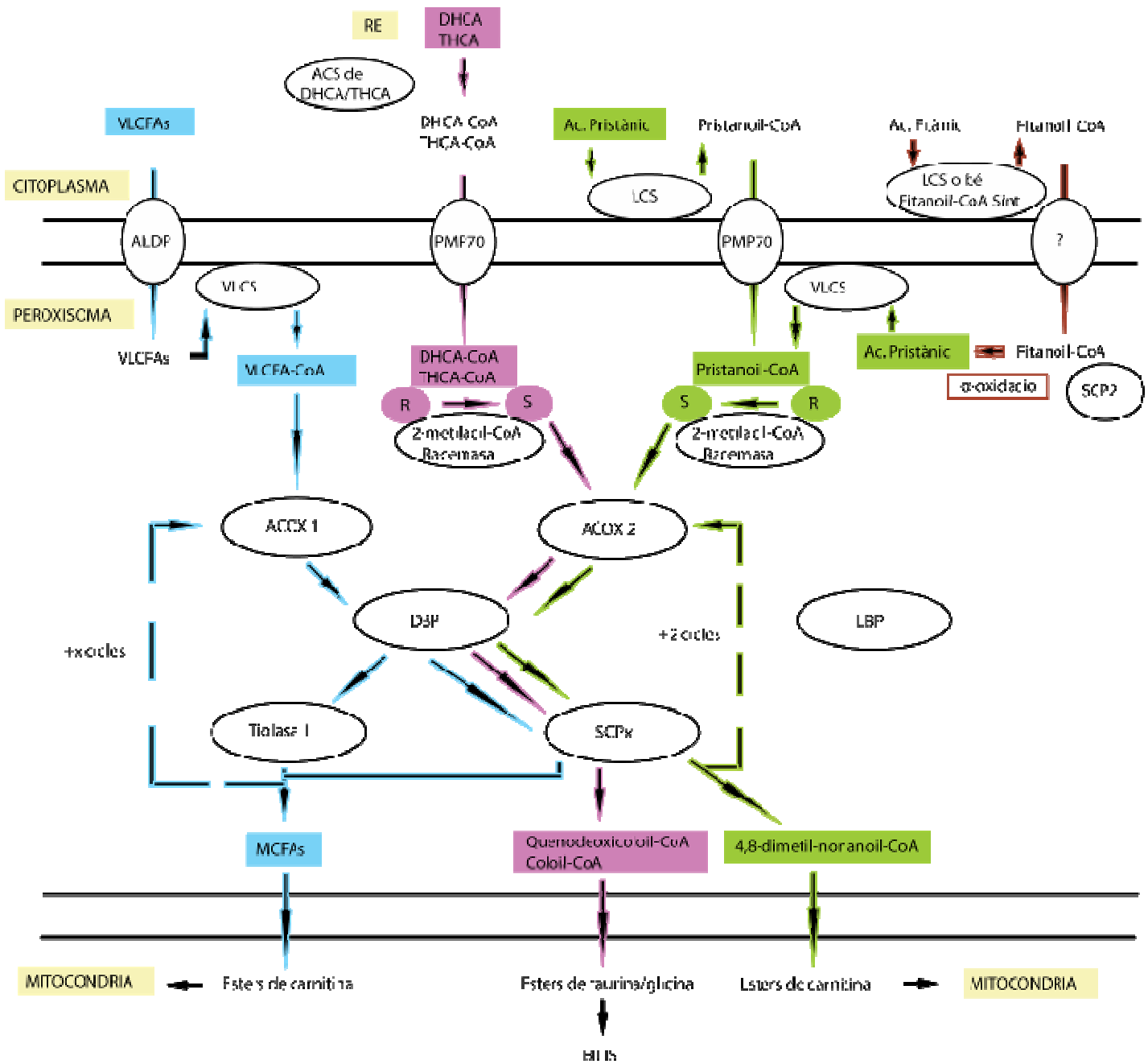
#### 1.2.1.1. Mecanisme general de la $\beta$ -oxidació peroxisomal

##### 1.2.1.1.1. Activació i entrada dels substractes al peroxisoma

La  $\beta$ -oxidació peroxisomal requereix una activació prèvia dels àcids grassos a esters de CoA. L'activació de DHCA i THCA és catalitzada per una acil-CoA sintetasa (ACS: acyl-CoA synthetase) situada al RE <sup>35</sup>, mentre que en el cas dels VLCFAs i de l'àcid pristànic se n'encarrega una sintetasa peroxisomal (veure figura 1.3).

L'enzim que activa els VLCFAs és anomenat acil-CoA sintetasa de VLCFAs (VLCS: very long chain acyl-CoA synthetase) <sup>36-39</sup>. És una proteïna associada a la membrana peroxisomal per la cara luminal <sup>40,41</sup>, per la qual cosa la reacció es donaria a l'interior de l'orgànul. Aquest enzim també mostra una alta activitat enfront de l'àcid pristànic <sup>40</sup>. L'àcid pristànic sembla ser, alhora, un substrate per a la LCS (long-chain acyl-CoA synthetase), enzim localitzat a la membrana peroxisomal i dedicat principalment a l'activació de LCFAs <sup>42</sup>. Aquesta sintetasa, a diferència de la VLCS, tindria el domini actiu situat vers el citoplasma, fet que condicionaria que la reacció tingui lloc a l'exterior del peroxisoma. Davant d'aquestes dades, s'ha proposat la participació dels dos enzims en l'activació de l'àcid pristànic segons les seves fonts d'origen diferents <sup>43</sup>: la VLCS activaria l'àcid pristànic format a través de la  $\alpha$ -oxidació de l'àcid fitànic mentre que la LCS s'encarregaria del substrate procedent de la dieta.

El procés de  $\alpha$ -oxidació de l'àcid fitànic també requereix una activació d'aquest compost. Aquesta reacció seria catalitzada per una ACS peroxisomal amb el domini actiu orientat cap al citoplasma. Encara no està clar si es tracta d'un nou enzim



**FIGURA 1.3.**  $\beta$ -oxidació peroxisomal dels àcids grassos de cadena molt llarga (VLCFAs), àcids di- i trihidroxicolestaenoic (DHCA/THCA) i àcid pristànic. (Abreviacions: ACS= acil-CoA sintetasa; VLCs= very long-chain acyl-CoA syntetase; LCS= long-chain acyl-CoA syntetase; ACOX= acyl-CoA oxydase; DBP, LBP= D-, L-b functional protein; SCPx/SCP2= sterol carrier protein x/2; MCFAs= Medium-chain fatty acids; RE= reticle )

específic per a aquest compost <sup>44</sup> o bé de la mateixa LCS que s'ocuparia de l'activació de l'àcid pristànic que prové de la dieta <sup>45</sup>.

L'import de tots aquests compostos al peroxisoma seria realitzat a través de proteïnes transportadores (figura 1.3). En el cas dels VLCFAs hi ha implicada la proteïna ALDP, ja que els pacients X-ALD presenten un defecte en el gen codificador d'aquesta proteïna, com veurem més endavant. Pel què fa a l'entrada dels acil-CoA derivats de l'àcid pristànic i dels DHCA/THCA, s'ha suggerit la participació de PMP70<sup>46</sup> en aquest procés. Per contra, en el cas dels esters de fitanoil-CoA, aquesta qüestió encara està per resoldre.

#### 1.2.1.1.2. Enzims implicats en la $\beta$ -oxidació

El primer enzim que participa en el procés d'escurçament dels àcids grassos al peroxisoma és l'acil-CoA oxidasa (ACOX: acyl-CoA oxidase). En humans s'han caracteritzat dos enzims d'aquest tipus. Un d'ells només té afinitat pels esters de CoA derivats d'àcids grassos lineals (com els VLCFAs), per la qual cosa és anomenat acil-CoA oxidasa de cadena lineal o ACOX1 <sup>47</sup>. L'altre, conegut com ACOX2 o acil-CoA oxidasa de cadena ramificada, té afinitat tant pels derivats acil-CoA de cadena lineal com pels de cadena ramificada (pristanoyl-CoA, DHCA/THCAoyl-CoA)<sup>32</sup>. De tota manera s'ha comprovat que el paper fisiològic d'aquest enzim rau, exclusivament, en l'oxidació dels àcids grassos ramificats <sup>48</sup>, tal com s'il·lustra a la figura 1.3.

És important destacar que els àcids grassos ramificats amb un grup metil en posició 2, com és el cas de l'àcid pristànic i de DHCA i THCA, presenten estereoisomeria (S i R). Les oxidases de la  $\beta$ -oxidació peroxisomal són específiques per als estereoisòmers S <sup>49-51</sup>. En conseqüència, per tal que els estereoisòmers R puguin ser  $\beta$ -oxidats, és necessària l'acció prèvia d'una 2-metilacil-CoA racemasa que els converteixi en estereoisòmers S <sup>52,53</sup> (veure figura 1.3).

Després de la primera reacció d'oxidació dels substractes, entra en joc la proteïna bifuncional, que catalitzarà les dues reaccions següents (hidratació i deshidrogenació) del procés  $\beta$ -oxidatiu. Les dues proteïnes bifuncionals identificades en humans tenen molt poca homologia a nivell de seqüència i són estructuralment molt diferents. Són anomenades proteïna bifuncional L i proteïna bifuncional D (LBP, DBP: L-, D- bifunctional protein) segons si el producte intermediari que es forma entre les

dues reaccions que catalitzen és el L-3-hidroxiacil-CoA o bé el D-3-hidroxiacil-CoA, respectivament. Actualment es considera que DBP és l'enzim implicat en la  $\beta$ -oxidació de VLCFAs, àcid pristànic i DHCA/THCA (figura 1.3), degut al fet que tots aquests compostos es troben acumulats tant en pacients amb una deficiència per aquest enzim <sup>54-57</sup>, com en ratolins "knockout" per al gen que la codifica <sup>58</sup>. Per contra, el paper fisiològic de LBP roman encara desconegut ja que, per una banda, no s'han identificat pacients que mostrin una deficiència per aquest enzim i, per l'altra, el ratolí "knockout" per al gen que la codifica no presenta cap tipus d'alteració bioquímica al plasma <sup>59</sup>.

Finalment, les tiolases catalitzen la darrera reacció de la  $\beta$ -oxidació, en la qual la cadena carbonada del substracte és tallada de manera que es perden 2 residus en forma d'acetil-CoA. En humans s'han identificat la tiolasa peroxisomal 1 o tiolasa clàssica <sup>60</sup> i la tiolasa peroxisomal 2 o proteïna transportadora d'esterols (SCPx: sterol carrier protein) <sup>61</sup>. Aquesta última conté un domini tiolasa i un domini de proteïna transportadora d'esterols. La rellevància fisiològica d'aquests enzims no està del tot clara degut a la manca de pacients deficients per algun d'ells. Tot i així es creu que les dues tiolases actuen en la  $\beta$ -oxidació dels VLCFAs, mentre que només la SCPx intervé en la de l'àcid pristànic i la de DHCA/THCA <sup>62</sup> (figura 1.3).

El gen codificador de la SCPx té dos punts d'inici de la transcripció, controlats per dos promotors específics, donant lloc a dos transcrits diferents. El més llarg codifica per a la SCPx, mentre que el segon codifica per una proteïna anomenada SCP2 (SCP2: sterol carrier protein 2). En un estudi recent s'ha suggerit que aquesta proteïna podria ajudar a la solubilització del fitanoil-CoA a l'interior del peroxisoma <sup>63</sup>.

#### **1.2.1.1.3. Sortida dels productes finals de la $\beta$ -oxidació**

Els VLCFAs són sotmesos a nombrosos cicles successius de  $\beta$ -oxidació, fins a l'obtenció de MCFAs. En el cas de l'àcid pristànic s'ha vist que sofreix tres cicles consecutius de  $\beta$ -oxidació, donant lloc al 2-metil-4octanoil-CoA <sup>64</sup>. Els productes resultants del procés  $\beta$ -oxidatiu dels VLCFAs i de l'àcid pristànic són extrets del peroxisoma en forma d'èsters de carnitina i transportats a la mitocondria per tal de ser completament oxidats <sup>62</sup> (figura 1.3).

Pel que fa a DHCA i THCA, aquests passen un sol cicle de  $\beta$ -oxidació i donen lloc als àcids biliars quenodioxícòlic i còlic, respectivament. Aquests productes són

conjugats amb taurina/glicina i exportats a l'exterior del peroxisoma per ser, finalment, extruïts a la bilis.

