

## 2.2. DETERMINACIÓ DE SUBTRACTES ESPECÍFICS D'ALDP I D'ALDRP A TRAVÉS DE LA COMPOSICIÓ D'ÀCIDS GRASSOS EN TEIXITS DELS DIFERENTS RATOLINS MUTANTS.

La proteïna ALDP ha estat relacionada amb la  $\beta$ -oxidació peroxisomal de l'àcid hexacosanoic (C26:0) des de la identificació del seu gen codificador (*abcd1*) com a responsable de la malaltia X-ALD. Per analogia a aquest fet, ALDP podria intervenir en el procés  $\beta$ -oxidatiu d'altres àcids grassos, així com també la proteïna ALDRP, degut a l'alt percentatge d'identitat existent a nivell d'aminoàcid amb ALDP (66%)<sup>188</sup>. Alguns dels substractes coneguts de la  $\beta$ -oxidació peroxisomal, a més dels VLCFAs, són els  $\omega$ 9-MUFAs i els  $\omega$ 3- i  $\omega$ 6-PUFAs. Per tal d'investigar la relació d'ALDP i d'ALDRP amb aquests processos, hem determinat els nivells de diversos àcids grassos pertanyents a aquestes sèries en teixits procedents dels ratolins mutants Ald ko, Aldr ko i Ald/aldr ko. Ahora, hem ampliat l'estudi de la composició tissular en àcids grassos als ratolins Wt/tg i Ald/tg amb l'objectiu de valorar possibles efectes de la sobreexpressió d'ALDRP. Entre els compostos analitzats hi hem inclòs els àcids grassos saturats i  $\omega$ 9-MUFAs de 18 a 24 carbonis i els  $\omega$ 3- i  $\omega$ 6-PUFAs de 18 a 22 carbonis.

La composició d'àcids grassos s'ha determinat a partir d'extractes lipídics totals de teixits procedents dels diferents ratolins. Els teixits analitzats inclouen cervell, medulla espinal, nervi ciàtic, glàndula adrenal i fetge, així com el sèrum. En l'apartat següent es mostra la distribució d'àcids grassos existent en els diferents teixits del ratolí Wt.

### 2.2.1. COMPOSICIÓ TISSULAR D'ÀCIDS GRASSOS EN EL RATOLÍ WT: SATURATS, $\omega$ 9-MUFAs, $\omega$ 6- i $\omega$ 3-PUFAs.

La composició tissular d'àcids grassos en el **ratolí Wt** de 8 mesos de vida es troba recollida a la taula A1 (pàg 123). Els nivells detectats per a cada compost s'han expressat de dues formes diferents. El primer valor correspon al percentatge (mitjana $\pm$ desviació estàndar) relatiu al total d'àcids grassos analitzats en el teixit. El segon valor, marcat en verd, correspon al percentatge (mitjana) referit a la sèrie d'àcids grassos a la qual pertany el compost. El percentatge global que representa cada una de les sèries s'indica en taronja.

La composició d'àcids grassos varia d'un teixit a l'altre, demostrant que el seu metabolisme està modulats en funció de les necessitats pròpies de cada teixit. Si ens fixem en el valor global de cada una de les sèries, s'observa que en teixits procedents

del SNC predominen les d'àcids grassos saturats i  $\omega$ 9-MUFAs. La proporció entre aquestes dues sèries és similar a cervell, mentre que la medulla espinal és dues vegades més rica en  $\omega$ 9-MUFAs que en saturats. Al nervi ciàtic hi ha també un predomini dels  $\omega$ 9-MUFAs, però el segon grup més abundant és el dels  $\omega$ 6-PUFAs. En teixits extraneurals (glàndula adrenal, fetge) i en sèrum destaca la sèrie dels  $\omega$ 6-PUFAs per sobre de les altres.

En la sèrie dels àcids grassos saturats, el compost majoritari en tots els teixits i sèrum és l'àcid esteàric (C18:0). El percentatge d'aquest compost dins la sèrie (en verd a la taula A.1, pàg 123) és superior al 90% en tots els teixits excepte a medulla espinal i nervi ciàtic. En aquests dos teixits hi ha una major presència de productes procedents de l'elongació del C18:0, entre els quals destaca l'àcid lignocèric (C24:0). Establint una comparació entre ambdós teixits, s'observa que el C24:0 és dues vegades més abundant a nervi ciàtic que a medulla espinal. Els VLCFAs són uns components importants dels esfingolípids, que són els lípids majoritaris de la mielina. L'alt percentatge de C24:0 a medulla espinal i nervi ciàtic coincideix amb el fet que són els dos teixits analitzats més rics en mielina. El cervell presenta una major densitat de cossos neuronals i, per tant, una menor proporció de mielina que els teixits anteriors, la qual cosa concorda amb la detecció d'un major nivell de C18:0 en detriment de C24:0.

Pel que fa a la sèrie dels  $\omega$ 9-MUFAs, el compost majoritari en tots els teixits és l'àcid oleic (C18:1 $\omega$ 9). En els teixits procedents del SNC és on hi ha una major presència de productes derivats de la seva elongació, sobretot d'àcid 11-eicosenoic (C20:1 $\omega$ 9) i d'àcid nervònic (C24:1 $\omega$ 9). Els nivells d'aquests dos compostos, que guarden una relació de 1:1 en ambdós teixits (taula A1, pàg 123), són més elevats a medulla espinal que a cervell. Això concorda amb el fet que el C24:1 $\omega$ 9 és també un conegut marcador de mielina. Per contra, el nervi ciàtic és més pobre en productes d'elongació de la sèrie  $\omega$ 9-MUFAs. Així doncs, els nostres resultats mostren que la mielina procedent del SNC difereix de la del sistema nerviós perifèric (SNP) a ratolí. La primera és més rica en C24:1 $\omega$ 9, mentre que la del SNP ho és en C24:0, tal com es pot apreciar al comparar els percentatges globals d'aquests dos compostos (en blanc a la taula A.1, pàg 123).

Els teixits estudiats mostren una major variabilitat en la composició d'àcids grassos de la sèrie  $\omega$ 6-PUFAs. Als teixits del SNC hi ha una major proporció de

productes derivats de l'elongació de l'àcid linoleic (C18:2 $\omega$ 6) que a la resta, destacant especialment els nivells d'àcid araquidònic (C20:4 $\omega$ 6) i d'àcid adrènic (C22:4 $\omega$ 6). Com hem descrit anteriorment, el C20:4 $\omega$ 6 és el precursor dels eicosanoïds i la seva disregulació a cervell comporta greus conseqüències. Per contra, el nervi ciàtic és el teixit que presenta els nivells més baixos per a aquest compost i per a la resta de productes d'elongació del C18:2 $\omega$ 6. És interessant observar que la proporció existent entre productes i precursors de la sèrie  $\omega$ 6 varia entre els 3 teixits nerviosos. Així doncs, la proporció existent entre C18:2 $\omega$ 6 i C20:4 $\omega$ 6 és de 1:10 a cervell, s'igual a la medulla espinal (1:1) i acaba invertint-se a nervi ciàtic (20:1) (veure taula A1, pàg 123).

En el cas dels  $\omega$ 3-PUFAs, el compost més abundant en la majoria de teixits és l'àcid docosahexaenoic (C22:6 $\omega$ 3), el darrer producte d'elongació de la sèrie. El nervi ciàtic representa l'única excepció, mostrant uns nivells similars de C22:6 $\omega$ 3 i d'àcid linolènic (C18:3 $\omega$ 3), que és l'àcid gras essencial precursor de la sèrie. Pel que fa als altres teixits, és important destacar l'alt nivell d'àcid 7,10,13,16,19-docosapentaenoic (C22:5 $\omega$ 3) a la glàndula adrenal, essent un compost quasi insignificant en la resta.

Amb totes aquestes dades es posa de manifest que el cervell i la medulla espinal són els teixits que posseeixen una major proporció de productes d'elongació de les diferents sèries d'àcids grassos analitzades. En canvi, el nervi ciàtic destaca, en general, pels nivells percentuals més baixos de productes d'elongació. Tant el nervi ciàtic com els teixits extraneurals presenten un clar predomini dels precursors en la majoria de les sèries. L'única excepció en el cas del nervi ciàtic és per a la sèrie dels saturats, essent el teixit amb més productes d'elongació per aquesta sèrie, mentre que en cas dels teixits extraneurals ho seria la sèrie dels  $\omega$ 3-PUFAs.

### **2.2.2. COMPOSICIÓ TISSULAR D'ÀCIDS GRASSOS EN ELS RATOLINS MUTANTS.**

La composició tissular d'àcids grassos en els diferents ratolins mutants ens permetrà de veure si existeix una relació d'ALDP i/o d'ALDRP en el metabolisme d'aquests compostos. També podrem valorar els efectes de la sobreexpressió d'ALDRP, possible estratègia terapèutica de la X-ALD. En les properes seccions es comentaran els principals resultats obtinguts per cada una de les sèries d'àcids grassos analitzades: saturats,  $\omega$ 9-MUFAs,  $\omega$ 6- i  $\omega$ 3-PUFAs. Les dades globals per a cadascun dels ratolins mutants es troben recollides en les taules A.2 (Ald ko, pàg 124),

A.3 (Aldr ko, pàg 125), A.4 (Ald/aldr ko, pàg 126), A.5 (Wt/tg, pàg 127) i A.6 (Ald/tg, pàg 128).

### 2.2.2.1. Sèrie dels àcids grassos saturats.

#### 2.2.2.1.1. L'àcid hexacosanoic (C26:0).

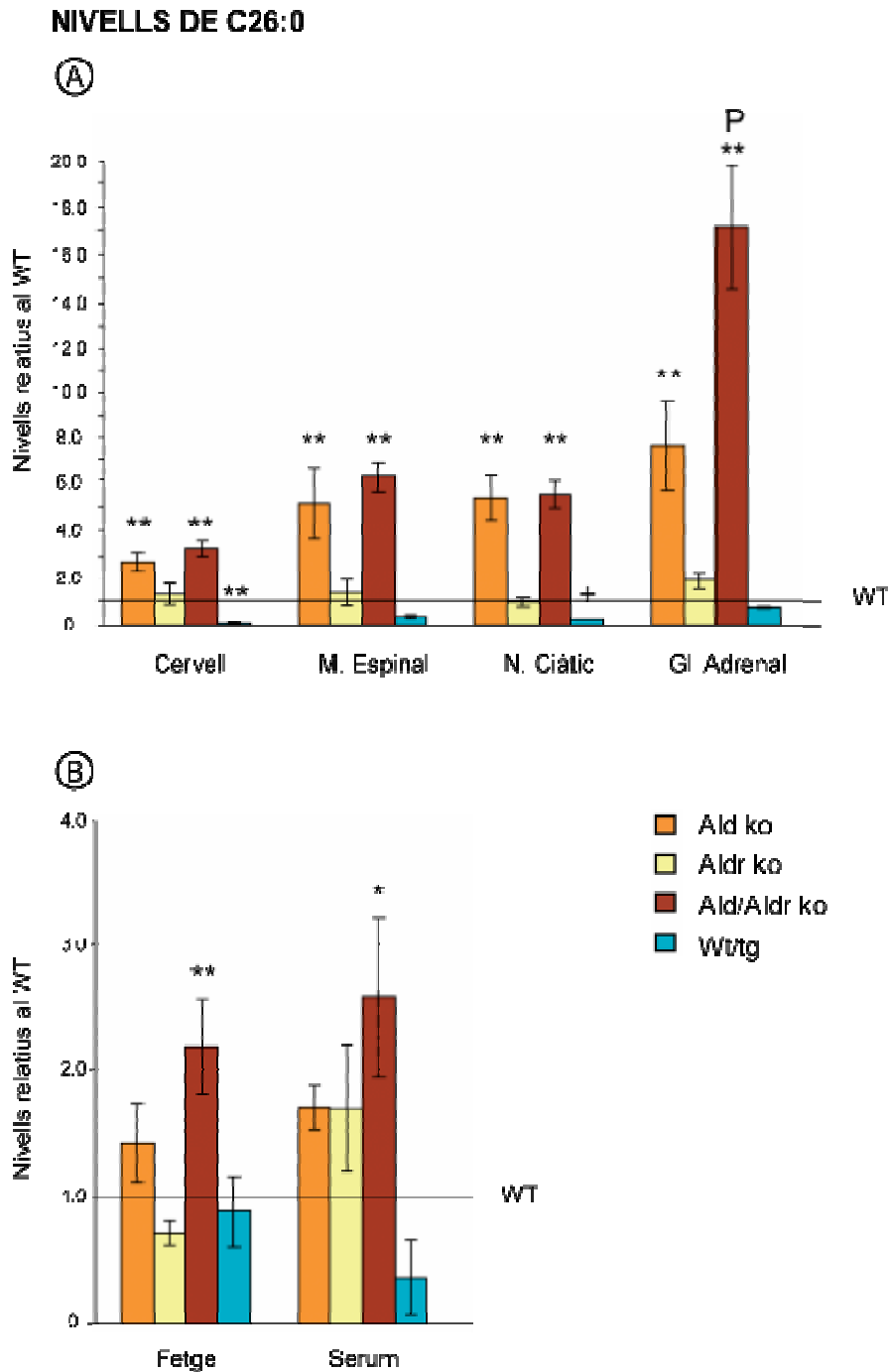
El primer paràmetre estudiat en els diferents ratolins mutants ha estat el nivell d'àcid hexacosanoic (C26:0), marcador bioquímic de la X-ALD. Els resultats s'han obtingut com a percentatge respecte el total d'àcids grassos analitzats de la mateixa sèrie, i s'han representat a la figura 4.3 en relació als detectats en el ratolí Wt. Tal com hem vist anteriorment (figura 4.1A, pàg 76), el ratolí **Ald ko** presenta un increment de C26:0 a cervell, medulla espinal, nervi ciàtic i glàndula adrenal. Per contra, exhibeix uns nivells normals d'aquest compost tant a fetge com a sèrum.

En el cas del ratolí **Aldr ko**, cap dels teixits analitzats ni el sèrum presenten una alteració detectable en aquest compost, tal com es pot observar en ambdós apartats de la figura 4.3. Pel que fa al ratolí **Ald/aldr ko**, el nivell de C26:0 es troba incrementat de forma significativa en tots els teixits i també a sèrum. A la figura 4.3.A hi ha recollits tots els teixits on havíem mostrat prèviament l'existència de nivells alterats de C26:0 en el ratolí Ald ko. En aquests mateixos teixits, el ratolí Ald/aldr ko mostra una acumulació de C26:0 similar a l'observada en l'Ald ko excepte a la glàndula adrenal, on és significativament major. L'increment de C26:0 detectat a glàndula adrenal del ratolí Ald/aldr ko està situat al voltant de 16 vegades respecte al Wt, mentre que en el cas de l'Ald ko és de 8 vegades (respecte el Wt). Aquest efecte sinèrgic de la inactivació de les dues proteïnes també es pot observar en el fetge i el sèrum, representats a la figura 4.3B. En ambdós casos, només l'absència simultània d'ALDP i d'ALDRP dona lloc a una acumulació significativa de C26:0 respecte el Wt.

La **sobreexpressió d'ALDRP** en el Wt (ratolí **Wt/tg**) provoca davallades significatives de C26:0 a cervell i a nervi ciàtic (figura 4.3A), la qual cosa ha estat també observada en el ratolí **Ald/tg** (figura 4.1A, pàg 76).

#### 2.2.2.1.2. Els àcids grassos saturats de 18 a 24 carbonis.

L'anàlisi dels àcids grassos saturats de 18 a 24 carbonis (C18:0, C20:0, C22:0 i C24:0) ens ha revelat un alt grau d'heterogeneïtat entre teixits dels diferents ratolins. La **glàndula adrenal** és l'únic teixit en el qual la **inactivació d'aldr** provoca alteracions en els nivells d'àcids grassos saturats. Les anomalies detectades consisteixen en un increment de C20:0, C22:0 i C24:0 (veure figura 4.4). El grau d'acumulació d'aquests



**FIGURA 4.3.** Nivells de C26:0 en teixits dels ratolins Ald ko, Aldr ko, Ald/aldr ko i Wt/tg. Els resultats estan expressats en relació als nivells obtinguts pel WT. Els teixits analitzats inclouen A) cervell, medulla espinal, nervi ciàtic i glàndula adrenal i B) fetge i sèrum. Cada columna (mitjana±desviació estàndar) resulta de la valoració de diverses mostres. Per a cervell, medulla espinal i fetge, el nombre mínim de mostres analitzades per genotip és de 4. Cadascuna correspon al teixit procedent d'un sol animal. Pel nervi ciàtic, la glàndula adrenal i el sèrum, el mínim de mostres analitzades per genotip és de dues. Cadascuna d'elles reuneix els òrgans de 4 animals i, en el cas del sèrum, el procedent de dos. Les diferències significatives s'han determinat a través d'ANOVA seguit del test de Fisher (valors de p quan és significatiu respecte el WT,  $p \leq 0.05$  (\*) i  $p \leq 0.01$  (\*\*). Valors de p quan és significatiu respecte l'Ald ko:  $p \leq 0.01$  (P) o bé a través del test de Wilcoxon (valors de p quan és significatiu respecte el WT:  $p \leq 0.05$  (+)).

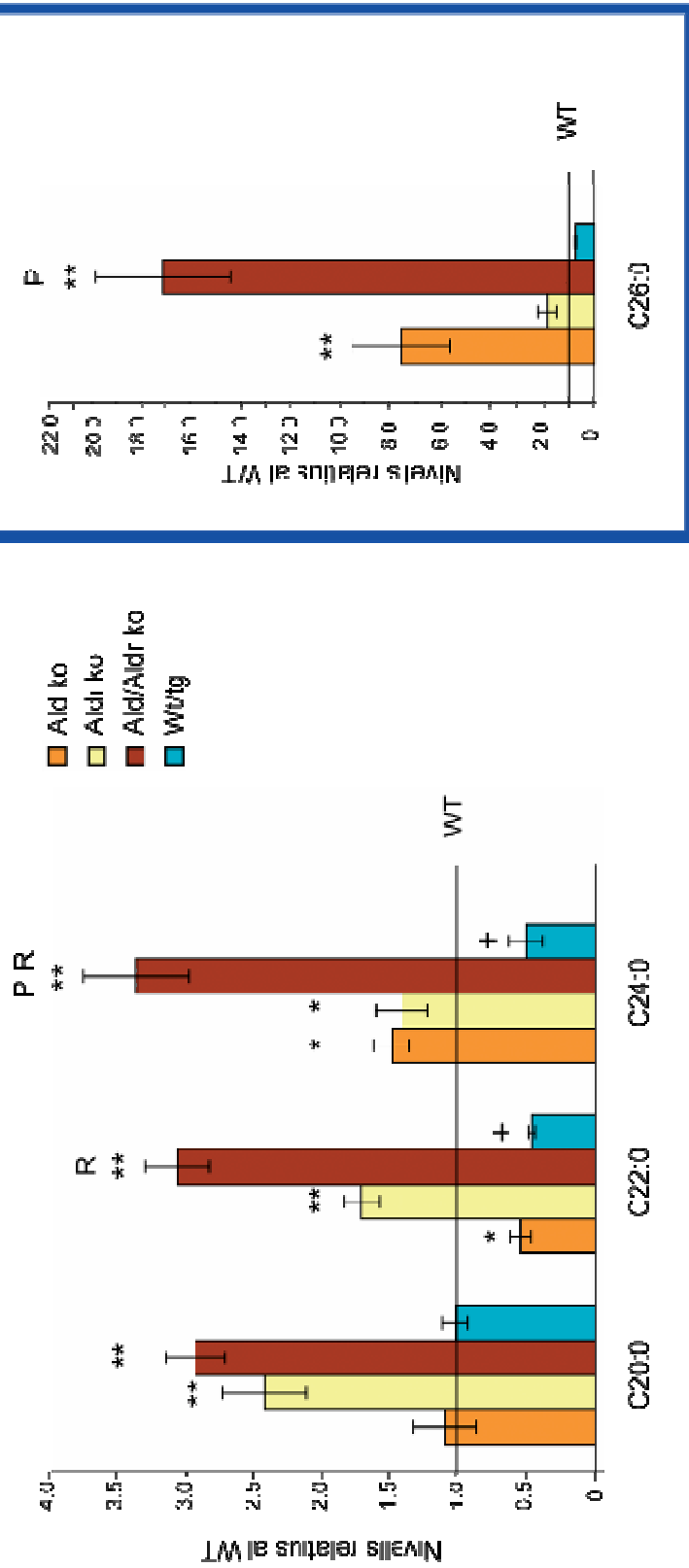
compostos segueix una línia descendent, és a dir, el major es dona pel C20:0 (2.5 vegades respecte el Wt) i el menor pel C24:0 (1.5 vegades respecte el Wt). L'increment de C24:0 és similar al que s'ha observat en el ratolí Ald ko, al qual ja hem fet referència en la secció precedent. Addicionalment, el ratolí **Ald ko** presenta una reducció significativa de C22:0, tal com es mostra a la figura 4.4, fet que es dona de forma exclusiva en aquest teixit.

La **inactivació conjunta d'ald i d'aldr** a la **glàndula adrenal** dona lloc a un increment de C20:0, C22:0 i C24:0. En el cas del C20:0, l'increment és comparable al detectat en el ratolí Aldr ko (veure figura 4.4), mentre que pels altres dos compostos és significativament superior. Pel què fa a la **sobreexpressió d'aldr en el Wt (ratolí Wt/tg)**, es produeix una disminució significativa dels nivells de C22:0 i C24:0 respecte el Wt. Aquest fet és coincident amb els resultats obtinguts pel ratolí **Ald/tg** en aquest mateix teixit (no representats a la figura 4.4).

A **cervell** i a **medulla espinal**, tant la **inactivació d'ald com la d'aldr** no provoquen canvis detectables en cap d'aquests compostos. Per contra, la **inactivació simultània d'ambdós gens** condueix a un augment significatiu de C24:0 en ambdós teixits (veure figura 4.5). La **sobreexpressió d'aldr en el ratolí Wt (Wt/tg)** provoca una disminució significativa d'aquest compost a cervell (figura 4.5), tal com també s'ha observat en el cas del ratolí **Ald/tg** (figura 4.1B, pàg 76).

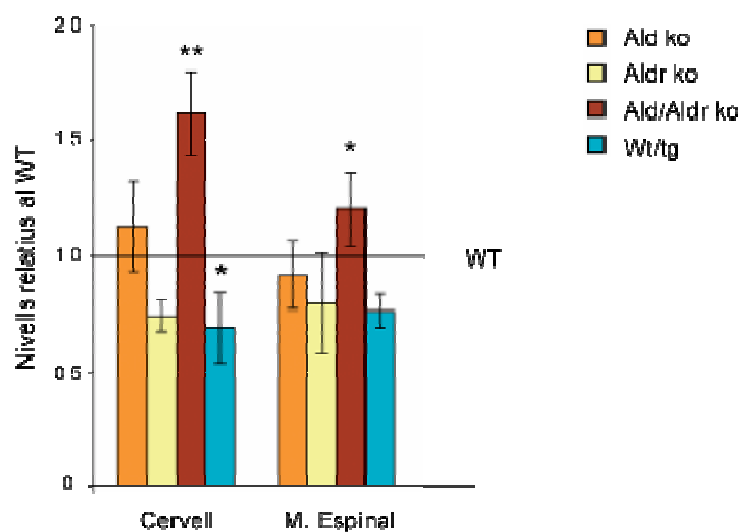
Pel què fa al **nervi ciàtic**, l'**absència d'ALDP, d'ALDRP o d'ambdues proteïnes** no afecta els nivells d'aquests àcids grassos saturats, que no mostren cap diferència significativa respecte el Wt (veure figura 4.6A-B. Per simplificar només s'han representat els valors corresponents al ratolí Ald/aldr ko). En canvi, la **sobreexpressió d'aldr en el Wt (Wt/tg)** dona lloc a un increment del percentatge global de la sèrie dels saturats (figura 4.6A). Aquest increment, del voltant de dues vegades, correlaciona amb un augment similar de C18:0, el compost majoritari de la sèrie en aquest teixit (figura 4.6B). També hem detectat acumulacions significatives de C20:0 i de C22:0 (figura 4.6B), que són àcids grassos derivats de l'elongació del C18:0. En el cas del ratolí **Ald/tg** no s'observa cap alteració significativa en el percentatge global de saturats ni en els nivells de C18:0, C20:0 i C22:0, tot i que s'aprecia una certa tendència a l'augment (figura 4.6B). El nivell de C24:0 es troba disminuït en el nervi ciàtic del ratolí **Ald/tg**, tal com hem comentat anteriorment (figura 4.1B, pàg 76), però no en el del **Wt/tg**.