### 1.2.1.2. La $\beta$ -oxidació dels àcids grassos insaturats

El peroxisoma també juga un paper important en la degradació d'àcids grassos insaturats. El procés de  $\beta$ -oxidació només accepta un únic intermediari insaturat, el 2-*trans*-enoil-CoA derivat, que resulta de la primera reacció catalitzada per l'oxidasa. La presència d'un doble enllaç addicional a la zona implicada en el procés  $\beta$ -oxidatiu impedeix la seva continuació. A més, cal tenir en compte que tots els àcids grassos insaturats que trobem de forma natural a l'organisme contenen dobles enllaços en configuració *cis*. Un àcid gras amb una insaturació d'aquest tipus en posició 2 tampoc pot ser  $\beta$ -oxidat.

Tenint en compte aquests dos factors, la  $\beta$ -oxidació peroxisomal d'un àcid gras insaturat pot implicar la col.laboració d'un grup d'enzims auxiliars, depenent de quina sigui la posició dels seus dobles enllaços en relació al grup tioester. Tal com hem dit anteriorment, la  $\beta$ -oxidació peroxisomal no degrada completament els àcids grassos. Així doncs, només els compostos que són oxidats més enllà de la primera insaturació, com és el cas de l'àcid araquidònic o de l'àcid docosahexaenoic, requereixen l'acció d'aquests enzims <sup>65</sup>. En canvi, altres compostos com l'àcid oleic, que són oxidats fins a un punt on no es veu involucrat cap dels seus dobles enllaços, seguiran el procés normal descrit en la secció anterior.

#### 1.2.1.2.1. Mecanismes d'eliminació dels dobles enllaços

Al igual que en el cas de la  $\beta$ -oxidació, aquests processos existeixen tant en el peroxisoma com en la mitocòndria i cada orgànul té la seva pròpia bateria d'enzims codificats per gens diferents. Segons quina sigui la posició que ocupi el doble enllaç en la cadena carbonada, és a dir, una posició de nombre parell o imparell, la seva eliminació implicarà la participació de diferents enzims.

A la figura 1.4 s'il.lustren les reaccions auxiliars en el procés de  $\beta$ -oxidació d'àcids grassos amb insaturacions en posició 4 i en posició 5. Ambdós àcids grassos insaturats, que prèviament han estat activats a esters de CoA, són sotmesos a la primera reacció de la  $\beta$ -oxidació. D'aquesta en resulten, segons el cas, un derivat 2-*trans*,4-*cis*-dienoil-CoA i un derivat 2-*trans*,5-*cis*-dienoil-CoA. La retirada de la insaturació en posició 4 del primer derivat es realitza de forma reductiva <sup>66</sup>, a través de





l'acció d'una 2,4-dienoil-CoA reductasa, que dóna lloc a un 3-*trans*-enoil-CoA. Tot seguit, en una reacció catalitzada per la  $\Delta^3, \Delta^2$ -enoil-CoA isomerasa, aquest producte intermediari és convertit en un 2-*trans*-enoil-CoA, amb el qual es podrà continuar el procés  $\beta$ -oxidatiu.

Pel que fa a l'eliminació d'insaturacions en posició 5, s'han descrit dos mecanismes diferents: la via isomerativa <sup>67</sup> i la via reductiva <sup>68,69</sup>. La primera d'elles, representada en blau a la figura 1.4, va ser descrita molt abans que la via reductiva. En aquest cas, la  $\beta$ -oxidació continua després de la formació del 2-*trans*,5-*cis*-dienoil-CoA, donant lloc a un acil-CoA amb una insaturació en posició 3. Aquest pot ser transformat a 2-*trans*-enoil-CoA gràcies a l'acció de la  $\Delta^3, \Delta^2$ -enoil-CoA isomerasa, per la qual cosa pot entrar en un nou cicle de  $\beta$ -oxidació.

El procés d'eliminació de dobles enllaços en posició 5 per via reductiva està representat en verd a la figura 1.4. En aquest cas, a diferència de les insaturacions en posició 4, es requereixen dues isomeritzacions prèvies a l'acció de la reductasa. La primera d'elles és catalitzada per la  $\Delta^3, \Delta^2$ -enoil-CoA isomerasa i dóna lloc a un 3-*trans*,5-*cis*-dienoil-CoA. La segona és una doble isomerització que requereix l'acció d'un nou enzim, la  $\Delta^3,5, \Delta^2,4$ -dienoil-CoA isomerasa. El producte resultant serveix de substrate a la 2,4-dienoil-CoA reductasa. El procés finalitza amb una nova intervenció de la  $\Delta^3, \Delta^2$ -enoil-CoA isomerasa, la qual dóna lloc al 2-*trans*-enoil-CoA apte per a continuar el procés  $\beta$ -oxidatiu.

Actualment encara no se sap quin és el grau de contribució de cada una d'aquestes vies en l'eliminació de dobles enllaços en posició 5. Les úniques dades publicades fins ara pertanyen a un estudi del metabolisme mitocondrial, on es suggereix que la via principal en aquest orgànul és la isomerativa <sup>70</sup>.

Així doncs, els enzims implicats en els mecanismes d'eliminació de dobles enllaços són tres: la 2,4-dienoil-CoA reductasa, la  $\Delta^3, \Delta^2$ -enoil-CoA isomerasa i la  $\Delta^3,5, \Delta^2,4$ -dienoil-CoA isomerasa. Tots ells han estat identificats i caracteritzats en peroxisomes de mamífers (ratolí i rata) <sup>69,71,72</sup>. La  $\Delta^3, \Delta^2$ -enoil-CoA isomerasa és necessària en tots els processos descrits, mentre que la  $\Delta^3,5, \Delta^2,4$ -dienoil-CoA isomerasa és específica per al procés reductiu d'eliminació d'insaturacions en posició 5.

L'activitat  $\Delta^3, \Delta^2$ -enoil-CoA isomerasa peroxisomal va ser primerament detectada en la proteïna bifuncional L (LBP)<sup>73</sup>, i més tard es va identificar un nou enzim (PECI: peroxisomal enoil-CoA isomerase) que també la posseeix<sup>72</sup>. Tot i que no es tenen dades definitives sobre la contribució específica de PECI i de LBP en aquests processos, es creu que el primer s'ocuparia de les isomeritzacions de 3-*cis*-enoil-CoA i de 3-*trans*-enoil-CoA a 2-*trans*-enoil-CoA, mentre que la LBP catalitzaria la isomerització de 2-*trans*,5-*cis*-dienoil-CoA a 3-*trans*,5-*cis*-dienoil-CoA<sup>74</sup>.

#### 1.2.1.2.2. Implicacions d'aquests mecanismes en el metabolisme dels àcids grassos poliinsaturats

La  $\beta$ -oxidació peroxisomal permet la retroconversió dels PUFAs, que és un procés invers al de la síntesi, en el qual es "retrocedeix" per tornar a obtenir els compostos primaris de cadena més curta. La seva importància fisiològica es desconeix.

La primera idea de retroconversió va arribar arran de la troballa de C20:4 $\omega$ 6 en teixits procedents de rates alimentades amb una dieta lliure d'àcids grassos i suplementada amb C22:5 $\omega$ 6<sup>75-77</sup>. En un principi es va pensar que aquest era un procés mitocondrial, tot i que hi havia una absoluta discordància amb el fet que la  $\beta$ -oxidació en aquest orgànul progressa fins a la degradació total del compost. Estudis posteriors demostraren que la retroconversió és un procés més aviat peroxisomal que mitocondrial<sup>78</sup>. El suport final a aquest fet arribà amb les alteracions en la retroconversió de PUFAs de 22 carbonis detectades en cel·lules provinents de malalts afectats per malalties peroxisomals<sup>79,80</sup>, entre les quals hi ha inclosa una deficiència de l'activitat acil-CoA oxidasa<sup>81</sup>.

#### 1.2.1.3. La vessant anabòlica de la $\beta$ -oxidació peroxisomal

La  $\beta$ -oxidació peroxisomal, a part de la seva funció catabòlica, també participa en la síntesi de l'àcid docosahexaenoic (C22:6 $\omega$ 3), tal com hem vist anteriorment. Aquest és obtingut a través de la  $\beta$ -oxidació del C24:6 $\omega$ 3, el qual és sintetitzat al RE a partir de l'àcid linolènic (C18:3 $\omega$ 3). Els enzims implicats en la formació de l'àcid docosahexaenoic són els mateixos que els que participen en la  $\beta$ -oxidació del C26:0<sup>82</sup>, tot i que encara es desconeix el responsable del transport del substracte a l'interior del peroxisoma. Com que en aquest procés no es veu involucrada cap de les insaturacions del C24:6 $\omega$ 3, no és necessària la intervenció prèvia dels enzims auxiliars

descrits amb anterioritat. Un mecanisme similar a aquest existiria també per a la formació de C22:5 $\omega$ 6<sup>83</sup>.

Els processos d'elongació d'àcids grassos es donen principalment en el RE. Tot i així, sembla ser que hi pot haver sistemes d'elongació addicionals en altres orgànuls, si bé la seva funcionalitat i importància fisiològica resten per aclarir<sup>4,83</sup>. Fins ara se n'ha descrit un a la mitocòndria<sup>84</sup>, i hi ha evidències bastant clares sobre l'existència d'un altre al peroxisoma<sup>85</sup>. Els processos d'elongació comprenen 4 reaccions: (i) condensació de malonil-CoA amb acil-CoA per donar lloc a un  $\beta$ -ceto acil-CoA de cadena més llarga, (ii) reducció del grup cetònic, (iii) hidratació per formar un 2-enoil-CoA derivat i (iv) reducció d'aquest compost per donar lloc a un acil-CoA de longitud incrementada en dos carbonis. L'elongació d'àcids grassos al RE és realitzada per un complex multienzimàtic, mentre que en els sistemes mitocondrial i peroxisomal, aquesta estaria realitzada pels enzims de la via de la  $\beta$ -oxidació<sup>84,85</sup>. Tal com es mostra a la figura 1.5, totes les reaccions de la  $\beta$ -oxidació són reversibles en ambdós orgànuls, excepte la primera (fig 1.4). El sistema d'elongació implicaria aquest conjunt de reaccions en direcció reversa i l'acció d'un altre enzim amb activitat 2-enoil-CoA reductasa que catalitzi l'última reacció, la de reducció del 2-enoil-CoA. Aquest enzim ha estat purificat primer a mitocòndria<sup>86</sup> i després a peroxisoma<sup>87</sup>, la qual cosa dona l'evidència de l'existència de sistemes d'elongació en aquests orgànuls. De tota manera, tal com hem dit anteriorment, la seva funcionalitat i importància fisiològica resten per aclarir.

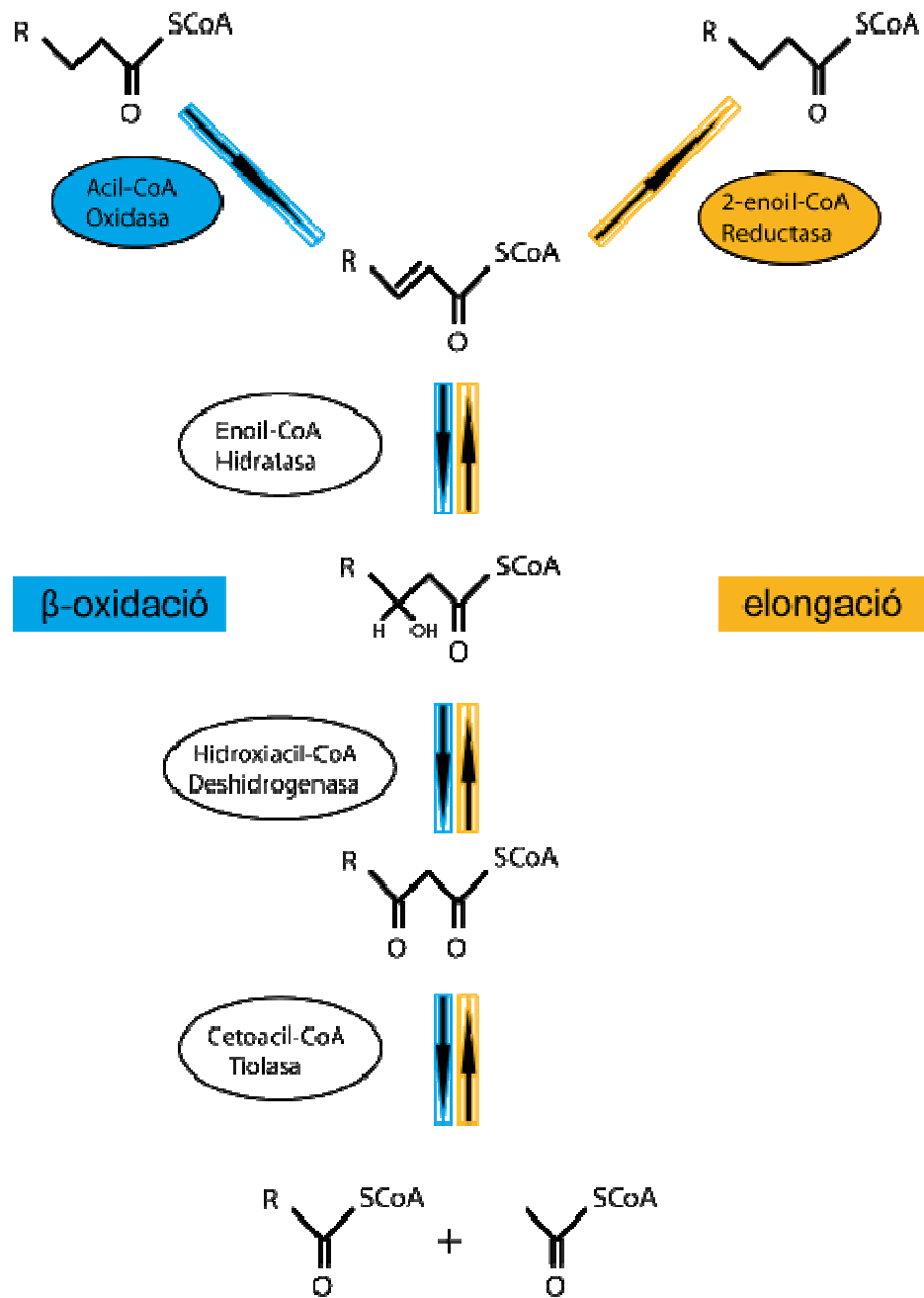


FIGURA 1.5. Hipotètic sistema d'elongació peroxisomal d'àcids grassos

## 2. ADRENOLEUCODISTRÒFIA L·LIGADA AL CROMOSOMA X

L'adrenoleucodistròfia lligada al cromosoma X (X-ALD; McKusick nº 300100) és el desordre peroxisomal més freqüent, amb una incidència situada entre 1:20000 i 1:50000 naixements<sup>88</sup>. És una malaltia de debut infantil o adult que, tal com indica el seu nom, té un tipus d'herència lligada al cromosoma X.