**Sèrie dels saturats a la GL. ADRENAL**



**FIGURA 4.4.** Nivells de C20:0, C22:0, C24:0 i C26:0 a glàndula adrenal dels ratolins Aldr ko, Aldr ko, Aldr/Aldr ko i Wt/tg. Els resultats estan expressats en relació als nivells obtinguts pel Wt. Cada columna (mitjana±desviació estàndard) és fruit de l'anàlisi d'un mínim de dues mostres. Cada una d'aïlles reuneix els òrgans procedents de 4 animals. Les diferències significatives s'han determinat a través d'ANOVA seguit del test de Fisher (valors de p quan és significatiu respecte al Wt: p<0.05 (\*) i p<0.01 (\*\*). Valors de p quan és significatiu respecte l'Aldr ko: p<0.01 (R.) o bé a través del test de Wilcoxon (valors de p quan és significatiu respecte el Wt: p<0.05 (+)).

## NIVELLS DE C24:0 al SNC



**FIGURA 4.5.** Nivells de C24:0 al SNC (cervell i medulla espinal) dels ratolins Ald ko, Aldr ko, Ald/Aldr ko i Wt/tg. Els resultats estan expressats en relació als nivells obtinguts pel WT. Cada columna (mitjana±desviació estàndar) s'ha obtingut a través de l'anàlisi d'un mínim de 4 mostres. Cadascuna d'elles correspon al teixit procedent d'un sol animal. Les diferències significatives respecte al WT s'han determinat a través d'ANOVA seguit del test de Fisher (valors de p.  $p \leq 0.05$  (\*) i  $p \leq 0.01$  (\*\*)).



Per últim, només cal afegir que no s'han vist alteracions en el nivell de cap d'aquests compostos ni a **fetge** ni a **sèrum** de cap dels diferents ratolins estudiats.

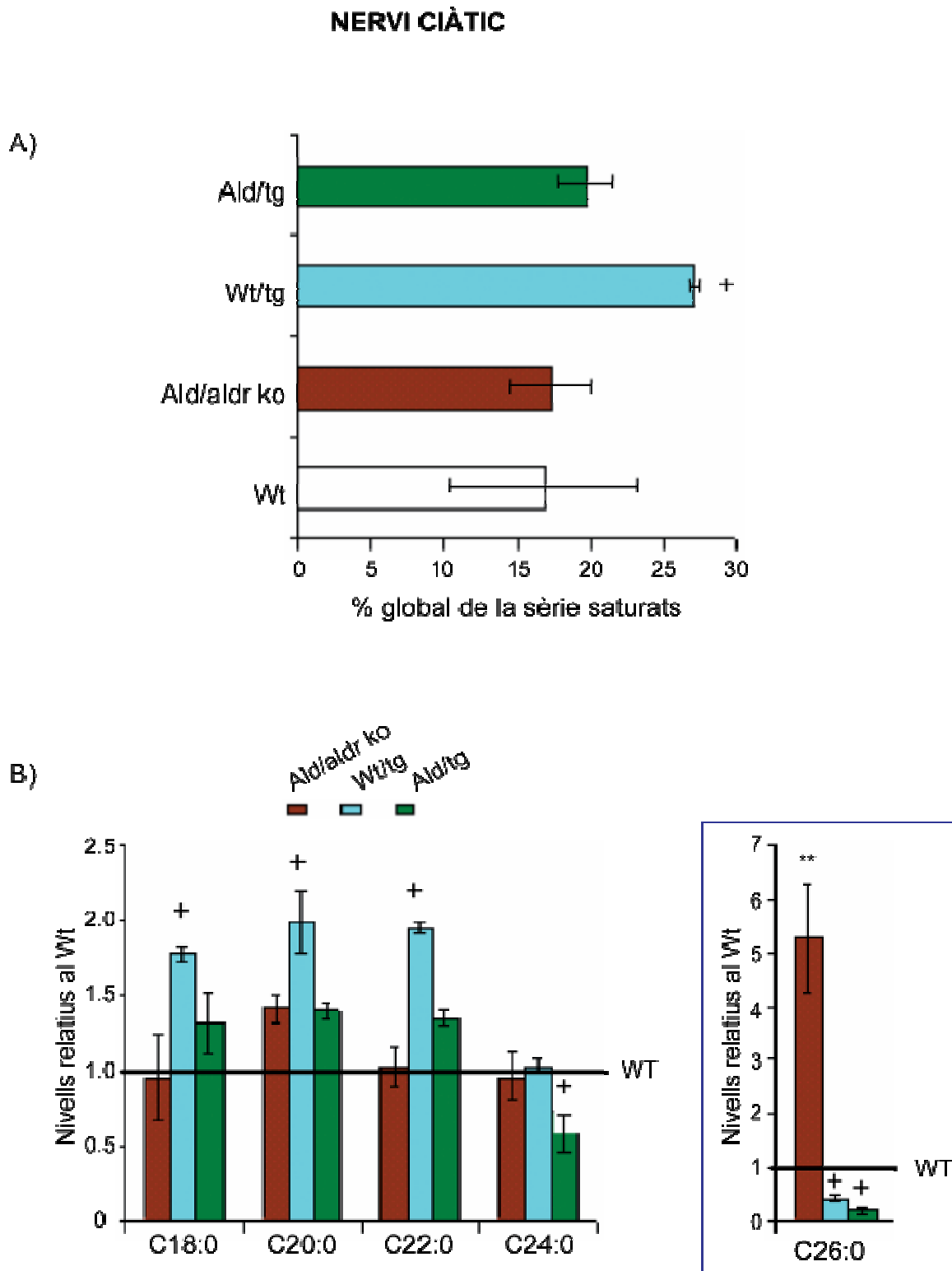
### 2.2.2.1.3. Implicacions d'ALDP i d'ALDRP en el metabolisme dels àcids grassos saturats.

El descobriment que el gen responsable de la malaltia X-ALD codifica pel transportador ALDP ha estat la primera evidència que relaciona a aquesta proteïna amb l'import peroxisomal de C26:0, marcador d'aquesta patologia <sup>165</sup>. Fins a l'actualitat, però, l'actuació directa d'ALDP en el transport d'aquest compost només s'ha demostrat en llevats (*S. cerevisiae*) <sup>179</sup>. Els resultats exposats en els primers apartats d'aquest treball coincideixen amb la literatura existent al demostrar l'existència d'una acumulació de C26:0 en la majoria de teixits procedents del ratolí Ald ko, i contribueixen a reforçar el paper d'ALDP en el transport d'aquest compost en mamífers.

En el nostre estudi no hem detectat alteracions en els nivells de C26:0 en els teixits del ratolí Aldr ko (figura 4.3A-B), fet que suggereix que ALDRP no és indispensable pel transport d'aquest compost al peroxisoma. Tot i així, hi ha fortes indicacions de la implicació d'aquesta proteïna en el metabolisme d'aquest compost. Per una banda, en sèrum i en alguns teixits procedents del ratolí Ald/aldr ko com la glàndula adrenal i el fetge, s'observen acumulacions més importants de C26:0 que en el ratolí Ald ko (figura 4.3A-B). Per altra banda, la sobreexpressió d'ALDRP (5-10 vegades respecte el Wt) en el ratolí Ald ko és capaç de normalitzar els nivells d'aquest compost en tots els teixits on s'ha trobat acumulat, o inclús de disminuir-los per sota dels detectats en el Wt (figura 4.1A, pàg 76).

L'anàlisi dels àcids grassos saturats de 18 a 24 carbonis en els diferents teixits dels nostres ratolins ha posat de manifest una relació d'ALDP i d'ALDRP amb aquests compostos. **Els efectes més clars i diferencials** per a ambdues proteïnes s'han vist a la **glàndula adrenal**, on tant la inactivació d'ALDP com la d'ALDRP comporta l'acumulació de diversos compostos (figura 4.4). En canvi, cap d'aquestes dues modificacions **no provoca anomalies detectables en teixits neurals**, inclosos cervell, medulla espinal i nervi ciàtic (figures 4.5 i 4.6). Les explicacions a aquest fet obeeixen, probablement, a les **característiques diferencials que presenta la glàndula adrenal respecte dels teixits neurals**.

En primer lloc, la glàndula adrenal és un teixit on hi ha un aport exògen important d'àcids grassos saturats, mentre que en teixits neurals està molt més restringit a causa



**FIGURA 4.6.** A) Percentatge glogal de la sèrie dels saturats a nervi ciàtic dels ratolins Wt, Ald/aldr ko, Wt/tg i Ald/tg. Els valors corresponen al percentatge (mitjana±desviació estàndar) respecte el total d'àcids grassos analitzats. B) Nivells de C18:0, C20:0, C22:0, C24:0 i C26:0 a nervi ciàtic dels ratolins Ald/aldr ko, Wt/tg i Ald/tg. Els valors (mitjana±desviació estàndar) estan expressats respecte els nivells obtinguts pel Wt. El nombre mínim de mostres analitzades per cada genotip és de dues. Cadascuna d'elles reuneix els òrgans procedents de 4 animals. Les diferències significatives respecte el WT s'han determinat a través d'ANOVA seguit pel test de Fisher ( $p \leq 0.01$  (\*\*)) o bé a través del test de Wilcoxon (valors de  $p$ :  $p \leq 0.05$  (+)).

de l'existència de la barrera hemato-encefàlica. En teixits neurals, doncs, existeix un predomini de la síntesi endògena d'aquests compostos, fet que permet una major regulació dels seus nivells. Tenint en compte tots aquests factors, és probable que els transportadors ABCD de la glàndula adrenal puguin estar més exposats a aquests substractes que els dels teixits neurals, fet que propiciaria l'evidència d'efectes causats per la inactivació dels transportadors ABCD sobre tots els compostos de la sèrie dels saturats en aquest teixit.

En segon lloc, és important recordar que els transportadors ABCD han de formar dímers per a ser funcionals i que les diferents combinacions podrien establir l'especificitat de substrate. La composició final de dímers d'un teixit està determinada per dos factors: la relació entre els nivells d'expressió dels diferents transportadors ABCD i la seva distribució entre els diversos tipus cel·lulars que integren els teixits. Al mesurar el nivell d'expressió dels gens codificadors dels transportadors ABCD, hem observat que la glàndula adrenal és l'únic dels teixits analitzats on la relació entre els d'*ald* (*abcd1*) i d'*aldr* (*abcd2*) és similar (taula 4.1, pàg 83). I pel que fa a la seva distribució, estudis previs han mostrat que ALDP està restringida a les cèl·lules corticals mentre que ALDRP ho està a les cèl·lules medul·lars <sup>184</sup>, la qual cosa impossibilitaria la formació de dímers entre les dues proteïnes. El fet de poder distingir efectes causats per l'absència d'ALDP o d'ALDRP a la glàndula adrenal i no en d'altres teixits podria estar relacionat amb la composició i distribució característiques d'ambdues proteïnes en aquest teixit. A més, i en relació amb aquests factors, cal tenir en compte que hem realitzat les valoracions dels àcids grassos a partir d'homogenats totals. Depenent de la composició i regionalització dels dímers en cada teixit, l'ús d'homogenats totals pot emascarar efectes que es veurien més clars al analitzar determinades poblacions cel·lulars de forma aïllada.

A la **glàndula adrenal**, les **inactivacions individuals d'*aldr* i d'*ald*** condueixen a un perfil diferent d'àcids grassos saturats. En el primer cas hi ha un increment dels nivells de C20:0, C22:0 i C24:0, mentre que en el segon cas hi ha un increment dels de C24:0 i C26:0, tal com es pot veure a la figura 4.4. Això suggereix que **ALDRP** estaria implicada en **el transport dels àcids grassos saturats de cadena més curta (de 20 a 24 carbonis)**. En canvi, **ALDP** estaria relacionada amb el **transport d'àcids grassos saturats de cadena superior o igual a 24 carbonis, sobretot de C26:0**. Així doncs, l'afinitat de substractes d'ALDP i d'ALDRP estaria determinada per la longitud de cadena de l'àcid gras. Tot i així caldria determinar compostos de cadena més llarga en el ratolí *Ald ko* per tal d'establir el límit superior d'especificitat d'aquesta proteïna. Un fet que recolzaria la realització d'aquesta anàlisi

és la detecció d'acúmuls d'àcids grassos saturats de fins a 32 carbonis de longitud en sèrum de pacients X-ALD<sup>258</sup>

L'increment de C24:0 a la **glàndula adrenal** del ratolí **Ald/ald<sup>r</sup> ko** és major que l'existent en els ratolins Ald ko i Aldr ko, els quals mostren unes acumulacions comparables entre ells (figura 4.4). La doble absència d'ALDP i d'ALDRP a cervell i a medul·la espinal dona lloc a un increment de C24:0, encara que en aquests teixits la simple inactivació d'una o altra proteïna no produeix cap efecte en el nivell d'aquest compost (figura 4.5). Tots aquests resultats indiquen que **ALDP** i **ALDRP** estan implicades, en grau semblant, en el **transport de C24:0**, la qual cosa posa de manifest l'existència d'una **redundància funcional entre ambdues proteïnes**.

La **doble inactivació d'ald i d'ald<sup>r</sup>** a la **glàndula adrenal** també condueix a una acumulació de C20:0, C22:0 i C26:0 (figura 4.4). L'increment de C20:0 en el ratolí **Ald/ald<sup>r</sup> ko** és similar al detectat en el ratolí Aldr ko, la qual cosa ens indica que ALDP no està implicada en el transport d'aquest compost. Aquest fet estaria en consonància amb la manca d'alteracions detectades per aquest compost en el ratolí Ald ko. Per contra, la glàndula adrenal del ratolí Ald/ald<sup>r</sup> ko mostra uns acúmuls de C22:0 i de C26:0 significativament majors que en els ratolins Aldr ko i Ald ko, respectivament (figura 4.4). Aquests resultats suggereixen que tant ALDP com ALDRP estan implicades en el metabolisme d'aquests dos compostos. Tal com hem vist anteriorment, ALDRP actuaria preferentment en l'import peroxisomal de compostos de 20 a 24 carbonis, mentre que ALDP ho faria en el de compostos de 24, 26 o més carbonis. Malgrat això, aquests resultats suggereixen la possibilitat que ALDP pugui participar en el transport de compostos de cadena més curta com el C22:0 i ALDRP en el de compostos més llargs com és el C26:0, encara que amb una eficiència molt menor. Aquest fet ampliaria el grau de redundància funcional entre ambdues proteïnes.

Per altra banda, poden existir mecanismes addicionals que contribueixin als alts nivells de C22:0, C24:0 i C26:0 exhibits per la **glàndula adrenal** del ratolí **Ald/ald<sup>r</sup> ko**. Aquests mecanismes podrien estar relacionats amb la síntesi endògena d'àcids grassos de longitud de cadena major de 18 carbonis. Com en tot procés sintètic, un increment de precursor conduiria a un increment del seu producte, sempre i quan no hi hagi una limitació d'altres factors implicats en la reacció. A la glàndula adrenal del ratolí Ald/ald<sup>r</sup> ko hi ha un acúmul de C20:0 que pot contribuir, a través del procés sintètic, en l'augment del nivell de C22:0 i així successivament fins al C26:0.

L'absència d'ALDP i d'ALDRP afavoriria aquest procés al no permetre la  $\beta$ -oxidació dels compostos de 20 a 26 carbonis, fet que suposa la pèrdua d'una via de control de la síntesi. És per això que aquest efecte no s'apreciaria a la **glàndula adrenal** del ratolí **Aldr ko**, on les acumulacions de C20:0, C22:0 i C24:0 mostren una tendència decreixent des del primer fins al darrer compost. En aquest cas, la presència d'ALDP possibilitaria la  $\beta$ -oxidació del C24:0 i del C26:0, fet que ajudaria a controlar el procés sintètic i a moderar els acúmuls finals dels compostos d'aquesta sèrie.

Tot i que el paper d'ALDP en el transport d'àcids grassos saturats és evident, això no exclou que aquesta proteïna pugui tenir altres implicacions en el metabolisme lipídic. A la **glàndula adrenal** del ratolí **Ald ko** s'observa una disminució significativa del nivell de C22:0, la qual cosa també s'ha descrit en sèrum i cèl.lules mononuclears de pacients X-ALD<sup>259</sup>. Aquest efecte, que no es pot explicar per cap funció transportadora associada a ALDP, ens indica que l'absència d'aquesta proteïna pot produir alguna modificació en el metabolisme lipídic que acabi repercutint en els nivells d'aquest compost. Per una banda, l'absència d'ALDP podria donar lloc a un augment de l'expressió o de l'activitat d'ALDRP, la qual cosa reduiria els nivells de C22:0 com en la glàndula adrenal del ratolí Wt/tg (figura 4.4). Els resultats que hem presentat anteriorment demostren que l'expressió d'ALDRP a nivell de mRNA no està alterada en cap dels teixits del ratolí Ald ko. Tot i així, caldria mesurar l'expressió d'ALDRP a nivell de proteïna per tal de poder excloure mecanismes post-transcripcionals que podrien alterar el nivell final d'aquest transportador a la membrana peroxisomal. Per altra banda, l'absència d'ALDP podria conduir a modificacions en el mecanisme de síntesi dels àcids grassos de cadena major de 18 carbonis que portarien a la davallada de C22:0. En altres patologies peroxisomals com són els desordres de la biogènesi d'aquest orgànu, també s'han detectat increments de C26:0 acompanyats de disminucions de C22:0<sup>116,260</sup>. La disminució de C22:0 podria ser una resposta derivada de l'increment de C26:0, el qual exerciria una retro-inhibició de la síntesi per excés de producte. Contràriament a això, hi ha estudis que descriuen un increment de la síntesi de VLCFAs en fibroblastes de pacients X-ALD<sup>127,128</sup>, la qual cosa contribuiria a l'acumulació final detectada d'aquests compostos. El nivell de C22:0 també podria veure's disminuït per aquest fet si no es produís alhora un augment de la síntesi d'àcids grassos de cadena més curta (20-22 carbonis).

La **sobreexpressió d'ALDRP** (5-10 vegades respecte el Wt) comporta una davallada del nivell de determinats àcids grassos saturats en funció del teixit estudiat. A la **glàndula adrenal**, els ratolins **Wt/tg** i **Ald/tg** presenten uns nivells

significativament disminuïts de C22:0 i de C24:0 (figures 4.4 i 4.1). A **cervell** existeix una reducció significativa del nivell de C24:0 en ambdós casos (figures 4.5 i 4.1). A **nervi ciàtic** s'ha detectat una disminució significativa del nivell de C24:0 en el ratolí **Ald/tg** (figura 4.1 i 4.6B) però no en el **Wt/tg** (figura 4.6B). Tot i així, al mirar el perfil de la sèrie dels saturats en el nervi ciàtic del ratolí **Wt/tg** (figura 4.6B), s'observa una tendència a la reducció en els nivells de compostos a partir del C24:0. Totes aquestes dades reforçarien el paper d'ALDRP com a transportador de C22:0 i C24:0.

Els baixos nivells de C26:0 en alguns teixits del **ratolí Wt/tg** i, sobretot, els nivells normals o lleugerament disminuïts d'aquest compost en tots els teixits analitzats del **ratolí Ald/tg**, poden ser interpretats sota una òptica diferent. La sobreexpressió d'ALDRP donaria lloc a un major transport de C22:0 i de C24:0 al peroxisoma, fet que reduiria la disponibilitat de substractes per a la síntesi d'àcids grassos de cadena superior com el C26:0. Tot i que no es pot descartar que ALDRP pugui participar en el transport de C26:0, aquest mecanisme podria explicar la capacitat que té la sobreexpressió d'ALDRP per normalitzar els nivells de C26:0 en el ratolí **Ald ko** (figura 4.1A, pàg 76), sobretot tenint en compte que ALDRP tindria una baixa eficiència en el transport d'aquest compost. Les nostres dades no ens permeten de discriminar la participació ni el grau de contribució de cada un d'aquests mecanismes en la normalització dels nivells de C26:0 en teixits diana del ratolí **Ald/tg**.

Per altra banda, la **sobreexpressió d'ALDRP** (dins dels límits esmentats) podria tenir repercussions en els nivells dels compostos saturats de cadena més curta (C18:0, C20:0 i C22:0). Aquestes es manifesten clarament a **nervi ciàtic**, el teixit on l'elongació de la sèrie dels saturats és més important en comparació a la resta de teixits estudiats (veure taula A1, pàg 123, on el nervi ciàtic presenta el nivell relatiu més baix de precursor C18:0 respecte la resta de teixits). En el **nervi ciàtic** del ratolí **Wt/tg** s'observa un augment de C18:0 (figura 4.6B), fet que comporta una elevació significativa del percentatge global de la sèrie dels saturats (figura 4.6A). Aquest acúmulo de precursor pot contribuir a un increment de la síntesi que tindria com a conseqüència un augment dels nivells de C20:0 i de C22:0. El procés sintètic, però, es veuria controlat per la  $\beta$ -oxidació peroxisomal a partir del C24:0, fet que explicaria la manca d'alteracions en el nivell d'aquest compost. En el cas del **nervi ciàtic** del ratolí **Ald/tg**, no hem detectat cap alteració significativa dels nivells de C18:0, C20:0 i C22:0, encara que aquests mostren una certa tendència a l'alça (figura 4.6B). També hi ha una certa coincidència amb el **wt/tg** pel què fa a la forta acció de la  $\beta$ -oxidació peroxisomal sobre el nivell de C24:0, que en l'**Ald/tg** resulta en una disminució

significativa d'aquest respecte el Wt (figura 4.6B). De fet, els perfils d'àcids grassos saturats a nervi ciàtic d'ambdós ratolins són similars, però en el ratolí Wt/tg hi ha un nivell superior de tots els compostos en comparació a l'Ald/tg. Com veurem més endavant, aquests canvis podrien estar relacionats amb d'altres detectats en la sèrie dels  $\omega$ 9-MUFAs.