Els pacients presenten un increment de VLCFAs<sup>89,90</sup>, sobretot d'àcid hexacosanoic (C26:0), en tots els teixits i fluïds corporals, degut a un defecte en la  $\beta$ -oxidació peroxisomal d'aquests compostos. Els majors increments de C26:0 es donen al sistema nerviós, a la glàndula adrenal i als testicles, veient-se especialment augmentats a les fraccions d'esters de colesterol, gangliòsids i proteolípid de la matèria blanca del cervell, i a la fracció d'esters de colesterol del còrtex adrenal<sup>88</sup>.

### 2.1. ASPECTES CLÍNICS

El primer cas de X-ALD va ser descrit l'any 1923 per Siemerling i Creutzfeldt<sup>91</sup>. Es tractava d'un nen de 4 anys, sense problemes previs de salut que començà a desenvolupar una intensa pigmentació de la pell i alguns problemes de comportament. Aquests primers símptomes evolucionaren ràpidament cap a una disfunció neurològica progressiva que finalitzà amb la seva mort al cap de tres anys. Una anàlisi post-mortem revelà una atròfia del còrtex adrenal i una extensa desmielinització cerebral, acompanyada per una resposta perivascular. Ja a la dècada dels anys 60, es suggerí que aquesta malaltia tenia un tipus d'herència lligat al cromosoma X<sup>92</sup>, i es proposà el nom d'adrenoleucodistròfia en base a l'estreta relació que s'estableix entre una leucodistròfia i una insuficiència adrenal<sup>93</sup>.

#### 2.1.1. FENOTIPS CLÍNICS

L'adrenoleucodistròfia lligada al cromosoma X és una malaltia que presenta una àmplia variabilitat fenotípica. Hi ha descrites 6 formes clíniques diferents en base a tres criteris: l'edat d'inici de la patologia, el seu ritme de progressió i el tipus d'afectació neurològica. A més, tal com especificarem més endavant, bona part dels pacients manifesten algun grau d'insuficiència adrenal.

##### 2.1.1.1. Forma cerebral infantil (CCALD: Childhood Cerebral ALD)

En la major part dels casos, la malaltia comença a manifestar-se entre els 4 i els 10 anys d'edat<sup>88,94</sup>. Es produeix una activa desmielinització cerebral de progressió ràpida<sup>95</sup>, associada a una infiltració perivascular de limfocits i de macròfags semblant a

la que s'observa en l'esclerosi múltiple <sup>96</sup>. El procés de desmielinització sol començar en la regió parieto-occipital del cervell, tal com es constata en la majoria de pacients a través d'imatges obtingudes per ressonància magnètica (IRM) <sup>97</sup> (veure figura 1.6A).

Els primers símptomes neurològics inclouen trastorns de la conducta, dificultat d'aprenentatge, deterioració de la visió i de l'audició, entre d'altres. La malaltia evoluciona amb una parèsia espàstica, dificultat en la deglució, pèrdua de la parla i demència (figura 1.6B: imatge d'un pacient amb aquesta clínica). En les últimes fases la majoria dels pacients entren en estat vegetatiu. La mort s'esdevé entre 2 i 4 anys després de l'aparició dels primers símptomes neurològics <sup>88</sup>.

#### **2.1.1.2. Forma cerebral adolescent**

L'edat d'inici de la patologia es situa entre els 11 i els 21 anys <sup>88,94</sup>. La simptomatologia, l'afectació cerebral i la rapidesa de progressió de la malaltia són similars que en l'anterior, però es dona amb molta menys freqüència.

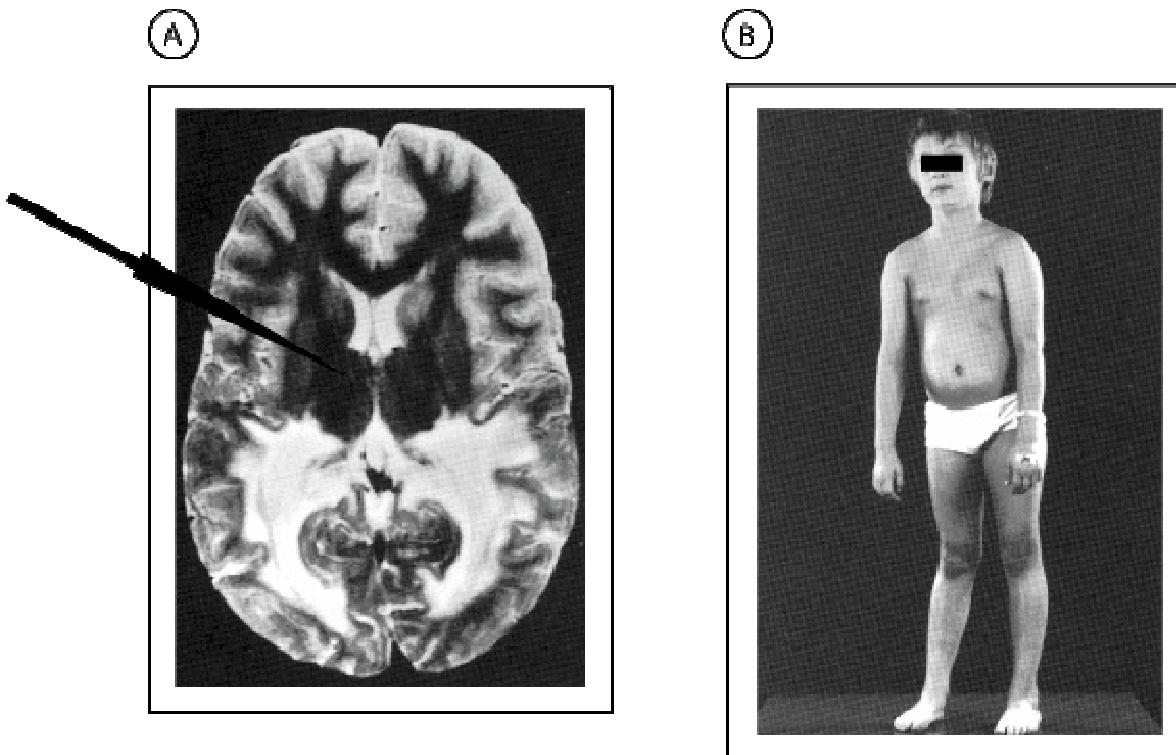
#### **2.1.1.3. Forma cerebral adulta**

Els primers símptomes apareixen a partir dels 20 anys d'edat i són similars als descrits fins ara: trastorns del comportament, demència, convulsions i altres deficiències neurològiques cerebrals. Al igual que en els altres dos casos anteriors, es produeix una desmielinització cerebral acompanyada per una resposta inflamatòria, i la seva progressió també és igual de ràpida. Degut a la baixa freqüència d'aquest fenotip, els pacients poden ser erròniament diagnosticats com casos de desordres psiquiàtrics <sup>94</sup>.

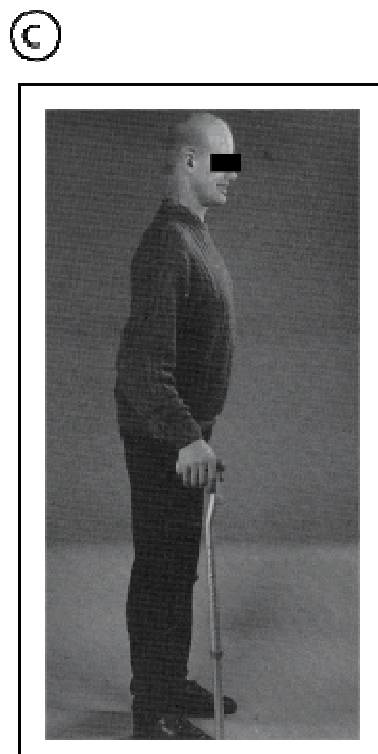
És important remarcar que el 70% dels pacients afectats per una forma cerebral de la malaltia, ja sigui infantil, adolescent o adulta, presenten alhora una insuficiència adrenocortical <sup>98</sup>.

#### **2.1.1.4. Adrenomieloneuropatia (AMN)**

El seu inici es dona entre els 30 i els 50 anys d'edat <sup>99,100</sup>. Es tracta d'una neuropatia perifèrica que afecta, principalment, la medulla espinal i els nervis perifèrics. Es produeix una desmielinització de les zones afectades i no es troba associada a cap reacció inflamatòria <sup>101</sup>. És una forma menys severa i de progressió més lenta que les anteriors, que pot donar pas a una esperança de vida normal.



**FIGURA 1.6.** A) IRM cerebral d'un pacient CCALD (zones de desmielinització indicades amb una fletxa). B) Imatge d'un pacient CCALD



**FIGURA 1.7.** Imatge d'un pacient AMN

Els pacients que sofreixen aquesta forma clínica desenvolupen, de forma gradual, una parèsia espàstica a les cames (veure figura 1.7) que sovint va acompanyada d'una disfunció dels esfínters <sup>88,94</sup>. Aproximadament el 50% d'aquests pacients mostra una afectació cerebral de més o menys importància, que en alguns casos pot arribar a ser comparable a la de la forma CCALD. Per altra banda, en el 70% dels casos també es presenta una insuficiència adrenal.

#### **2.1.1.5. Addison**

Aquest fenotip clínic implica una disfunció aïllada del còrtex adrenal <sup>88,94</sup>, tot i que el risc de desenvolupar una afectació neurològica és elevat. La malaltia es manifesta a través de fatiga, hipotensió i pigmentació difusa de la pell. A nivell bioquímic, els pacients mostren un increment en els nivells plasmàtics d'adrenocorticotropina (ACTH), que sovint es combina amb una disminució dels de cortisol <sup>94</sup>.

#### **2.1.1.6. Assimptomàtics / pressimptomàtics**

Els pacients que són classificats dins d'aquest grup presenten tant el defecte genètic com el bioquímic, però no mostren cap simptomatologia. No pateixen cap tipus d'insuficiència adrenal ni desordres neurològics, encara que en alguns casos s'hagi arribat a observar anormalitats cerebrals a través de IRM <sup>102</sup>. De tota manera, pràcticament la totalitat d'aquests pacients arribarà a desenvolupar algun quadre patològic al llarg de la seva vida <sup>88,94</sup>.

#### **2.1.1.7. Dones heterozigotes**

Degut al tipus d'herència d'aquesta malaltia, el fenotip de les dones heterozigotes està relacionat amb el procés aleatori d'inactivació del cromosoma X en les cèl·lules femenines. Aproximadament entre el 20 i el 50% d'aquestes pacients desenvolupa un quadre patològic similar a l'AMN <sup>100,103</sup>, encara que l'edat d'inici és més tardiva, i els símptomes són menys severs i de progressió més lenta que en el cas de la població AMN masculina.

El 20% de les dones heterozigotes per X-ALD presenten anormalitats cerebrals a nivell de la matèria blanca <sup>104</sup>. Tot i així, excepcionalment es donen casos de desmielinització cerebral de progressió ràpida <sup>103,105-107</sup>. Pel què fa a la insuficiència adrenal, rarament es presenta en aquest grup de pacients <sup>98 108</sup>.



### 2.1.2. EPIDEMIOLOGIA

Els fenotips que es donen amb més freqüència en la X-ALD són CCALD i AMN. El percentatge de casos per a cadascun d'ells és similar i es situa al voltant del 30%. Diferents estudis epidemiològics mostren que la primera és la forma clínica predominant en països com França <sup>109</sup> i Estats Units <sup>110</sup>, mentre que l'AMN és la més freqüent als Països Baixos <sup>100</sup>. Darrera d'aquestes hi hauria la forma Addison, que representa un 15% dels pacients. Per altra banda és important destacar que, dins d'una mateixa família, és freqüent que es manifestin diverses formes clíniques.

### 2.1.3. DIAGNÒSTIC

La presència de nivells elevats de VLCFAs en eritrocits <sup>111</sup>, leucocits <sup>112</sup>, fibroblasts de pell cultivada <sup>113,114</sup> i plasma <sup>115</sup> en pacients X-ALD és independent de la seva edat i de la presència de simptomatologia. Això ha permès l'establiment d'un diagnòstic bioquímic de la malaltia, que només es realitza en uns pocs laboratoris en tot el món. Aquest es basa normalment en l'anàlisi a plasma de la concentració de C26:0 i de les relacions C24:0/C22:0 i C26:0/C22:0. Tal com es mostra a continuació en la taula 1.1, aquests paràmetres es troben augmentats en els pacients hemizigots i també en les dones heterozigotes, encara que en menor grau. La funció discriminant aportada per A.B. Moser i els seus col.laboradors <sup>116</sup> permet separar de forma completa els pacients hemizigots dels individus control del mateix sexe. Per contra, la sensibilitat del test en dones portadores és només del 85% <sup>117</sup>. Malgrat tot, no s'ha pogut establir cap correlació entre el valor d'aquests paràmetres i el fenotip clínic.

Paràmetre	Normal	Hemizigots	Dones portadores
C26:0 (µg/ml)	0.24±0.14	1.30±0.45	0.68±0.29
C24:0/C22:0	0.78±0.10	1.71±0.23	1.30±0.19
C26:0/C22:0	0.01±0.003	0.07±0.03	0.04±0.02

**Taula 1.1.** Valors dels nivells plasmàtics de VLCFAs en X-ALD ([www.genetests.org](http://www.genetests.org)).

Existeixen altres tests complementaris per al diagnòstic de la malaltia, que es poden utilitzar en els casos en què la determinació dels nivells de VLCFAs no sigui conclusiva. La seva aplicació en el diagnòstic de dones heterozigotes també permet augmentar-ne la detecció al 100% dels casos. Aquests tests consisteixen en l'estudi de l'expressió de la proteïna ALDP, a través de immunocitoquímica en fibroblastes de pell cultivada, i en l'anàlisi molecular del gen responsable de la malaltia. En el primer

cas, cal tenir en compte que només el 80% dels pacients presenta una proteïna ALDP truncada i inestable que no es detecta immunològicament, mentre que el 20% restant mostra expressió de la proteïna mitjançant el mateix mètode <sup>118,119</sup>. Pel què fa a l'anàlisi molecular, aquest es realitza a través de dues tècniques: la seqüenciació del gen <sup>120</sup>, que permet detectar mutacions puntuals, i la hibridació Southern, que fa possible el descobriment de grans delecions i de reorganitzacions gèniques. La combinació d'ambdues dóna lloc a la detecció de mutacions en el 98% dels casos.

El diagnòstic pre-natal està a disposició de les dones portadores de la malaltia. El primer pas consisteix en la determinació del sexe mitjançant el cariotip de cèl·lules fetals provinents de les vellositats coriòniques (recollides a les 10-12 setmanes de gestació) o del líquid amniòtic (a les 16-18 setmanes de gestació). Si el cariotip és 46, XY i la mutació responsable de la malaltia ha estat identificada en algun altre membre de la família, es pot realitzar l'anàlisi de l'ADN procedent de les cèl·lules fetals. Si l'anàlisi mutacional no és possible, es pot procedir a la mesura dels nivells de VLCFAs en cultius d'amniocits o de vellositats coriòniques <sup>121,122</sup>. De tota manera, en el diagnòstic pre-natal sempre és aconsellable l'ús de totes les tècniques disponibles.

#### 2.1.4. PATOGÈNESI

L'alteració bioquímica característica de la X-ALD és un increment de VLCFAs, que sembla iniciar el mecanisme de patogènesi observat en els diferents teixits diana. La causa de l'acumulació d'aquests compostos ha estat associada a un defecte en el seu procés de  $\beta$ -oxidació al peroxisoma <sup>123,124</sup>. El problema ha estat localitzat, concretament, en l'etapa d'activació dels VLCFAs a esters de CoA <sup>125,126</sup>, reacció catalitzada per la VLCS. De tota manera, el gen responsable de la malaltia no codifica per l'enzim que catalitza aquesta reacció sinó per ALDP, un transportador de tipus "ATP-binding cassette" (ABC) de la membrana peroxisomal, que no presenta cap activitat acil-CoA sintetasa <sup>38</sup>. En conseqüència, es creu que ALDP és la responsable del transport de VLCFAs, de la VLCS o d'algun cofactor necessari per a la seva activació, tal com veurem més endavant.

Els VLCFAs provenen de la dieta i de la síntesi endògena al RE, com hem vist anteriorment. En fibroblastes de pell cultivada de pacients X-ALD s'ha detectat una major activitat del sistema d'elongació <sup>127,128</sup> d'aquests compostos. A més, s'ha vist que l'addició d'àcid oleic (C18:1 $\omega$ 9) en cultius de fibroblastes de pacients X-ALD redueix els nivells de C26:0, degut a la competència que s'estableix entre els compostos saturats i els  $\omega$ 9-MUFAs pel mateix sistema d'elongació <sup>129</sup>. Aquests fets indiquen que

la síntesi de VLCFAs podria contribuir a l'acumulació final d'aquests compostos en la X-ALD.

#### **2.1.4.1. Patogènesi de la forma cerebral de la malaltia.**

Les lesions de la forma cerebral de la X-ALD comparteixen certes característiques amb les de l'esclerosi múltiple. En ambdós casos hi ha una desmielinització, una acumulació d'esters de colesterol i una resposta perivascular inflamatòria. En l'esclerosi múltiple, els infiltrats inflamatoris es troben localitzats a la zona activa de la desmielinització, suggerint una possible implicació directa en aquest procés. En X-ALD, en canvi, apareixen darrera d'aquesta, com si arribessin en resposta a un procés de desmielinització primari <sup>95</sup>.

El mecanisme de patogènesi podria ser iniciat per l'acumulació de VLCFAs en certes espècies lipídiques del cervell. En estudis calorimètrics s'ha posat de manifest que l'excés de C26:0 produeix alteracions en l'estructura de la membrana cel·lular <sup>130</sup>. En rates s'ha observat que el procés de mielinització es veu sèriament afectat per l'administració de C26:0 durant les primeres setmanes de vida <sup>131</sup>. Tot sembla indicar que l'acumulació de VLCFAs al cervell donaria lloc a un procés de desmielinització i de pèrdua d'oligodendrocits, que acabaria desencadenant una resposta neuroinflamatòria amb producció de citoquines per part dels astrocits i de la microglia <sup>110</sup>.

Els màxims increments de VLCFAs en cervell de pacients X-ALD s'han detectat a les fraccions de gangliòsids, d'esters de colesterol <sup>89</sup>, de fosfatidilcolina <sup>132</sup> i de proteolípid <sup>133</sup>. Estudis bioquímics a partir de zones cerebrals sanes d'un pacient afectat demostren que únicament la fracció de fosfatidilcolina presenta un increment significatiu de VLCFAs <sup>132</sup>. D'aquests resultats es desprèn que l'excés d'aquests compostos en la fosfatidilcolina podria originar el procés de desmielinització característic d'aquesta patologia cerebral, mentre que la seva acumulació en altres fraccions com la d'esters de colesterol en seria més aviat una conseqüència.

##### **2.1.4.1.1. La resposta inflamatòria**

Tal com s'ha introduït anteriorment, la resposta inflamatòria és una característica distintiva de les formes cerebrals de la malaltia respecte als altres fenotips clínics. Aquesta diferència fenotípica podria estar marcada per un gen modificador que actués modulant la intensitat de la resposta inflamatòria. L'esclerosi múltiple, per exemple, ha estat associada a alguns haplotips dels gens que codifiquen pels antigens leucocitaris (HLA) de classe II. En el cas de la X-ALD no s'ha pogut

establir cap correlació significativa entre aquests haplotips i la forma CCALD de la malaltia <sup>134</sup>. L'únic que s'ha demostrat és un lligament genètic entre la X-ALD, sense distinció de fenotips, i l'al·lel DRB1\*16 dels gens HLA de classe II <sup>135</sup>.

La resposta inflamatòria en X-ALD està mediada pels astrocits, la microglia i els macròfags. Les cèl·lules infiltrades en les lesions cerebrals són, majoritàriament, limfòcits T (59%), seguit de limfòcits B (24%) i de monocits/macròfags (11%) <sup>136</sup>. En cervell post-mortem de pacients X-ALD s'ha detectat l'expressió de Factor de Necrosi Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor  $\alpha$ ) per part dels macròfags i dels astrocits que es troben a les zones actives de desmielinització <sup>96</sup>. L'expressió d'aquesta i d'altres citoquines a nivell d'ARN missatger s'ha trobat incrementada en les zones cerebrals afectades dels pacients en comparació a les sanes <sup>137</sup>.

En certs desordres on hi ha implicada una resposta immune, s'ha pogut observar una correlació entre l'increment dels nivells de TNF- $\alpha$  a sèrum i el grau de severitat de la malaltia <sup>138</sup>. Seguint aquest mateix exemple per a la X-ALD, s'ha detectat un augment de la bioactivitat de TNF- $\alpha$  a sèrum de pacients amb CCALD en fase avançada. Per contra, la resta de fenotips clínics analitzats, incluint la dels estadis temprans de la CCALD, es mantenia a uns nivells similars als controls. L'origen d'aquesta diferència, però, no ha pogut ser explicada ni pels nivells de receptors solubles de TNF- $\alpha$  a sèrum ni per les diferències al·lèliques detectades en el gen que codifica per TNF- $\alpha$  en aquests pacients <sup>139</sup>.

El mecanisme exacte que desencadena la resposta inflamatòria en les formes cerebrals de X-ALD roman encara desconegut. Fins ara s'han indicat dues possibilitats:

- 1) A través de PKC (Protein Kinase C), degut al seu paper regulador en la producció de mediadors inflamatoris (demostrat en cultius de cèl·lules glials de rata estimulades <sup>140-143</sup>). S'ha vist que els àcids grassos poden afectar els mecanismes de translocació de PKC $\gamma$  i PKC $\varepsilon$  <sup>144</sup>, fet que podria afectar la seva funció reguladora en la producció dels mediadors inflamatoris. En suport a això, s'ha trobat una distribució subcel·lular alterada de les PKC  $\alpha$ ,  $\gamma$ , i  $\varepsilon$  en fibroblastes estimulats de pacients <sup>145</sup>.
- 2) A través d'un increment de l'estrés oxidatiu. En cèl·lules glials de rata s'ha vist que l'addició de C26:0 amplifica l'efecte de certs compostos inductors

d'estrés oxidatiu, augmentant de forma significativa la producció de radicals lliures respecte de les cèl.lules no tractades amb C26:0 <sup>146</sup>.

En relació a aquest darrer punt, un estudi recent ha posat en evidència un augment de l'estrés oxidatiu en pacients afectats per X-ALD <sup>147</sup>. Els resultats obtinguts en plasma a través de diverses tècniques indiquen que existeix una inducció de la peroxidació lipídica. Per altra banda, també mostren que hi ha una certa incapacitat per eliminar un increment d'espècies reactives. A més, s'ha detectat un augment de les activitats catalasa i superòxid dismutasa en fibroblastes de pell cultivada, mentre que l'activitat glutatone dismutasa s'ha trobat disminuïda a eritròcits. L'estrés oxidatiu ha estat implicat en el mecanisme fisiopatològic d'altres desordres neurodegeneratius com la malaltia d'Alzheimer o l'esclerosi múltiple, fet pel qual podria contribuir de forma similar en el de la X-ALD <sup>148-150</sup>.