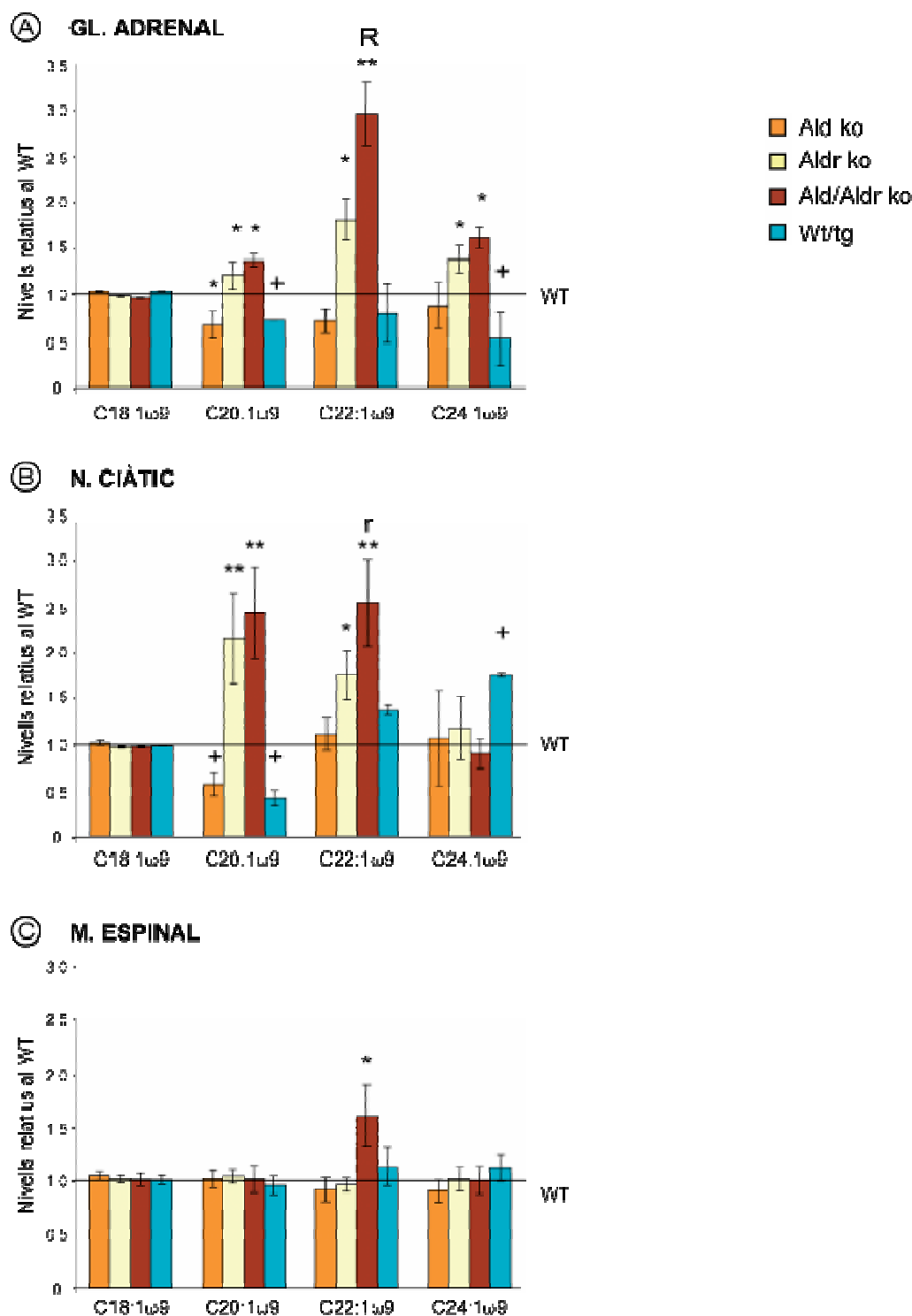
#### 2.2.2.2. Sèrie dels $\omega$ 9-MUFAs: substractes potencials d'ALDRP.

La sèrie dels  $\omega$ 9-MUFAs és especialment important en teixits neurals, sobretot a medul.la espinal i nervi ciàtic. Els nivells percentuals d'aquests compostos en tots els teixits i genotips es poden consultar a les taules A1-A6 (pàg 123-128). En els ratolins mutants, s'han trobat canvis en els nivells de  $\omega$ 9-MUFAs a **glàndula adrenal** (figura 4.7A), **nervi ciàtic** (figura 4.7B) i **medul.la espinal** (figura 4.7C). En canvi, no s'han detectat variacions ni a cervell ni a fetge ni a sèrum de cap dels ratolins analitzats, raó per la qual no s'han inclòs a la figura 4.7.

Els efectes més evidents en la sèrie dels  $\omega$ 9-MUFAs s'han observat a la glàndula adrenal i al nervi ciàtic. Algunes característiques pròpies d'aquests dos teixits poden haver influït en la manifestació d'aquests efectes, com és la composició específica en dímers ABCD i la seva distribució en els diferents subtipus cel.lulars que integren cada teixit. En el cas de la glàndula adrenal, també hi pot haver contribuït l'aport exògen de substractes, que és molt superior que en els teixits neurals (on actúa la barrera hemato-encefàlica).

La **inactivació d'ald** produeix alteracions detectables a **glàndula adrenal** i a **nervi ciàtic**, però no a medul.la espinal. Aquestes alteracions consisteixen en un augment dels nivells de C20:1 $\omega$ 9 i de C22:1 $\omega$ 9 tant a **glàndula adrenal** com a **nervi ciàtic** (figura 4.7A i B respectivament), així com de C24:1 $\omega$ 9 només a **glàndula adrenal** (figura 4.7A). Aquests resultats suggereixen la implicació d'ALDRP en el transport d'aquests tres compostos al peroxisoma, fet que guarda un paral.lelisme amb les observacions realitzades per la sèrie dels saturats en la secció precedent. Per ambdues sèries de compostos (saturats i  $\omega$ 9-MUFAs), ALDRP estaria relacionada amb l'import peroxisomal d'àcids grassos d'una longitud de cadena situada entre els 20 i els 24 carbonis, ambdós inclosos.

La **inactivació d'ald**, al contrari que la d'**ald**, no condueix a l'acumulació de cap dels compostos analitzats de la sèrie  $\omega$ 9-MUFAs. Malgrat això, no es pot descartar



**FIGURA 4.7.** Nivells de  $\omega$ 9-MUFAs obtinguts pels ratolins Ald ko, Aldr ko, Ald/aldr ko i Wt/tg en els següents teixits: A) glàndula adrenal, B) nervi ciàtic i C) medulla espinal. Els resultats estan expressats en relació als nivells obtinguts pel WT. Cada columna (mitjana $\pm$ desviació estàndard) resulta de la valoració de diverses mostres. El nombre mínim de mostres analitzades per cada genotip en el cas de medulla espinal és de 4. Cadascuna correspon al teixit procedent d'un sol animal. Pel nervi ciàtic i la glàndula adrenal, el mínim de mostres analitzades per genotip és de dues. Cadascuna d'elles reuneix els òrgans de 4 animals. A cervell, fetge i sèrum no s'han trobat diferències significatives per cap d'aquests compostos. motiu pel qual no s'han representat. Les diferències significatives s'han determinat a través d'ANOVA seguit del test de Fisher (valors de P quan és significatiu respecte el WT:  $p \leq 0.05$  (\*) i  $p \leq 0.01$  (\*\*). Valors de P quan és significatiu respecte l'Aldr ko:  $p \leq 0.05$  (r) i  $p \leq 0.01$  (R)) o bé a través del test de Wilcoxon (valors de P quan és significatiu respecte el WT:  $p \leq 0.05$  (+)).

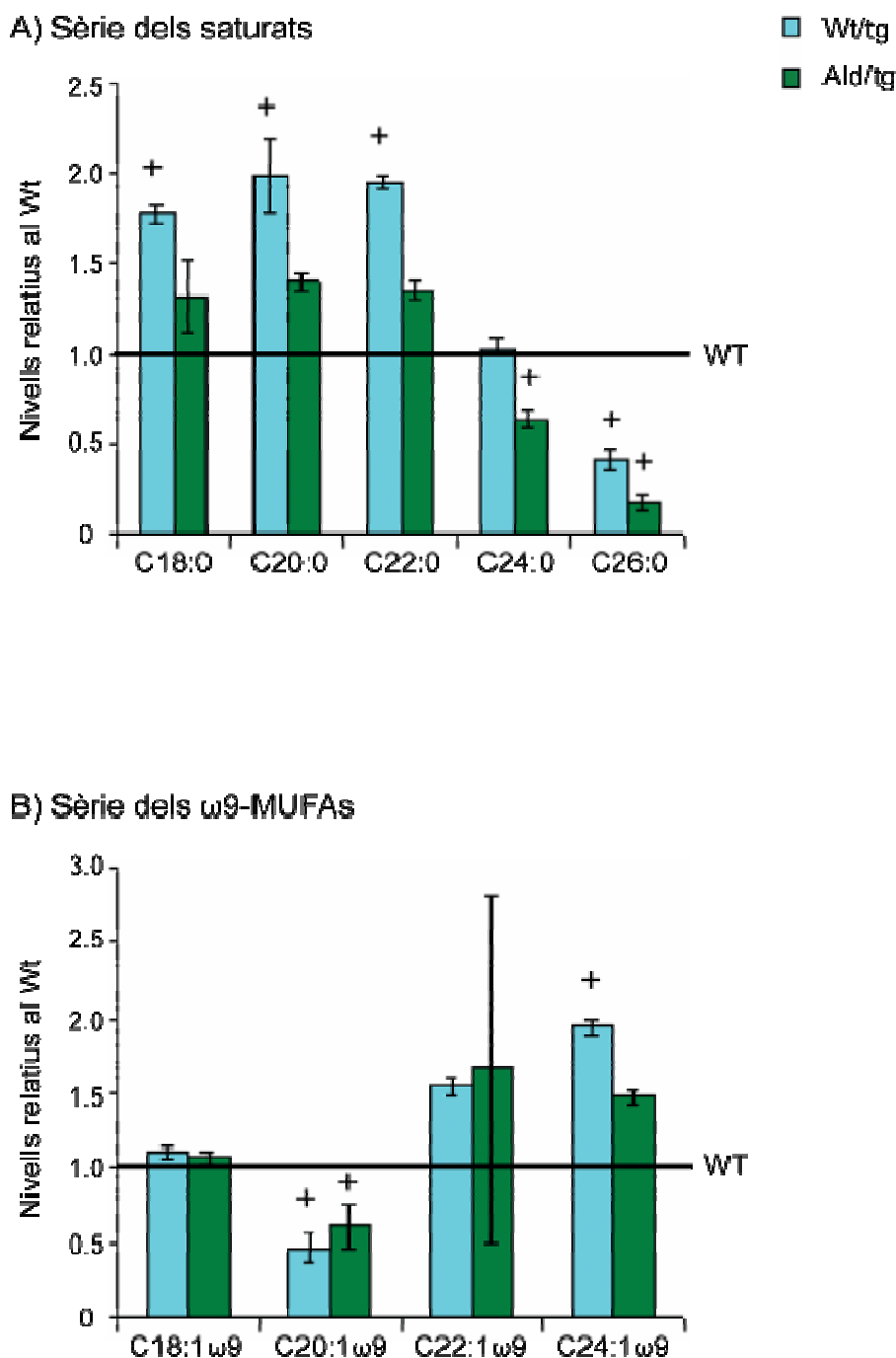


la implicació d'ALDP en el transport de  $\omega$ 9-MUFAs de cadena més llarga ( $\geq 26$  carbonis, ja que s'han descrit acumulacions de C26:1 $\omega$ 9 en fibroblastes i plasma de pacients X-ALD<sup>261</sup>.

Si bé no s'han observat increments en els compostos de la sèrie dels  $\omega$ 9-MUFAs en el ratolí **Ald ko**, s'ha detectat en canvi una disminució significativa dels nivells de C20:1 $\omega$ 9 tant a **glàndula adrenal** com a **nervi ciàtic** (figura 4.7A i B, respectivament). Aquest efecte, que no sembla associat a cap funció transportadora d'ALDP, recorda la disminució de C22:0 descrita anteriorment a la glàndula adrenal del ratolí Ald ko (figura 4.4, pàg 91). La disminució de C22:0 podria estar associada a una modificació en el procés d'elongació dels compostos de la seva sèrie, tal com hem comentat anteriorment. De la mateixa manera, la disminució de C20:1 $\omega$ 9 podria obeir a canvis en el procés d'elongació dels  $\omega$ 9-MUFAs. Si tenim en compte que s'han descrit activitats enzimàtiques d'elongació que tenen com a substracte tant a àcids grassos saturats com a  $\omega$ 9-MUFAs<sup>11,129</sup>, els dos efectes podrien ser deguts a la modificació d'un mateix enzim implicat en la síntesi d'ambdós compostos.

La **inactivació conjunta d'ald i d'aldr** dona lloc a uns increments de C20:1 $\omega$ 9 a **glàndula adrenal** i a **nervi ciàtic**, i de C24:1 $\omega$ 9 a la **glàndula adrenal**, que són comparables als detectats en el ratolí Aldr ko (figura 4.7A-B). Això reforça el paper d'ALDRP en el transport d'aquests compostos i exclou la participació d'ALDP en aquests processos. De forma contrària, però, s'han detectat uns nivells de C22:1 $\omega$ 9 tant a **glàndula adrenal** com a **nervi ciàtic** del **ratolí Ald/aldr ko** que són significativament majors que els observats en l'Aldr ko (figura 4.7A-B). També s'ha determinat una lleugera acumulació de C22:1 $\omega$ 9 a **medul.la espinal** del **ratolí Ald/aldr ko** (figura 4.7C), tot i que les inactivacions individuals d'ald i d'aldr no provoquen cap alteració detectable en aquest teixit. Aquest efecte sinèrgic de la doble inactivació d'ald i d'aldr sobre el nivell de C22:1 $\omega$ 9 en els tres teixits suggereix la implicació d'ALDP en el metabolisme d'aquest compost. A més, aquest fet és coincident a la glàndula adrenal amb un major increment de C22:0, C24:0 i C26:0 (figura 4.4, pàg 91) i a medul.la espinal amb un major augment de C24:0 (figura 4.5, pàg 92) respecte els nivells detectats en els ratolins Ald ko i Aldr ko (efectes sinèrgics en la sèrie dels saturats deguts a l'absència simultània d'ALDP i d'ALDRP). Establint un paral.lelisme entre ambdues sèries (saturats i  $\omega$ 9-MUFAs), el major acúmulo de C22:1 $\omega$ 9 detectat en l'Ald/aldr ko respecte l'Aldr ko podria ser degut a dos factors: la participació d'ALDP en

### NERVI CIÀTIC



**FIGURA 4.8.** A) Nivells de C18:0, C20:0, C22:0, C24:0 i C26:0 a nervi ciàtic dels ratolins Wt/tg i Ald/tg. B) Nivells de C18:1 $\omega$ 9, C20:1 $\omega$ 9, C22:1 $\omega$ 9 i C24:1 $\omega$ 9 a nervi ciàtic dels ratolins Wt/tg i Ald/tg. En ambdues gràfiques, els valors (mitjana  $\pm$  desviació estàndard) corresponen al percentatge respecte el total d'àcids grassos analitzats i estan expressats en relació al Wt. El nombre mínim de mostres analitzades per cada genotip és de dues. Cadascuna d'elles reuneix els òrgans procedents de 4 animals. Les diferències significatives respecte el WT s'han determinat a través del test de Wilcoxon (valors de  $p$ :  $p \leq 0.05$  (+)).

el transport de C22:1 $\omega$ 9 i/o una major síntesi d'aquest compost degut a l'acúmulo de precursors (C20:1 $\omega$ 9).

La **sobreexpressió d'ald** disminueix els nivells de C20:1 $\omega$ 9 tant a **glàndula adrenal** com a **nervi ciàtic**, i els de C24:1 $\omega$ 9 a **glàndula adrenal** (figura 4.7A-B). Tots aquests resultats reforcen el paper d'ALDRP en el transport d'aquests compostos. En canvi, en el nervi ciàtic del ratolí Wt/tg hem detectat un increment de C24:1 $\omega$ 9 (figura 4.7B). Aquest fet no semblaria estar relacionat amb cap funció transportadora d'ALDRP. Si comparem els perfils de les sèries dels saturats i dels  $\omega$ 9-MUFAs en el nervi ciàtic dels ratolins Wt/tg i Ald/tg (figura 4.8A-B, respectivament), s'observa una progressió decreixent per part de la sèrie dels saturats que contrasta amb la progressió creixent de la sèrie dels  $\omega$ 9-MUFAs. Tenint en compte que els saturats i els  $\omega$ 9-MUFAs són substractes comuns d'algunes elongases<sup>11,129</sup>, els perfils d'àcids grassos suggereixen la possibilitat que s'hagi produït una modificació en el procés de síntesi d'aquests compostos, de manera que la dels  $\omega$ 9-MUFAs es vegi afavorida en detriment de la dels saturats. Aquest efecte seria similar al que produeix l'oli de Lorenzo, un dels tractaments existents per a la X-ALD i que es basa en l'administració dietària de  $\omega$ 9-MUFAs (GTO/GTE (4:1))<sup>219</sup>. Tenint en compte això, hi podria haver una relació entre aquest fet i l'alt contingut de C18:1 $\omega$ 9 present a la dieta subministrada als nostres ratolins.

### 2.2.2.3. Sèrie dels $\omega$ 6-PUFAs.

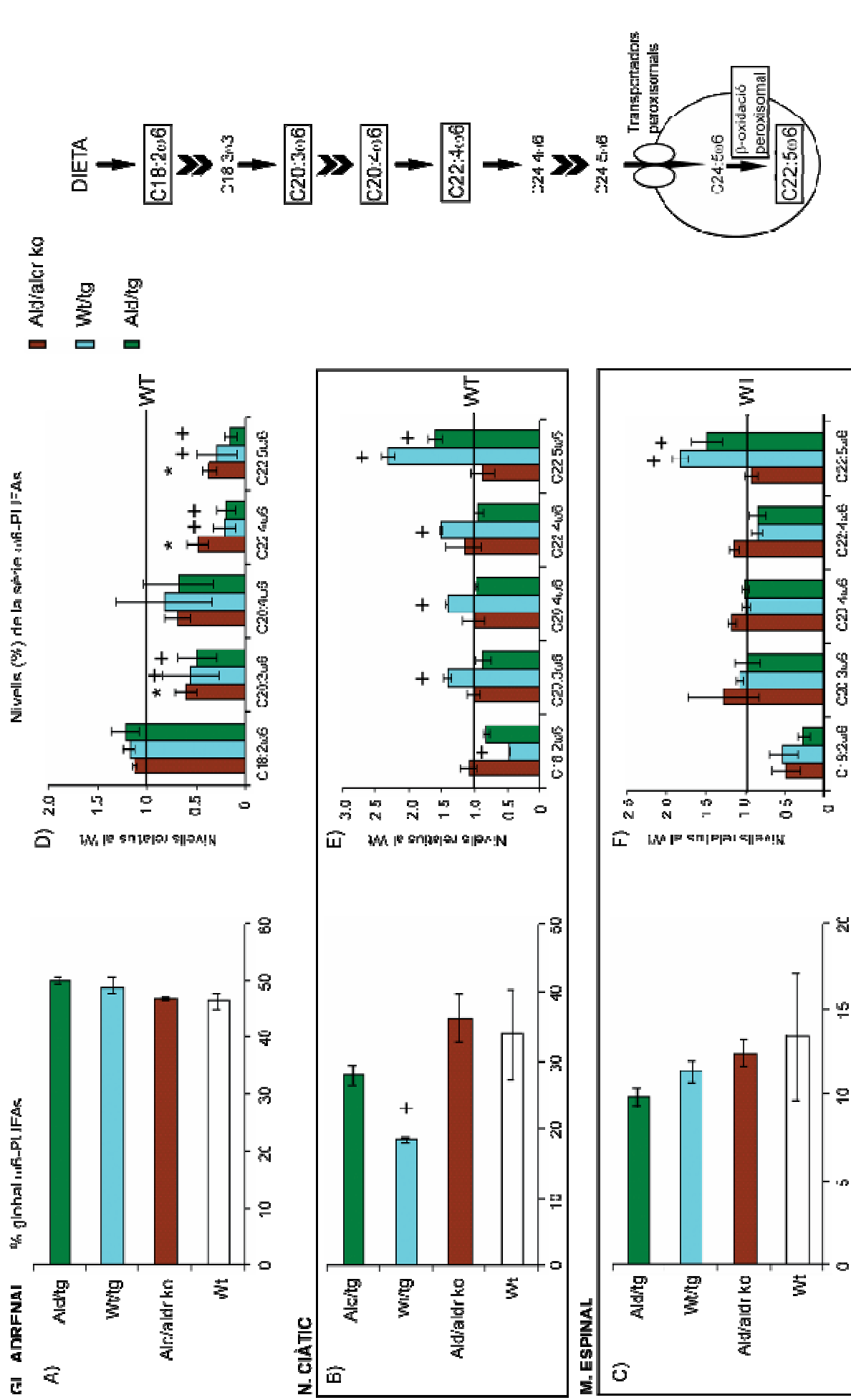
Els  $\omega$ 6-PUFAs valorats en aquest estudi inclouen l'àcid linoleic (C18:2 $\omega$ 6), l'àcid 8,11,14-eicosatrienoic (C20:3 $\omega$ 6), l'àcid araquidònic (C20:4 $\omega$ 6), l'àcid adrènic (C22:4 $\omega$ 6) i l'àcid 4,7,10,13,16-docosapentaenoic (C22:5 $\omega$ 6). El C18:2 $\omega$ 6 és el precursor de tota la sèrie i prové exclusivament de la dieta. Els altres compostos són sintetitzats al RE a través de l'acció de les elongases i de les desaturases, a excepció del C22:5 $\omega$ 6. Aquest compost és obtingut a través de la  $\beta$ -oxidació peroxisomal de l'àcid 4,7,10,13,16-tetracosapentaenoic (C24:5 $\omega$ 6). La sèrie dels  $\omega$ 6-PUFAs predomina en els teixits extraneurals, inclosos glàndula adrenal i fetge, així com en el sèrum. El C18:2 $\omega$ 6 és el més abundant dels  $\omega$ 6-PUFAs tant en teixits extraneurals com a nervi ciàtic. En canvi, en teixits del SNC predominen els compostos de cadena més llarga de la sèrie, especialment el C20:4 $\omega$ 6, que representa el 68.5% del total de  $\omega$ 6-PUFAs a cervell i el 40.4% a medulla espinal (taula A1, pàg 123). En canvi, aquest compost

només representa un 4.2% del total de  $\omega$ 6-PUFAs a nervi ciàtic, fet que posa de manifest el baix contingut en maquinària sintètica per a la sèrie dels  $\omega$ 6-PUFAs en aquest teixit.

Els nivells percentuals dels  $\omega$ 6-PUFAs analitzats per a cada teixit i genotip murí estan recollits a les taules A1-A6 (pàg 123-128). **No hem trobat diferències significatives** (respecte el Wt) **en cap dels teixits dels ratolins Ald ko i Aldr ko**. Pel què fa al ratolí **Ald/aldr ko**, hem detectat **nivells alterats de  $\omega$ 6-PUFAs a la glàndula adrenal** (figura 4.9D) però no en la resta de teixits estudiats. Així doncs, com en les sèries de saturats i de  $\omega$ 9-MUFAs, la glàndula adrenal és el teixit on més s'aprecien els efectes causats per l'absència d'ALDP i d'ALDRP. Això podria ser degut, tal com hem comentat anteriorment, a determinades característiques diferencials d'aquest teixit respecte a la resta de teixits estudiats, sobretot dels neurals. Entre elles hi hauria el major grau d'exposició de la glàndula adrenal a àcids grassos d'origen exogen, així com la seva composició de dímers ABCD i la seva distribució pels subtipus cel.lulars que l'integren.