De forma paral.lela, les citoquines produïdes a través de la resposta inflamatòria podrien contribuir a augmentar encara més el dany cerebral. Per una banda, s'ha demostrat que TNF- $\alpha$  incrementa la permeabilitat de les cèl.lules endotel.lials capilars del cervell <sup>151</sup> i que promou l'apoptosi de diferents tipus cel.lular, inclosos els oligodendrocits <sup>152</sup>. Per altra banda, s'ha comprovat que les citoquines augmenten els nivells de VLCFAs. Els mecanismes pels quals es produeix aquest efecte depenen del tipus cel.lular:

- 1) En cèl.lules glials de rata, el tractament amb citoquines indueix la producció d'òxid nítric. Aquest augment d'òxid nítric va associat a una disminució de la  $\beta$ -oxidació peroxisomal, la qual cosa resulta en un increment de VLCFAs <sup>153</sup>.
- 2) En cultius d'oligodendrocits indiferenciats, el tractament amb citoquines també condueix a una reducció de la  $\beta$ -oxidació de VLCFAs, però aquest efecte no està mediat per la producció d'òxid nítric degut a la incapacitat que tenen els oligodendrocits per sintetitzar-ne <sup>154,155</sup>. En aquest tipus cel.lular, el tractament amb TNF- $\alpha$  provoca una disminució de l'expressió de PPAR $\delta$ , que va acompanyada per una reducció de l'activitat VLCS. Aquest fet resulta en una disminució de la  $\beta$ -oxidació peroxisomal de VLCFAs i el conseqüent increment d'aquests compostos <sup>156</sup>.

L'augment de VLCFAs que es deriva d'aquestes situacions suposaria una magnificació dels efectes primaris causats pel defecte en el gen *ALD (ABCD1)* i, per tant, podria contribuir a empitjorar la situació de les zones cerebrals afectades.

#### **2.1.4.2. Patogènesi de l'Adrenomieloneuropatia (AMN)**

La principal lesió neuropatològica d'aquesta forma clínica consisteix en una degeneració dels tractes llargs ascendents i descendents de la medulla espinal, en particular dels tractes gràcils i corticoespinals laterals <sup>157</sup>. La màxima pèrdua de fibres es dona a la part alta de la regió cervical i a la regió lumbar. Aquesta degeneració implica tant els axons com les capes de mielina que els envolten, mentre que la matèria grisa no es veu alterada. Les fibres de gran diàmetre són les més susceptibles de veure's afectades. Les anomalies s'observen primerament a la perifèria de la fibra. Aquestes es desenvolupen en una atròfia i posterior desaparició de la fibra sencera. De tota manera cal destacar que no hi ha una pèrdua neuronal, fet que la classifica com a una axonopatia.

En aquestes lesions medul·lars no s'hi han detectat ni limfocits ni altres cèl·lules plasmàtiques infiltrades. Això és motiu per considerar que no hi ha resposta inflamatòria, tot i que s'hi hagi observat nombrosa microglia així com macròfags activats capaços de produir TNF- $\alpha$  i altres citokines <sup>157</sup>. Cal destacar però que no hi ha una presència d'astrocits activats i que les concentracions immuno-detectables de citokines són mínimes, fets que donen suport a l'absència de resposta inflamatòria.

En els nervis perifèrics també s'observen anomalies que afecten tant l'axó com la mielina. Tenint en compte que les fibres afectades en els nervis perifèrics i en els tractes gràcils tenen el seu origen en els mateixos cossos neuronals, s'espera que les lesions siguin similars. En conseqüència, també es produeix una pèrdua de fibres mielinitzades, preferentment de les de gran diàmetre, sense cap resposta inflamatòria associada. En un estudi histològic realitzat en dos pacients AMN s'observen capes de mielina més gruixudes al voltant de certs axons i protuberàncies de material mielínic que s'extenen des de les capes més internes vers l'axó <sup>157</sup>. Algunes cèl·lules de Schwann poden presentar inclusions citoplasmàtiques. Aquestes cèl·lules s'han trobat sempre associades a fibres intactes tant a nivell d'axó com de mielina. En un estudi electrofisiològic d'un gran nombre de pacients AMN s'arribà a la conclusió que aquesta neuropatia perifèrica és producte d'una degeneració axonal primària seguida d'una desmielinització <sup>158</sup>.

Tal com hem comentat anteriorment, un 50% dels pacients AMN desenvolupa una afectació cerebral més o menys severa. En alguns casos hi ha pèrdues confluents de mielina a cervell i, en menys extensió, a cerebel, que no van acompanyades de cap resposta inflamatòria. En d'altres es desenvolupen lesions desmielinitzants inflamatòries semblants a les observades en CCALD, que causen la mort del pacient al cap de pocs anys del seu inici. De tota manera, es pensa que en tots els pacients AMN existeixen petits nuclis cerebrals de desmielinització amb microglia activada <sup>157</sup>.

S'especula que la incorporació de VLCFAs en les membranes dels axons, en especial en la fracció dels gangliòsids, resulta en una incapacitat a respondre a factors neurotròfics, que són necessaris per al desenvolupament i manteniment de la seva funció <sup>157</sup>. En suport a això s'ha vist que el gangliòsid GT1b, que presenta els majors increments de VLCFAs (>50%) en X-ALD, sembla estar restringit a la membrana dels axons.

#### **2.1.4.3. Patogènesi de la glàndula adrenal**

Com hem dit anteriorment, un bon percentatge de pacients afectats per X-ALD sofreixen una insuficiència adrenocortical primària. La seva primera manifestació és a través d'un increment dels nivells d'ACTH a plasma <sup>159</sup>. A nivell histològic, les cèl.lules adrenocorticals afectades presenten estriacions citoplasmàtiques birrefringents amb lamel·les i cristalls, que són precipitats de colesterol esterificat amb VLCFAs. A mida que la malaltia avança, l'atròfia cel·lular es fa més palesa <sup>160</sup>.

Es creu que l'excés de VLCFAs en la malaltia X-ALD podria alterar l'estructura de la membrana plasmàtica de les cèl.lules adrenocorticals i afectar la disponibilitat i funció dels receptors d'ACTH, donant lloc a la patologia observada en aquesta glàndula. De fet, en pacients s'ha observat que l'excés d'aquests compostos augmenta la microviscositat de la membrana eritrocitària <sup>161</sup>. A més, en experiments amb cultius de cèl.lules adrenocorticals humanes s'ha pogut comprovar que l'addició de C24:0 o de C26:0 incrementa la microviscositat membranar i disminueix la capacitat de secreció de cortisol sota l'estímul d'ACTH <sup>162</sup>.

Els VLCFAs s'acumulen principalment en forma d'esters de colesterol a la glàndula adrenal. L'enzim amb activitat esterasa que catalitza aquesta reacció presenta una activitat molt més elevada en comparació a la de l'enzim responsable de la hidròlisi dels esters de colesterol que contenen C26:0 <sup>163</sup>, la qual cosa afavoreix, de forma addicional, la seva acumulació. A més, és important destacar que el ritme

---

d'hidròlisi dels esters de colesterol que contenen C26:0 és mil vegades menor que el dels que contenen àcid oleic (C18:1 $\omega$ 9), indicant la seva ínfima participació en la formació d'hormones esteroidees.



## 2.2. ASPECTES MOLECULARS

L'acumulació de VLCFAs observada en tots els teixits i fluïds corporals dels pacients X-ALD és deguda a un defecte en la seva activació a esters de CoA, que és la primera etapa del seu procés de  $\beta$ -oxidació al peroxisoma. Tot i així, com veurem tot seguit, el gen responsable de la malaltia no codifica per aquest enzim sinó per una proteïna de la membrana peroxisomal anomenada ALDP.

### 2.2.1. GENÈTICA

El locus ALD es troba situat al braç llarg del cromosoma X i, més concretament, a la regió Xq28<sup>164</sup>. El gen *ALD* (*ABCD1*) va ser identificat per l'equip del Pr. Mandel mitjançant estratègies de clonació posicional<sup>165</sup>. Addicionalment es va determinar que la seva posició era molt propera a la del gen d'expressió ubíquota *DXS1357E*<sup>166</sup>. Aquests dos gens estan orientats en direccions oposades i els seus extrems 5' estan separats per menys de 460 parells de bases.

El gen *ABCD1* ocupa, aproximadament, 20Kb d'ADN genòmic i conté 10 exons<sup>167</sup>. Totes les unions exó-intró compleixen la seqüència consens pels gens eucariotes. La regió promotora és una zona molt rica en GC (78%) i conté unes 13 dianes per al factor de transcripció Sp1. Per contra no s'hi han trobat ni elements promotors (caixes TATA i CAAT) ni elements de resposta a la proliferació peroxisomal. Aquest gen codifica per un ARN missatger de 4.2 Kb que dona lloc a una proteïna de 75 KDa, anomenada ALDP. Gràcies a estudis d'homologia de seqüència s'ha vist que la proteïna ALDP, de 745 aminoàcids, pertany a la gran família de transportadors ABC.

També s'ha determinat l'existència d'un pseudo-gen parcial de 9.7Kb que inclou la seqüència dels quatre últims exons del gen *ABCD1*, amb una identitat al voltant del 94% de l'original<sup>168</sup>. Aquest pseudo-gen es troba duplicat en regions pericentromèriques específiques de diferents cromosomes, entre les quals s'inclouen 2p11, 10p11, 16p11, 22q11<sup>169</sup>.

La implicació del gen *ABCD1* en la malaltia X-ALD ha estat primerament confirmada a través d'estudis mutacionals en pacients. Per altra banda, en estudis de complementació en fibroblasts de pell cultivada de pacients, s'ha demostrat que l'expressió de cADN (ADN complementari) del gen *ABCD1* corregeix la deficiència en

la  $\beta$ -oxidació de VLCFAs<sup>170-172</sup>, i que la seva expressió estable normalitza els nivells d'aquests compostos<sup>171</sup>.

Pel que fa als estudis mutacionals realitzats, hi ha una base de dades creada per l'"Academic Medical Center" (AMC) de la Universitat d'Amsterdam, als Països Baixos, on es recullen periòdicament les mutacions detectades a nivell mundial en els pacients afectats per aquesta malaltia, i que es pot consultar a través de la pàgina web <http://www.x-ald.nl>. En el moment en què aquest manuscrit era redactat hi havia 683 mutacions registrades, de les quals més de la meitat són de canvi de sentit (per a més informació sobre la naturalesa de les mutacions, veure la taula 1.2). Pel que fa a la seva distribució, aquestes es troben repartides al llarg de tot el gen (a mode d'il·lustració, veure la taula 1.3).

És important mencionar que del total de mutacions detectades fins a l'actualitat, un 52% són úniques i específiques per a una sola família (dades exemplificades a la taula 1.2). La mutació recurrent més freqüent ha estat descrita en un 8.4% de les famílies afectades. Aquesta correspon a una deleció de dos parells de bases (AG) en la posició 1801-1802, situada en l'exó 5 del gen *ABCD1*, que provoca un desplaçament de la pauta de lectura. L'alt percentatge de mutacions no recurrents ha fet impossible l'establiment d'una correlació genotip-fenotip. Una mateixa mutació pot estar relacionada amb tots els fenotips coneguts. Inclús dins d'una mateixa família hi pot haver pacients amb diferent fenotip clínic.

La manca general de correlacions suggereix la implicació de factors addicionals en la generació dels diferents fenotips observats<sup>103,173</sup>. Algunes anàlisis de segregació, realitzades a partir de més de 3800 pacients procedents de 89 famílies diferents, suggereixen l'existència d'un gen modificador autosòmic<sup>99</sup>, el qual podria actuar modulant la intensitat de la resposta inflamatòria. De tota manera, no es pot descartar la participació de factors ambientals en la variabilitat fenotípica observada, tal com es desprèn del cas d'una parella de bessons univitel·lins en la qual un d'ells romaní asimptomàtic un any després que el seu germà hagués començat a desenvolupar la CCALD<sup>174</sup>. Tot i així cal esperar nous informes sobre l'avaluació d'aquest cas per tal de determinar la importància d'aquests darrers factors.

Recentment s'ha descrit una nova malaltia anomenada "Síndrome de deleció contígua dels gens *ALD* i *DXS1357E*"<sup>175</sup>, on els pacients presenten delecions que s'extenen des del promotor del gen *ABCD1* fins al gen contigu *DXS1357E*. Els tres

	Total de mutacions detectades		Mutacions no recurrents	
	N	%	N	%
Mutacions de canvi de sentit (missense)	407	60%	186	52%
Mutacions de desplaçament de la pauta de lectura (frameshift)	153	22%	90	25%
Mutacions sense sentit (nonsense)	68	10%	42	12%
Insercions/deleccions d'aminoàcids (in frame)	30	4%	24	7%
Grans deleccions	25	4%	14	4%
<b>TOTAL</b>	<b>683</b>		<b>356</b>	<b>52%</b>

**TAULA 1.2.** Classificació de mutacions causatives d'acord a la seva natura

Exó	Aminoàcids	N	Percentatge
Exó 1a	(1-100)	39	6%
Exó 1b	(75-188)	118	18%
Exó 1c	(177-300)	128	20%
Exó 2	(301-361)	20	3%
Exons 3 i 4	(361-465)	50	8%
Exó 5	(465-496)	63	10%
Exó 6	(497-545)	65	10%
Exó 7	(545-594)	53	8%
Exons 8 i 9	(594-664)	100	15%
Exó 10	(664-745)	11	2%

**TAULA 1.3.** Distribució de les mutacions al llarg del gen *ABCD1*

pacients identificats fins a l'actualitat, tots ells de sexe masculí, presentaven una clínica distinta i d'aparició molt més temprana que la X-ALD. Els trets principals d'aquesta clínica incloïen colestasi neonatal, hipotonia i retard en el desenvolupament. Per contra, l'única anormalitat bioquímica detectada eren uns nivells plasmàtics elevats de VLCFAs, com en la X-ALD. En tots els casos, la mort del pacient es produí abans d'arribar a l'any de vida. La clau que va permetre associar aquesta malaltia amb el gen *ABCD1* foren les anàlisis immunocitoquímiques realitzades en fibroblastes de pell cultivada. En elles es mostrà l'existència de peroxisomes amb morfologia normal però amb una manca total de proteïna ALDP a la seva membrana.

### 2.2.1.1. La proteïna ALDP

La proteïna ALDP (*ABCD1*) és un transportador ABC que es troba localitzat a la membrana peroxisomal <sup>176,177</sup>. Tot i que en fibroblastes procedents de pacients X-ALD s'ha detectat un defecte en l'activació de VLCFAs, la proteïna ALDP no té homologia amb cap VLCS coneguda <sup>178</sup> i no presenta una activitat demostrable d'aquest tipus <sup>38</sup>. La seva funció roman encara desconeguda, però, en base a la seva estructura de transportador, es creu que està implicada en l'import de VLCFAs, de la VLCS, o d'algun cofactor necessari per a l'activació d'aquest enzim. En llevats (*S. Cerevisiae*) s'ha demostrat que Pat1p i Pat2p, dos transportadors peroxisomals amb una alta homologia amb ALDP, s'encarreguen de l'import de VLCFAs al peroxisoma <sup>179</sup>. Aquest resultat suggereix amb força que ALDP podria desenvolupar aquesta mateixa funció en mamífers, si bé encara no s'ha pogut demostrar directament. Diversos estudis realitzats en ratolí i fibroblastes humans descarten la implicació d'ALDP en el bon funcionament de l'activitat catalítica de la VLCS <sup>180</sup>, així com en la senyalització i/o import d'aquest enzim al peroxisoma <sup>39,41,180,181</sup>.

El patró d'expressió de la proteïna ALDP ha estat estudiat tant en humans com en ratolins. En ambdues espècies, ALDP és detectada, en baix nivell, en tota l'àmplia varietat de teixits analitzats, essent més abundant en cor, pulmó i intestí que no en teixits diana de X-ALD com és el cervell <sup>165,182</sup>. Pel que fa al sistema nerviós central (SNC), ALDP es troba expressada en astrocits, cèl·lules de la microglia i oligodendrocits, però no en neurones <sup>183,184</sup>. La seva abundància en oligodendrocits és menor que en els altres dos tipus cel·lulars. Ara bé, en certes subpoblacions localitzades a les càpsules internes del corpus callosum i a la comissura anterior, s'han detectat uns nivells d'expressió d'ALDP comparables als observats en astrocits <sup>183</sup>.

Aquestes regions, components de la matèria blanca del cervell, són les primeres en mostrar una degeneració de la mielina.

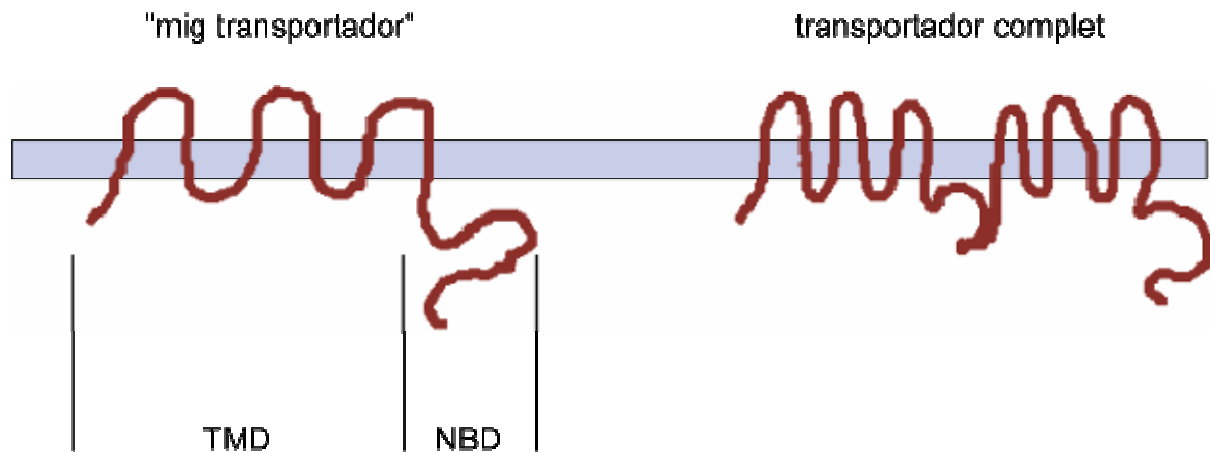
L'estructura d'ALDP correspon a la d'un "mig transportador" ABC, constituït per un domini transmembrana a la meitat N-terminal, i un domini hidrofílic d'unió a l'ATP a la meitat C-terminal, el qual es troba exposat vers el citoplasma <sup>165</sup>. Aquesta proteïna forma part de la subfamília ABCD, que en mamífers està constituïda per un total de 4 proteïnes. Els altres tres membres de la subfamília ABCD s'anomenen ALDRP <sup>185</sup>, PMP70 <sup>186</sup> i PMP69 (o PMP70R) <sup>187</sup> i mostren, respectivament, un 66%, 38% i 27% d'identitat a nivell d'aminoàcid amb ALDP <sup>188</sup>. Aquesta alta homologia seria indicativa d'una possible redundància a nivell funcional entre els quatre transportadors, la qual cosa suscita un especial interès en el camp terapèutic de la malaltia X-ALD. És per això que aquesta subfamília proteica ha estat objecte de nombrosos estudis. Aquests seran revisats en l'apartat següent, després de veure les principals característiques de la gran família de transportadors ABC.

#### 2.2.1.1.1. Els transportadors de tipus "ATP-binding cassette"

Els transportadors ABC són proteïnes transmembranals que es dediquen al transport d'una gran varietat de compostos: aminoàcids, lípids, lipopolisacàrids, ions inorgànics, pèptids, sacàrids, metalls, drogues i proteïnes <sup>189</sup>. Aquest transport es fa contra gradient de concentració i gràcies a l'energia derivada de la hidròlisi de l'ATP. Per altra banda, alguns d'ells no transporten substractes directament, sinó que es troben associats a canals iònics i implicats en la seva regulació, com és el cas del regulador transmembranal de la fibrosi quística (CFTR: cystic fibrosis transmembrane regulator). La hidròlisi de l'ATP, en aquests casos, té la finalitat de controlar l'obertura i el tancament del canal iònic a través de canvis estructurals.

L'estructura típica d'un transportador funcional inclou 2 dominis transmembrana (TMD: transmembrane domain) i dos dominis d'unió a l'ATP (NBD: nucleotide-binding domain). Hi ha gens que codifiquen per proteïnes que inclouen els quatre dominis, donant lloc als anomenats "transportadors complets", mentre que d'altres codifiquen per proteïnes que contenen un sol TMD i un sol NBD, les quals són conegudes com a "mig transportadors" (veure figura 1.8). Aquests "mig transportadors" han de formar dímers entre ells, ja sigui homodímers o heterodímers, per tal de ser funcionals <sup>190</sup>.

Pel què fa als dominis d'aquestes proteïnes, els NBD són hidrofílics i estan molt conservats, mostrant una identitat a nivell d'aminoàcid que varia entre el 30% i el 50%



**FIGURA 1.8.** Els transportadors de tipus "ATP-binding cassette" (TMD= transmembrane domain; NBD= nucleotide-binding domain).

Malaltia	Transportador	Referències
Fibrosi quística	ABCC7 (CFTR)	(191)
Malaltia de Stargardt i Degeneració macular relacionada amb l'edat	ABCA4 (ABCR)	(192)
Malaltia de Tangier i Hipoapoproteinèmia familiar	ABCA1	(193)
Colestasi intrahepàtica progressiva familiar	ABCB11 (SPGP) ABCB4 (MDR2)	(194,195)
Síndrome de Dubin-Johnson	ABCC2 (MRP2)	(196)
Pseudoxantoma elasticum	ABCC6 (MRP6)	(197)
Hipoglicèmia persistent de la infància	ABCC8 (SUR1) ABCC9 (SUR2)	(198)
Anèmia sideroblàstica i atàxia	ABCB7	(199)
Adrenoleucodistrofia lligada a l'X	ABCD1 (ALDP)	(165)
Sitosterolèmia	ABCG5 ABCG8	(200)
Deficiència immune	ABCB2 (Tap1) ABCB3 (Tap2)	(201)

**TAULA 1.4.** Transportadors ABC relacionats amb malalties humanes

entre els diferents transportadors ABC. Cada NBD presenta una seqüència Walker de tipus A, una seqüència Walker de tipus B i una seqüència molt conservada de 12 aminoàcids intercalada entre les anteriors <sup>189</sup>. Actualment es coneixen set subfamílies diferents de transportadors ABC, designades des de la A a la G, en base al grau d'homologia del seu NBD. Per contra, els TMD no mostren un grau massa elevat de conservació, per la qual cosa es creu que determinen l'especificitat de substracte del transportador.

Els transportadors ABC inclouen les proteïnes de resistència a multidrogues (MRP: Multidrug Resistance Protein), entre les quals hi ha la Glicoproteïna P (també coneguda com a MDR1 o ABCB1). La seva funció consisteix a limitar l'entrada cel·lular de substractes, entre els quals s'hi compten tant xenobiòtics tòxics com nombrosos medicaments. Sota condicions fisiològiques normals, aquestes proteïnes protegeixen a les cèl·lules envers de toxines, mentre que en una situació patològica com el càncer, confereixen una resistència a les cèl·lules malignes contra les substàncies utilitzades amb finalitats terapèutiques. També comporten greus problemes en el tractament de malalties cerebrals, impedit que determinats fàrmacs travessin la barrera hematoencefàlica.

A més, hi ha un gran nombre de malalties causades per mutacions en gens que codifiquen per transportadors ABC <sup>191-200</sup> <sup>201</sup> (veure taula 1.4). Entre les més conegudes destaquen la fibrosi quística i la malaltia de Tangier. La primera està causada per un defecte en el transportador ABCC7 (CFTR), el qual controla la funció transportadora d'un canal d'ions clor que participa en la secreció exocrina. El seu defecte provoca una producció anormal de mucus en diferents parts de l'organisme, però sobretot en els pulmons i altres parts del sistema respiratori <sup>202</sup>. Pel que fa a la malaltia de Tangier, aquesta és deguda a un defecte en el transportador ABCA1, el qual s'encarrega de l'export de colesterol des del citoplasma a la superfície de la membrana, on s'unirà a les apolipoproteïnes per tal de ser conduït al fetge <sup>203</sup>. Els pacients presenten una forta disminució dels nivells plasmàtics de lipoproteïna d'alta densitat (HDL) i una acumulació d'esters de colesterol en macròfags i altres teixits, fet que condueix a una clínica caracteritzada per neuropatia, hepatomegàlia, hipercolesterolèmia i desordres cardiovasculars.

### 2.2.1.1.1. La subfamília de transportadors ABCD

Fins a l'actualitat, la subfamília de transportadors ABCD està constituïda per ALDP (ABCD1), ALDRP (ABCD2), PMP70 (ABCD3) i PMP69 (ABCD4). Les proteïnes ALDRP i PMP70, al igual que ALDP, tenen el seu NBD orientat cap al citoplasma <sup>204,205</sup>. En diversos estudis *in vitro* s'ha demostrat la capacitat d'aquest domini, tant en ALDP com en PMP70, per unir nucleòtids trifosfat, tot i que només la hidròlisi d'ATP ha estat descrita <sup>206-208</sup>.

Donat que la funcionalitat dels transportadors ABCD està lligada a la dimerització, és important la demostració, a través d'estudis de coimmunoprecipitació, de l'homodimerització d'ALDP, així com les heterodimeritzacions d'ALDP amb PMP70 i amb ALDRP, i la d'ALDRP amb PMP70 <sup>209</sup>. A través de la tècnica "yeast two-hybrid system", s'ha mostrat que les dimeritzacions s'estableixen entre els extrems C-terminal d'aquestes proteïnes <sup>209</sup>. També s'ha comprovat que la capacitat de dimerització d'ALDP es veu afectada per mutacions situades en aquesta regió de la proteïna <sup>209</sup>.