La **glàndula adrenal** del ratolí **Ald/aldr ko** presenta una disminució significativa dels nivells de C20:3 $\omega$ 6, C22:4 $\omega$ 6 i C22:5 $\omega$ 6 (figura 4.9D). Tot i així, el percentatge global de  $\omega$ 6-PUFAs en aquest teixit no està alterat en comparació al Wt (figura 4.9A). Aquesta davallada general dels compostos de la sèrie suggereix una inhibició de la síntesi dels  $\omega$ 6-PUFAs, que es podria produir a causa d'un compost que no és transportat al peroxisoma degut a l'absència conjunta d'ALDP i d'ALDRP. Aquest compost podria actuar com a inhibidor de l'activitat de certs enzims de la via sintètica dels  $\omega$ 6-PUFAs, o bé regular a SREBP-1c i conduir a una disminució del nivell de transcripció dels gens codificadors d'aquests enzims. No es pot descartar tampoc que aquest efecte estigui mediat per algun receptor nuclear pel qual encara no es conegui la seva implicació en la regulació de la síntesi dels àcids grassos al RE. És important destacar que el percentatge d'àcid araquidònic a la glàndula adrenal del ratolí Ald/aldr ko es manté dins de la normalitat. El fet que aquest compost s'obtingui per desaturació del C20:3 $\omega$ 6 indicaria que les desaturases escaparien a aquestes modificacions, que afectarien exclusivament a les elongases (veure esquema adjacent a la figura 4.9).

La **sobreexpressió d'ALDRP** té efectes detectables a glàndula adrenal, nervi ciàtic i medulla espinal. A la **glàndula adrenal** dels ratolins **Wt/tg i Ald/tg** hi hem trobat una disminució significativa (respecte el Wt) dels nivells de C20:3 $\omega$ 3, C22:4 $\omega$ 6 i



**FIGURA 4.9.** A) Percentatge global de la sèrie dels n6-PUFAs a glàndia adrenal (A), nervi ciàtic (B) i medulla espina (C) dels ratolins Wt, Ald/aldr ko, Wt/tg i Ald/tg. Els valors corresponen al percentatge mitjana desviació estàndar respecte a total d'àcids grassos analitzats. B) Nivells de C18:2n6, C20:3n6, C20:4n6 i C22:5n6 a glàndia adrenal (D), nervi ciàtic (E) i medulla espina (F) dels ratolins Ald/aldr ko, Wt/tg i Ald/tg. Els valors (mitjana desviació estàndar) estan expressats respecte als nivells obtinguts pel Wt. Els nivells de C18:2n6 a medulla espina són molt variables i s'han exclòs de l'anàlisi estadística. El nombre mínim de mostres analitzades per cada teixit i genotip és de dues. Per a glàndia adrenal i nervi ciàtic, cada mostra reuneix els òrgans procedents de 4 animals. Per a medulla espina, cada mostra correspon al teixit d'un animal. Les diferències significatives respecte al Wt s'han determinat a través d'ANOVA seguit pel test de Fisher ( $p \leq 0.05$  (\*); 0 be a través del test de Wilcoxon (valors de  $p \leq 0.05$  (+); L'esquema acompanyant representa la via de síntesi dels n6 PUFAs. Les fletxes indiquen reaccions d'elongació i els signes >>> indiquen reaccions de desaturació.

C22:5 $\omega$ 6. Aquestes anomalies, sorprenentment, coincideixen amb les que produeix la doble absència d'ALDP i d'ALDRP en aquest teixit (figura 4.9D). Això posa de manifest que la sobreexpressió d'ALDRP també podria donar lloc a una inhibició de la síntesi dels  $\omega$ 6-PUFAs. En aquest cas, el mecanisme podria implicar a un compost importat massivament al peroxisoma degut a la sobreexpressió d'ALDRP. Aquest compost seguiria algun dels processos metabòlics que ocorren al peroxisoma i donaria lloc a un producte capaç d'inhibir l'activitat enzimàtica de les elongases, o de regular a SREBP-1c i produir una disminució de l'expressió dels gens codificadors d'aquests enzims. Una altra possibilitat seria que la sobreexpressió d'ALDRP provoqués l'acumulació d'un determinat compost degut a una alteració de la composició de dímers ABCD a la membrana peroxisomal (desplaçament de la formació de determinats dímers ABCD a favor de la formació d'altres). Aquest compost, al igual que en els anteriors casos, actuaria d'inhibidor de l'activitat o de l'expressió de les elongases, produint una disminució de la síntesi de  $\omega$ 6-PUFAs.

En teixits neurals, la sobreexpressió d'ALDRP té un efecte diferent a l'observat a la glàndula adrenal. Tant a **nervi ciàtic** com a **medul·la espinal** dels ratolins **Wt/tg** i **Ald/tg** hem detectat un increment significatiu del nivell de C22:5 $\omega$ 6 (fig 4.9E i F, respectivament). Aquest fet es posa clarament de manifest a través de la relació C22:5 $\omega$ 6/C22:4 $\omega$ 6, que es troba augmentada de forma significativa respecte el Wt en ambdós teixits del Wt/tg i de l'Ald/tg (veure taula 4.2). Tenint en compte que el C22:5 $\omega$ 6 s'obté a través de la  $\beta$ -oxidació peroxisomal (veure esquema adjunt a la figura 4.9), els nostres resultats suggereixen amb força que la sobreexpressió d'ALDRP afavoreix aquest procés en ambdós teixits. És molt probable que la sobreexpressió d'ALDRP estigui relacionada amb un augment del transport peroxisomal del seu precursor C24:5 $\omega$ 6, tot i que les nostres dades són insuficients per confirmar-ho.

	Wt	Wt/tg	Ald/tg
<b>N. Ciàtic</b>	1.3	2.0	2.3
<b>M. Espinal</b>	0.3	0.6	0.5

**Taula 4.2.** Relació C22:5 $\omega$ 6/C22:4 $\omega$ 6 a nervi ciàtic i medul·la espinal. Els valors del Wt/tg i de l'Ald/tg per a cada teixit són significativament majors que el del Wt (diferències establertes a través del test de Wilcoxon,  $p \leq 0.05$ ).

A **nervi ciàtic** del ratolí **Wt/tg** també hem detectat un augment de C20:3 $\omega$ 6, C20:4 $\omega$ 6 i C22:4 $\omega$ 6 (a més del de C22:5 $\omega$ 6), així com una davallada de C18:2 $\omega$ 6

(figura 4.9E). La disminució de C18:2 $\omega$ 6, precursor de la sèrie, comporta una reducció significativa del percentatge global de  $\omega$ 6-PUFAs (figura 4.9B) degut al fet que aquest compost és el més abundant de la sèrie a nervi ciàtic (92% del total de  $\omega$ 6-PUFAs, taula A.1 pàg 123). La davallada de C18:2 $\omega$ 6 podria explicar-se com a resultat d'una reducció en el seu procés d'internalització, ja que és un àcid gras essencial i prové exclusivament de la dieta, però l'absència d'aquesta anomalia en altres teixits exclouria aquesta hipòtesi. Alternativament, el nivell de C18:2 $\omega$ 6 a nervi ciàtic del Wt/tg podria veure's reduït a causa d'un augment de la síntesi de  $\omega$ 6-PUFAs. Els increments de C20:3 $\omega$ 6, C20:4 $\omega$ 6, C22:4 $\omega$ 6 i C22:5 $\omega$ 6 detectats a nervi ciàtic del Wt/tg (figura 4.9E) podrien donar suport a aquesta hipòtesi, tot i que no se'n poden descartar d'altres. És important destacar que l'augment de C22:5 $\omega$ 6 no segueix la mateixa progressió que la resta de compostos de la sèrie, sinó que és significativament major, tal com hem posat en evidència mitjançant la relació C22:5 $\omega$ 6/C22:4 $\omega$ 6 (taula 4.2). Això seria indicatiu de l'existència de dos efectes diferents sobre la sèrie dels  $\omega$ 6-PUFAs en el nervi ciàtic del ratolí Wt/tg: un afectaria de forma exclusiva el C22:5 $\omega$ 6 i l'altre afectaria a la resta de compostos.

Cal tenir present, finalment, que el **nervi ciàtic** del ratolí **Ald/tg** presenta una alteració dels nivells de C22:5 $\omega$ 6 però no de la resta de compostos de la sèrie (figura 4.9E). Això suggereix que l'efecte de la sobreexpressió d'ALDRP sobre el nivell de C22:5 $\omega$ 6 és independent de la presència d'ALDP, mentre que l'efecte sobre la resta de compostos en podria ser depenent.

#### 2.2.2.4. Sèrie dels $\omega$ 3-PUFAs.

La sèrie dels  $\omega$ 3-PUFAs és minoritària en tots els teixits estudiats, representant entre el 3 i el 18% del total d'àcids grassos analitzats. Entre els compostos que hem valorat hi figuren l'àcid linolènic (C18:3 $\omega$ 3), l'àcid 5,8,11,14,17-eicosapentaenoic (C20:5 $\omega$ 3), l'àcid 7,10,13,16,19-docosapentaenoic (C22:5 $\omega$ 3) i l'àcid 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic (C22:6 $\omega$ 3). El C18:3 $\omega$ 3 és el precursor de la sèrie, i la seva única font d'obtenció és la dieta. La síntesi de la majoria de compostos es realitza al RE a través d'un procés similar al de la sèrie  $\omega$ 6-PUFAs, on es combinen reaccions d'elongació i de desaturació. El C22:6 $\omega$ 3 s'obté a través de la  $\beta$ -oxidació peroxisomal de l'àcid 4,7,10,13,16,19-tetracosahexaenoic (C24:6 $\omega$ 3), de forma anàloga al C22:5 $\omega$ 6. El C22:6 $\omega$ 3 és el compost més abundant de la sèrie en teixits del SNC, on representa més del 90% del total de  $\omega$ 3-PUFAs. A nervi ciàtic, en canvi, destaca pel seu baix