Al igual que en el cas d'ALDP, la funció de la resta de transportadors peroxisomals no està aclarida. S'ha indicat la participació de PMP70 en l'import peroxisomal dels acil-CoA derivats de l'àcid pristànic i dels DHCA/THCA <sup>46</sup>, que són  $\beta$ -oxidats en aquest orgànul. La sobreexpressió de PMP70 en cèl.lules d'ovari de hamster xinès augmenta dues vegades la taxa de la  $\beta$ -oxidació peroxisomal de l'àcid palmític, fet que suggereix la implicació d'aquesta proteïna en el transport de LCFAs <sup>210</sup>. La capacitat d'heterodimerització dels transportadors ABCD pot ser important a nivell funcional, ja que a través de diverses combinacions es pot establir l'especificitat de substrate. Aquest és el cas, per exemple, dels "mig transportadors" de *Drosophila melanogaster* coneguts amb els noms d'escarlata, marró i blanc, que són responsables de l'import de guanina i triptòfan <sup>211</sup>, els precursors dels pigments oculars.

El patró d'expressió de cadascun dels transportadors peroxisomals no té massa punts de coincidència amb el dels altres. En ratolí, per exemple, els teixits en què cada transportador mostra la màxima expressió difereixen per cada un d'ells, essent cor, pulmó i intestí en el cas d'ALDP, com hem vist anteriorment, cervell i múscle en el cas d'ALDRP, fetge i ronyó en el de PMP70, i ronyó en el de PMP69 <sup>182</sup>. Pel què fa als teixits diana de la malaltia X-ALD, la distribució d'aquestes proteïnes sembla ser complementària, sobretot en el cas d'ALDP i d'ALDRP. A la glàndula adrenal, l'expressió d'ALDP és exclusiva de les cèl.lules corticals, mentre que la de



d'ALDRP està restringida a les cèl·lules medul·lars. A cervell murí, les dues proteïnes es troben expressades en cèl·lules de la microglia però, en canvi, només ALDRP ho és en neurones i ALDP en cèl·lules endotel·lials<sup>184</sup>. En el cas de PMP70, el seu transcrit ha estat detectat en neurones i cèl·lules glials<sup>212</sup>. Durant el desenvolupament cerebral, ALDP és més abundant en les etapes embrioniques i la seva expressió decreix gradualment durant la maduració. Per contra, ALDRP i PMP69 mostren la seva màxima expressió durant el període postnatal temprà i PMP70 durant un període encara més tardiu<sup>182,212</sup>.

La manca de coordinació en l'expressió dels transportadors peroxisomals exclou, per tant, l'heterodimerització en determinats casos. L'única dada *in vivo* disponible en l'actualitat referent a aquest punt correspon al fetge de ratolí, on s'ha observat que PMP70 i ALDP formen majoritàriament homodímers<sup>213</sup>. Per altra banda, els patrons complementaris de distribució en alguns teixits, sobretot en el cas d'ALDP i d'ALDRP, són indicatius d'una certa redundància funcional entre aquestes proteïnes. De fet, s'ha demostrat que la sobreexpressió d'ALDRP o de PMP70 pot corregir de manera parcial, o inclús total, el defecte de  $\beta$ -oxidació observat en fibroblastes de pacients X-ALD<sup>172,214-216</sup>. Aquesta és la base d'una de recerca terapèutica important que es detallarà a la propera secció.

## 2.3. ASPECTES TERAPÈUTICS

### 2.3.1. L'OLI DE LORENZO

Aquesta teràpia està basada en el fet que l'addició d'àcid oleic (C18:1 $\omega$ 9) en cultius de fibroblastes de pell cultivada de pacients X-ALD redueix els nivells de C26:0<sup>129</sup>. Després d'aquesta observació es va començar a administrar oli ric en àcid oleic (GTO: glyceril trioleate oil) en alguns pacients, sempre en combinació amb una dieta restringida en C26:0<sup>217,218</sup>. Aquest règim alimentari donava lloc a una reducció del 50% dels nivells plasmàtics de VLCFAs.

Degut al fet que l'enzim responsable de l'elongació de C22:0 i C22:1 $\omega$ 9 és el mateix<sup>11</sup>, es va pensar que l'administració d'àcid erúic (C22:1 $\omega$ 9) podria disminuir la producció de C26:0 a través d'una competició directa amb el C22:0 per a la maquinària de síntesi. Així doncs, la recepta inicial fou substituïda per una barreja d'oli ric en àcid oleic (GTO) i oli ric en àcid erúic (GTE: glyceril trierucate oil) en la proporció de 4:1. Aquesta és coneguda com a oli de Lorenzo en referència als pares d'aquest pacient, els quals aportaren la idea d'aquesta modificació. La seva administració va passar a normalitzar els nivells plasmàtics de C26:0 en la majoria de pacients<sup>219</sup>.

De tota manera, aquest tractament no té efecte en la progressió de la forma cerebral de la malaltia<sup>220,221</sup>, probablement degut a la incapacitat de l'àcid erúic per creuar la barrera hemato-encefàlica<sup>222,223</sup>. Alguns resultats apunten que aquest règim podria retardar l'aparició de símptomes neurològics en pacients asimptomàtics<sup>224</sup>. Actualment està en curs un assaig clínic realitzat amb doble control cec i coordinat pel Dr. Moser, amb la finalitat de veure si aquesta teràpia té algun efecte beneficiós per a aquests pacients i/o pels AMN.

### 2.3.2. TRANSPLANTAMENT DE MOLL D'ÒS

Aquesta és l'única teràpia efectiva que existeix actualment per a la malaltia X-ALD. Després de més de deu anys d'aplicació, s'han descrit els seus efectes positius a curt termini<sup>97,225</sup> i també a llarg termini<sup>226,227</sup>, sempre i quan s'apliqui en fases tempranes de la malaltia. Els candidats per a aquest tractament són, de forma concreta, pacients amb CCALD en estadis inicials i de progressió lenta. Per contra, no és aconsellat pels pacients amb CCALD en fase avançada o en ràpida progressió, ja que no poden suportar les conseqüències associades a l'estrés del procediment. Degut a la perillositat d'aquesta intervenció, amb un risc de mortalitat del 30%, s'ha desaconsellat la seva aplicació en els pacients asimptomàtics amb un IRM normal, ja

que aquests tenen una probabilitat superior al 50% de no desenvolupar la forma severa de la malaltia. Tampoc s'aplica als pacients AMN, ja que de moment no s'ha demostrat que aquesta teràpia sigui beneficiosa. L'elecció dels candidats es basa, per tant, en l'avaluació del grau d'afectació cerebral en pacients CCALD a través de IRM i de testos neuropsicològics <sup>225</sup>. Per això és important la monitorització dels pacients asimptomàtics en intervals de 6 mesos a 1 any, per tal de poder detectar el més aviat possible un inici d'afectació cerebral.

El seguiment dels pacients tractats mostra una estabilització de les llesions desmielinitzants detectades en IRM al cap de 2 anys del transplantament. En un 50% d'ells també es produeix una estabilització o inclús una millora de les funcions cognitives, donant lloc a una qualitat de vida raonable. La supervivència dels pacients CCALD sotmesos a aquest tractament es situa al voltant del 60%, mentre que per als no tractats és del 40% i sense possibilitats de superar la franja de 15 anys de vida <sup>110</sup>. Les causes principals de defunció per als pacients transplantats s'han d'atribuir al risc en si del procediment i a la progressió de la malaltia cerebral, la qual es pot accelerar en qualsevol moment del llarg procés terapèutic.

El mecanisme pel qual s'aconsegueixen els efectes beneficiosos es creu que està basat en la renovació de la microglia endògena per microglia derivada de les cèl.lules hematopoiètiques indiferenciades del donador. Aquesta nova microglia seria capaç de metabolitzar els VLCFAs i reduir-ne els nivells, interrompent d'aquesta manera la reacció en cascada que condueix a la desmielinització. Els pacients tractats mostren uns nivells plasmàtics de C26:0 disminuïts però no completament normalitzats <sup>226</sup>. Recentment s'ha realitzat un transplantament de moll d'òs en el ratolí "knockout" per *ald (abcd1)* <sup>228</sup>, en el qual es demostra que les cèl.lules del donador arriben a diferents òrgans, incluint el cervell, i que això disminueix els nivells de VLCFAs.

### 2.3.3. TERÀPIA GÈNICA

L'eficàcia del transplantament de moll d'òs està limitada per la disponibilitat de donadors compatibles amb el pacient. Bona part dels problemes associats a aquest procediment es podrien solventar amb la introducció del gen *ABCD1* en cèl.lules hematopoiètiques indiferenciades (HSC: hematopoietic stem cells) procedents del mateix pacient. Aquestes HSC podrien ser obtingudes a través de la purificació de la fracció CD34+ del moll d'òs o de la sang perifèrica després d'una estimulació amb citoquines.

S'ha demostrat, *in vitro*, la correcció d'un 15-20% de cèl.lules CD34+ procedents de pacients X-ALD després de la transducció del cADN d'*ABCD1* a través d'un vector retroviral murí <sup>229</sup>. Degut a la incapacitat d'aquests vectors per transduir cèl.lules que no estiguin en fase de divisió, la transducció de HSC a través d'aquests requereix l'ús d'una alta concentració de citoquines, per la qual cosa aquestes cèl.lules entren en diferenciació i es perd l'expressió del gen *ABCD1* al llarg del temps <sup>230</sup>. A més, no hi ha cap avantatge selectiu per a les HSC normals o transduïdes, fet que limita l'èxit terapèutic d'aquesta estratègia. Per contra, els vectors derivats del virus de l'immunodeficiència humana podrien solventar aquest problema, ja que són capaços de transduir cel.lules que no estiguin en fase de divisió <sup>231</sup>. L'ús d'aquests vectors en la transducció del cADN d'*ABCD1* en cèl.lules CD34+ de pacients ha donat bons resultats tant *in vitro* com *in vivo* <sup>232</sup>.

Tal com hem vist anteriorment, un 20% dels pacients X-ALD mostren una expressió de la proteïna ALDP mitjançant mètodes immunològics en fibroblastes de pell cultivada. En aquest cas s'ha vist que la sobreexpressió d'*ABCD1* és menys efectiva a l'hora de normalitzar la  $\beta$ -oxidació i els nivells de VLCFAs que en els pacients on hi ha una proteïna truncada i inestable que no és detectable immunològicament <sup>233</sup>. Aquests resultats suggereixen una possible competició entre la proteïna endògena defectuosa i la que s'expressa a partir del cADN introduït, la qual cosa podria dificultar la teràpia gènica en aquest 20% dels pacients. Així doncs, tot i l'existència de resultats molt encoratjadors, encara resta un llarg camí per arribar a una forma efectiva de teràpia gènica.

#### 2.3.4. FARMACOTERÀPIA

Malgrat els esforços dedicats a la recerca de substàncies amb algun poder terapèutic sobre la X-ALD, no hi ha hagut massa èxit amb els resultats. Un dels compostos més prometedors ha estat la lovastatina. Aquest és un inhibidor de l'activitat enzimàtica 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa, la qual exerceix un punt de control sobre la síntesi del colesterol. La lovastatina ha estat utilitzada pel tractament de certes formes d'hipercolesterolèmia tant en adults com en infants <sup>234-236</sup>. En un estudi *in vitro*, s'ha vist que aquest compost és capaç de bloquejar la inducció de citoquines proinflamàtores en astrocits, microglia i macròfags <sup>237</sup>. La seva administració en pacients X-ALD corregeix els nivells plasmàtics de VLCFAs <sup>238</sup>. Malauradament, però, no produeix cap altre efecte addicional de millora de la clínica <sup>239</sup>. Finalment s'ha vist que el seu efecte en els nivells de VLCFAs és resultat,

probablement, de la seva acció en la síntesi de colesterol i no en el metabolisme d'aquests compostos <sup>240</sup>.

Un altre dels compostos estudiats ha estat el Rolipram, el qual s'ha utilitzat amb èxit com a anti-depressiu <sup>241</sup>. Aquest és un inhibidor específic de la fosfodiesterasa de tipus IV, que incrementa els nivells d'AMP cíclic tot disminuint el seu catabolisme. Inicialment es va observar que aquest compost incrementava la taxa de  $\beta$ -oxidació peroxisomal en fibroblastes de pacients, conduint a una reducció dels nivells de VLCFAs. De tota manera, aquests resultats no han pogut ser reproduïts posteriorment <sup>242</sup>.