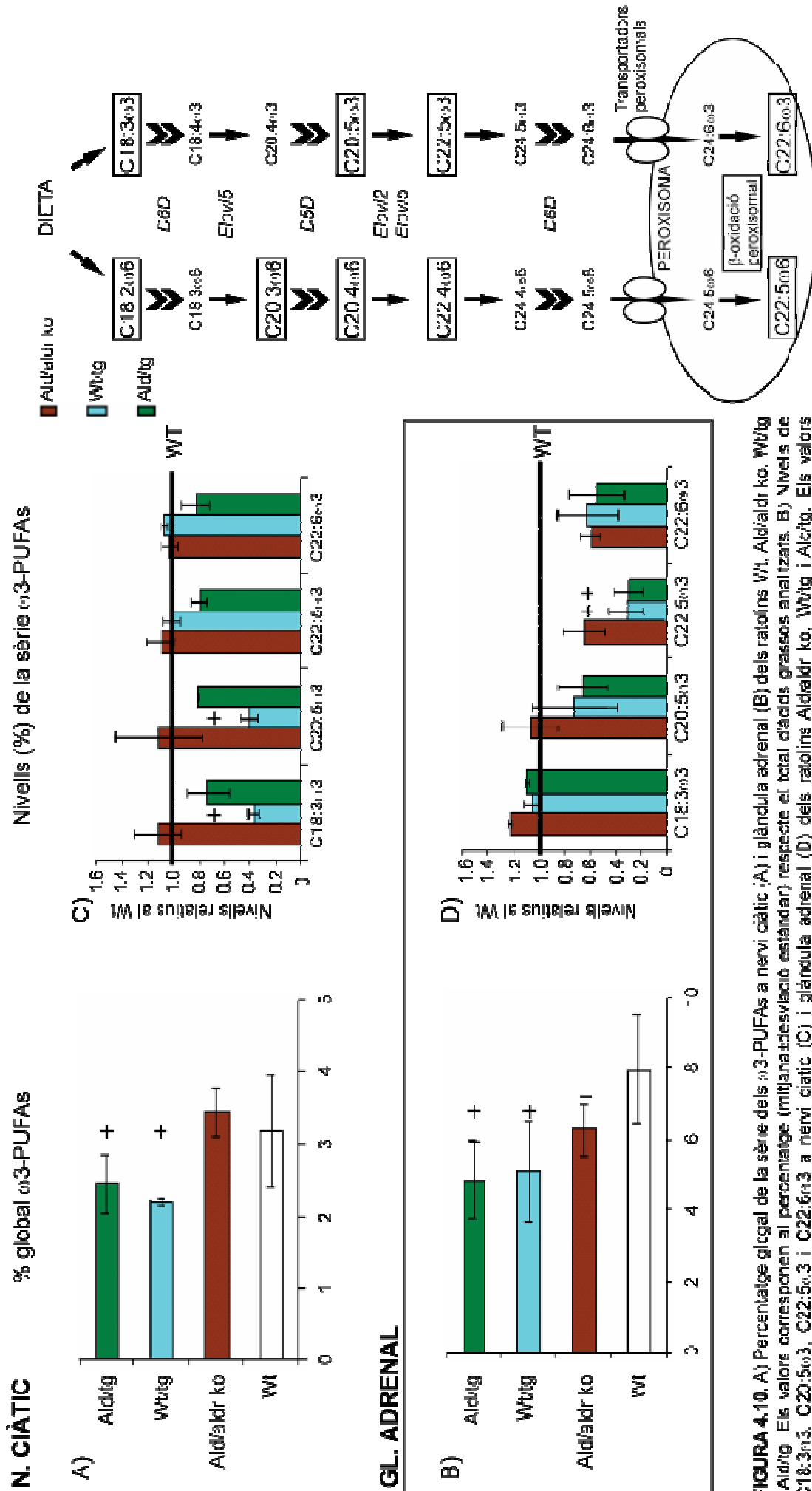
percentatge, el menor de tots els teixits estudiats (37% del total de  $\omega$ 3-PUFAs). En teixits extraneurals, el C22:6 $\omega$ 3 també és el compost més abundant, encara que la glàndula adrenal mostra una gran riquesa en altres  $\omega$ 3-PUFAs com són el C18:3 $\omega$ 3 i el C22:5 $\omega$ 3.

Els valors obtinguts en la determinació dels  $\omega$ 3-PUFAs en cada teixit i genotip es troben recollits a les taules A1-A6 (pàg 123-128). Les **inactivacions d'ald, d'aldr o d'ambdós gens alhora** no donen lloc a **cap alteració detectable** en els nivells dels  $\omega$ 3-PUFAs en cap dels teixits analitzats (és per això que a la figura 4.10 només s'han inclòs, a mode il.lustratiu, els valors corresponents al ratolí Ald/aldr ko). Aquest fet exclouria qualsevol implicació d'ALDP o d'ALDRP en el metabolisme d'aquests compostos.

Les **úniques** variacions en els nivells de  $\omega$ 3-PUFAs s'han trobat a **glàndula adrenal** i **nervi ciàtic** dels ratolins **Wt/tg i Ald/tg** (figura 4.10). A **glàndula adrenal** hi ha una disminució del percentatge global de la sèrie  $\omega$ 3-PUFAs en ambdós genotips (figura 4.10B). Aquest fet correlaciona en els dos casos amb una disminució significativa del nivell de C22:5 $\omega$ 3 (figura 4.10D). Pel què fa a **nervi ciàtic**, també hem detectat una disminució del percentatge global de  $\omega$ 3-PUFAs en ambdós genotips (figura 4.10A). La davallada de la sèrie  $\omega$ 3-PUFAs a nervi ciàtic del ratolí Wt/tg correlaciona amb una disminució de C18:3 $\omega$ 3 i de C20:5 $\omega$ 3, mentre que en l'Ald/tg és deguda a petites disminucions no significatives de tots els compostos de la sèrie (figura 4.10C).

Els canvis que acabem de descriure en la sèrie dels  $\omega$ 3-PUFAs tant a **glàndula adrenal** com a **nervi ciàtic** dels ratolins **Wt/tg i Ald/tg** tenen certs punts de coincidència amb els observats en la sèrie dels  $\omega$ 6-PUFAs. En el cas de la glàndula adrenal, la disminució del nivell de diferents compostos de la sèrie dels  $\omega$ 6-PUFAs (C20:3 $\omega$ 6, C22:4 $\omega$ 6 i C22:5 $\omega$ 6, figura 4.9D) suggeriria una reducció de la síntesi dels compostos d'aquesta sèrie. Aquest efecte, tal com hem comentat anteriorment, estaria causat per la sobreexpressió d'ALDRP, que conduiria a una modificació del transport peroxisomal. Aquesta modificació resultaria en l'acumulació d'un compost efector, capaç d'inhibir l'activitat de les elongases o de disminuir el nivell d'expressió dels gens codificadors d'aquests enzims a través de la regulació d'un receptor nuclear. Tenint en compte que els  $\omega$ 6-PUFAs i els  $\omega$ 3-PUFAs són substractes comuns d'algunes elongases<sup>7,9</sup>, la inhibició d'un d'aquests enzims tindria efectes semblants sobre





**FIGURA 4.10.** A) Percentatge global de la sèrie dels ω3-PUFAs a nervi ciliàtic (A) i glàndula adrenal (B) dels ratolins Wt, Ald/aldr ko, Wwtg i Aldltg. Els valors corresponen al percentatge (mitjanatze i desviació estàndard) respecte al total d'àcids grassos analitzats. B) Nivells de C18:3n3, C20:5n3, C22:5n3 i C22:6n3 a nervi ciliàtic (C) i glàndula adrenal (D) dels ratolins Ald/aldr ko, Wwtg i Aldltg. Els valors (mitjanatze i desviació estàndard) estan expressats respecte als nivells obtinguts pel Wt. El nombre mínim de mostres analitzades per cada teixit i genotip és de dues. Cada mostra reuneix els òrgans procedents de 4 animals. Les diferències significatives respecte el WT s'han determinat a través d'ANOVA seguit pel test de Fisher ( $p \leq 0.05$ ) o bé a través del test de Wilcoxon (valors de  $p \leq 0.05$  (\*)). L'esquema adjunt representa la via de síntesi dels ω3-PUFAs. Les fletxes indiquen reaccions d'elongació i els signes >>> indiquen reaccions de desaturació (elov= elongasa; D5D: D5 desaturasa; D6D: D6 desaturasa

ambdues sèries de compostos, fet que podria explicar la reducció detectada en el nivell de C22:5 $\omega$ 3 (figura 4.9D).

Pel què fa al **nervi ciàtic** del ratolí **Wt/tg**, el més important és la coincidència en les davallades de C18:2 $\omega$ 6 i de C18:3 $\omega$ 3, ja que ambdós són àcids grassos essencials i precursors d'una sèrie d'àcids grassos ( $\omega$ 6-PUFAs i  $\omega$ 3-PUFAs, respectivament). Això seria indicatiu de l'existència d'un efecte comú de la sobreexpressió d'ALDRP sobre ambdues sèries d'àcids grassos. Tal com hem indicat en la secció precedent, el perfil d'àcids grassos de la sèrie dels  $\omega$ 6-PUFAs en aquest teixit (disminució de C18:2 $\omega$ 6 acompanyada d'un augment de la resta de compostos de la sèrie, figura 4.9E) podria explicar-se a través d'un augment del nivell de producció d'aquesta via. En aquest cas, i tenint en compte l'existència d'enzims comuns per a la via dels  $\omega$ 6-PUFAs i dels  $\omega$ 3-PUFAs, podria existir un augment paral·lel de la síntesi dels  $\omega$ 3-PUFAs. Això explicaria, per exemple, el manteniment dels nivells de C22:5 $\omega$ 3 i de C22:6 $\omega$ 3 dins de la normalitat, tot i la disminució de C18:3 $\omega$ 3 en el nervi ciàtic del ratolí **Wt/tg** (figura 4.10C). De tota manera, és important destacar que l'absència d'aquestes alteracions d'ambdues sèries en el nervi ciàtic del ratolí **Ald/tg** indicarien que, sigui quin sigui el mecanisme pel qual es produeixen, aquest seria dependent de la presència d'ALDP (figura 4.9E i 4.10C).

#### **2.2.2.5. Correlació dels nivells d'àcids grassos amb els altres trets fenotípics dels ratolins mutants.**

En pacients X-ALD no ha estat possible d'establir cap correlació genotip-fenotip, tal com hem comentat en la introducció. De la mateixa manera, tampoc s'ha trobat una correlació entre els nivells plasmàtics de C26:0 i la forma clínica. En un estudi recent, però, s'ha pogut relacionar el fenotip clínic dels pacients amb els nivells de VLCFAs (de longitud compresa entre els 26 i els 30 carbonis, ambdós inclosos) detectats en zones sanes de la matèria blanca del cervell<sup>257</sup>. En concret, els pacients CCALD presenten increments majors de C26:0 en aquestes zones (3 vegades respecte del grup control) que els pacients AMN (1.9 vegades més d'aquest compost respecte del grup control).

El ratolí **Ald/aldr ko** presenta un fenotip neurològic molt més sever i d'inici més temprà que el ratolí **Ald ko**<sup>254</sup>. Aquest agreujament es manifesta tant a nivell histològic, electrofisiològic i de comportament, i també inclou signes de reacció inflammatòria a la

medul.la espinal<sup>254</sup>. Malgrat això, als 8 mesos de vida tant l'Ald ko com l'Ald/aldr ko mostren uns nivells similars de C26:0 a cervell, medul.la espinal i nervi ciàtic, tal com hem il.lustrat a la figura 4.3 (pàg. 89), la qual cosa posa de manifest l'absència de correlació entre els nivells de C26:0 a aquesta edat i la severitat del fenotip. A glàndula adrenal, en canvi, els ratolins Ald/aldr ko presenten una acumulació sinèrgica de C22:0, C24:0 i C26:0 (figura 4.4, pàg 91), fet que correlaciona amb un marcat increment del nombre d'agulles de colesterol i una major acumulació de lipid droplets en quasi totes les cèl.lules adrenocorticals<sup>254</sup>.

La sobreexpressió d'*aldr* en teixits murins redueix els nivells de VLCFAs, sobretot de C26:0, tal com hem comentat en apartats anteriors d'aquest treball. A més d'això, hem posat de manifest altres efectes sobre les sèries dels  $\omega$ 9-MUFAs,  $\omega$ 3-PUFAs i  $\omega$ 6-PUFAs. En aquest aspecte, cal destacar les observacions realitzades en el nervi ciàtic del ratolí Wt/tg, on la sobreexpressió d'*aldr* afecta totes les sèries d'àcids grassos. Tot i que els canvis en els nivells d'àcids grassos podrien tenir conseqüències negatives en l'estructura de les membranes i, per tant, en la seva funcionalitat, no s'han trobat evidències que això succeeixi en els ratolins Ald/tg i Wt/tg. Ambdós ratolins han estat sotmesos a testos neurològics, electrofisiològics i histopatològics (els mateixos que han posat de manifest el fenotip neurològic en els ratolins Ald ko i Ald/aldr ko) i no han mostrat diferències significatives respecte el Wt en cap d'ells<sup>254</sup>. En conseqüència, la sobreexpressió d'ALDRP és capaç de prevenir el fenotip neurològic en el ratolí Ald/tg, i els efectes que pugui tenir sobre les diverses sèries d'àcids grassos no van en detriment d'altres aspectes fisiològics. Així doncs, tenint en compte la gravetat de la malaltia X-ALD, i el fet que actualment no existeix una teràpia efectiva pel seu tractament, creiem important de continuar amb el desenvolupament d'aquesta estratègia terapèutica per a una possible aplicació futura en pacients.