#### 2.3.4.1. Farmacogenètica

Una teràpia efectiva per algunes malalties es basa en incrementar, mitjançant l'acció de fàrmacs, l'expressió d'un gen endogen que mostri un cert grau de redundància funcional amb el gen defectiu causant de la patologia. Una estratègia d'aquest tipus ha estat aplicada amb èxit en la distròfia muscular de Duchenne <sup>243</sup>. És una bona alternativa a la teràpia gènica, ja que s'eviten algunes dificultats majors com són la direcció de la còpia del gen defectiu als teixits adequats o la immunovigilància dels teixits que expressen el nou transgen.

El gen *ABCD2*, que codifica per ALDRP, és un bon candidat per al desenvolupament d'estratègies farmacogenètiques similars i destinades a la teràpia de la X-ALD. La sobreexpressió d'*ABCD2* corregeix l'acumulació de VLCFAs a fibroblastes de pacients X-ALD <sup>214-216</sup>, fet indicatiu d'un cert grau de solapament funcional entre ALDP i ALDRP. En ratolí s'ha demostrat que l'expressió d'aquest gen pot ser induïda a través del fenofibrat. Aquest compost també pot incrementar l'expressió del gen *abcd3* (*pmp70*) però, en canvi, no té efecte sobre la de *abcd1* (*ald*) ni la de *abcd4* (*pmp69*) <sup>182,244</sup>. Els fibrats són compostos hipolipidèmics que s'utilitzen en el tractament d'algunes patologies relacionades amb el metabolisme lipídic. També s'ha vist que són lligands de PPAR $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ ). La inducció de l'expressió dels gens codificadors d'ALDRP i de PMP70 és dependent de PPAR $\alpha$  <sup>245</sup> encara que, pel què fa al primer, no s'hagin trobat elements funcionals de resposta per PPAR $\alpha$  <sup>245,246</sup> <sup>247</sup>. En contrapartida, en el promotor humà del gen *ABCD2* s'ha localitzat un element regulador d'esterols per a SREBP-2, a través del qual la seva expressió és induïda *in vitro* en condicions de depleció de colesterol <sup>248</sup>. Com que el fenofibrat és capaç d'induir SREBP-2 i aquesta inducció és dependent de PPAR $\alpha$ ,

s'ha proposat que aquest podria ser el mecanisme pel qual el fenofibrat indueix finalment l'expressió d'*ABCD2*<sup>247</sup>.

El fenofibrat té la capacitat de recuperar la  $\beta$ -oxidació de VLCFAs en fetge de ratolins "knockout" per *ald* (Ald ko)<sup>216</sup>, però no mostra cap efecte al cervell, la qual cosa és desencoratjadora pel tractament de la malaltia. Aquest fet és degut, probablement, a que el fenofibrat és un substracte de la Glicoproteïna P. Aquesta, com hem vist anteriorment, és una proteïna ABC que forma part de la barrera hematoencefàlica i que protegeix el SNC de determinats substractes, entre els quals hi ha nombroses substàncies amb finalitats terapèutiques.

El 4-fenil-butirat (4PBA: 4-phenyl butyrate acid) és un compost d'estructura similar als fibrats que ha estat utilitzat durant anys en el tractament de pacients amb desordres en el cicle de la urea<sup>249</sup>. L'addició d'aquest compost al medi de cultiu de fibroblasts de pacients X-ALD i de fibroblasts del ratolí Ald ko resulta en una normalització dels nivells de VLCFAs. També s'ha vist que l'administració de 4PBA en ratolins Ald ko a través de la dieta corregeix parcialment l'acumulació de C26:0 a cervell i a glàndula adrenal, fet esperançador per al tractament d'aquesta malaltia<sup>214</sup>. Aquest resultat correlaciona amb una inducció de la proteïna ALDRP i amb un increment de la proliferació peroxisomal. Malauradament, però, és impossible de discriminar el grau de contribució de cada un d'aquests factors en la disminució de C26:0, així com la implicació d'altres efectes pleiotròpics causats pel 4PBA. Així doncs, encara manca una prova de la capacitat de la sobreexpressió d'*aldr* per corregir, per si sola, els nivells de C26:0 *in vivo* (veure l'objectiu 1 d'aquesta tesi).

En estudis més recents s'ha vist que la inducció de la  $\beta$ -oxidació peroxisomal de VLCFAs, en fibroblastes de pell cultivada, a través de 4PBA i d'anàlegs estructurals està associada a una inducció de la  $\beta$ -oxidació mitocondrial de LCFAs. A més s'ha demostrat que també és possible incrementar la  $\beta$ -oxidació peroxisomal a través d'anàlegs funcionals de 4PBA que no tenen cap efecte sobre l'expressió d'ALDR, com és el cas de la tricostatina A. Aquest compost és un inhibidor específic de la desacetilasa d'histones en mamífers, i obre noves perspectives cap a la investigació del mecanisme i tractament de la X-ALD<sup>240</sup>.

## 2.4. MODEL MURÍ DE LA X-ALD

El ratolí “knockout” per *ald* (Ald ko) fou generat l’any 1997 en tres laboratoris diferents mitjançant la interrupció del gen *abcd1* a través de la inserció d’una “cassette” de resistència a la neomicina. Posteriorment, la construcció fou introduïda en el genoma murí per intercanvi de marcadors (mètode clàssic de recombinació homòloga)<sup>250-252</sup>. Aquest ratolí mostra una deficiència de la proteïna ALDP en tots els teixits analitzats.

Als 50 dies, el ratolí Ald ko ja presenta un augment de les relacions C24:0/C22:0, C25:0/C22:0 i C26:0/C22:0, essent aquesta última la més elevada, a SNC, pulmó i ronyó<sup>252</sup>. Als 3 mesos, els majors acúmul detectats són de C26:0. Els increments d’aquest compost respecte del ratolí salvatge (Wt: wild-type) són de 5 vegades a cervell i d’entre 2 i 4 vegades en diversos teixits extraneurals. En la fracció d’esters de colesterol de la glàndula adrenal del ratolí Ald ko s’ha detectat un increment de C26:0 (x10 vegades) i de C24:0 (x5 vegades) respecte el Wt. En canvi, no s’han trobat diferències en la que procedeix de cervell<sup>251</sup>. Tampoc no s’han trobat alteracions en els nivells de C26:0, C24:0 ni en la relació C26:0/C22:0 a plasma del ratolí Ald ko<sup>251</sup>. Pel què fa a les femelles heterozigotes, aquestes mostren una acumulació de C26:0 en teixits, però més moderada que la dels mascles hemizigots.

En cultius de fibroblastes embrionaris del ratolí Ald ko (MEFs: mouse embrionic fibroblasts) s’ha detectat una acumulació de C26:0 de 5 vegades respecte els cultius Wt. La taxa de  $\beta$ -oxidació del C24:0 en els MEFs Ald ko (estandaritzada respecte la  $\beta$ -oxidació de C16:0) està disminuïda entre un 40-60%, mentre que en pacients ho està entre un 60-80%<sup>250,251</sup>.

A nivell histològic s’han observat algunes anomalies, a través de microscopia electrònica (ME), a la glàndula adrenal de ratolins de 6 mesos de vida. Les cèl.lules corticals d’aquest òrgan contenen inclusions lipídiques en forma d’agulla, ja sigui localitzades en lisosomes o bé lliures en el citoplasma. Tot i així, no hi ha signes d’insuficiència adrenal en aquests animals. A testicles i ovaris s’observa un augment del nombre de cèl.lules intersticials, les quals també presenten inclusions lipídiques.<sup>250,251</sup>

Aquests estudis inicials van descartar l’existència d’un fenotip neurològic en el ratolí Ald ko, almenys fins als 6 mesos de vida<sup>250-252</sup>. El nostre grup, però, ha

demostrat que aquest animal acaba desenvolupant un fenotip neurològic a una edat posterior. El ratolí Ald ko manifesta algunes alteracions en les activitats exploratòries i en la mobilitat general. Aquestes comencen als 15 mesos de vida, amb una reducció de l'activitat locomotora inicial quan l'animal és situat en un nou medi desconegut (Open Field Test). Als 20 mesos ja hi ha una reducció significant de les activitats exploratòries i hipoactivitat durant tot el període del test. En una altra prova per mesurar la coordinació motora (Rotarod test), s'observa una disminució significativa a partir dels 20 mesos de vida. En suport a aquests resultats, la conducció nerviosa d'aquests animals es troba afectada a partir dels 15 mesos de vida, mostrant una clara disminució de la velocitat de conducció motriu <sup>253</sup>.

A través de ME hem observat que els nervis ciàtics dels ratolins Ald ko presenten, a 16 mesos, unes fibres més amples i amb una desorganització de les capes de mielina. Aquesta desorganització consisteix en la formació d'una sèrie de plecs en les capes de mielina, de manera que es formen unes protuberàncies que es projecten cap a l'axó que envolten <sup>253</sup>. Aquestes estructures són anomenades tomàcules i també han estat observades en pacients AMN. Per les seves característiques, suggereixen l'existència d'una hipermielinització en aquestes zones. Les anomalies mielíniques del nervi ciàtic del ratolí Ald ko són comparables a les causades per deficiències en proteïnes de la mielina, com la PMP22, tant en humans com en ratolins. A 22 mesos, el ratolí Ald ko mostra una degeneració avançada del nervi ciàtic, amb axons hipomielinitzats que en alguns casos sofreixen processos de remielinització <sup>253</sup>.

Al analitzar seccions histològiques de les regions cervical, toràcica i lumbar de la medulla espinal, també s'observen algunes alteracions en la matèria blanca del ratolí Ald ko a partir dels 16 mesos de vida. Aquestes inclouen axons degenerats i desorganitzacions de la mielina consistents en la formació de capes redundants que estan fora de contacte de l'axó. La degeneració axonal observada és comparable a les lesions de pacients AMN. Com hem dit anteriorment, les fibres gràcils cervicals i els tractes corticoespinals lumbar són més afectades en AMN i mostren pèrdues comparables d'axons i de mielina.

En conjunt, tant a medulla espinal com a nervi ciàtic del ratolí Ald ko s'evidencia un increment significatiu del nombre de fibres anormals, ja sigui a nivell de mielina o d'axó, a partir dels 16 mesos de vida. Aquestes anomalies van acompanyades per una disminució de la velocitat de la conducció nerviosa a nervi



ciàtic, i per l'aparició d'alteracions en les activitats exploratòries i en la mobilitat general de l'animal. Cal destacar, però, que no s'ha detectat cap anomalia histològica a cervell. Tots aquests resultats indiquen que la inactivació d'*ald* (*abcd1*) en ratolí dona lloc a un fenotip tardiu comparable a AMN, amb una alteració de la mielina i pèrdua axonal tant a medul·la espinal com a nervi ciàtic. En conseqüència, el ratolí Ald ko esdevé un model animal interessant per a investigar la patogènesi d'aquesta malaltia.

El model murí per a la X-ALD també ofereix l'avantatge de poder testar possibles intervencions terapèutiques. Un dels principals objectius a assolir dins del camp de recerca d'aquesta malaltia és, precisament, l'obtenció d'una teràpia efectiva. En aquest sentit, el nostre grup està implicat en l'estudi del gen *abcd2* (*aldr*) i del seu potencial com a diana per a estratègies farmacogenètiques. La sobreexpressió del gen *aldr* corregeix l'acumulació de VLCFAs tant a fibroblastes de pacients com de ratolins Ald ko<sup>172,214-216</sup>, però aquesta capacitat encara no s'ha demostrat directament *in vivo*, tal com hem apuntat en l'apartat anterior. Per tal d'aclarir aquesta qüestió, així com per avaluar el poder correctiu de la sobreexpressió d'*aldr* sobre la resta d'alteracions fenotípiques detectades en el ratolí Ald ko, el nostre laboratori va generar un ratolí transgènic que sobreexpressés el gen *aldr*. Aquest ratolí, que anomenarem **Wt/tg**, presenta una sobreexpressió de la proteïna ALDRP situada entre 5 i 10 vegades respecte els nivells detectats en el Wt. El ratolí Wt/tg fou creuat amb el ratolí Ald ko per tal d'obtenir l'animal que combina ambdues modificacions gèniques i que designarem com a **Ald/tg**.

Tanmateix, per aconseguir una bona teràpia es necessiten més coneixements tant a nivell molecular com cel·lular. Per tal d'ampliar l'escassa informació existent sobre les funcions de les proteïnes ALDP i ALDRP, disposem dels ratolins **Ald ko**, **Aldr ko** i **Ald/aldr ko** com a material d'investigació. El ratolí **Aldr ko**, generat pel nostre grup, presenta una inactivació del gen *aldr* (*abcd2*) aconseguida per mètodes similars als descrits pel ratolí Ald ko. El ratolí Aldr ko fou creuat amb l'Ald ko per tal d'obtenir un ratolí mutant doble, l'**Ald/aldr ko**, amb l'objectiu de completar l'estudi sobre la possible interacció funcional existent entre ALDP i ALDRP.