

Metabolismo

- **Artículos originales:** Murine deficiency of peroxisomal L-bifunctional protein (EHHADH) causes medium-chain 3-hydroxydicarboxylic aciduria and perturbs hepatic cholesterol homeostasis. **Ranea-Robles P et al. Cell Mol Life Sci.** 2021.
- Deficiency of peroxisomal L-bifunctional protein (EHHADH) causes male-specific kidney hypertrophy and proximal tubular injury in mice. **Ranea-robles P et al., Kidney360.** 2021.

Destapando las funciones ocultas del peroxisoma en el metabolismo del colesterol y el riñón

Pablo Ranea-Robles

Nuestras células están formadas por orgánulos que se encargan del correcto funcionamiento celular, algunos de ellos tan conocidos como la mitocondria. Sin embargo, cuando hablamos de orgánulos, pocas veces pensamos en el **peroxisoma**.

El peroxisoma es considerado un orgánulo detoxificador, e históricamente, ha recibido poca atención por parte del mundo científico. Sin embargo, el descubrimiento de las enfermedades peroxisomales, las cuales tienen consecuencias graves para la salud, puso de manifiesto la importancia del peroxisoma en el equilibrio celular (homeostasis), en particular en lo que se refiere al metabolismo de cierto tipo de grasas o lípidos¹. Algunas de las enfermedades peroxisomales se producen por fallos en las enzimas del peroxisoma, unas proteínas necesarias para que una reacción química ocurra a más velocidad. En el peroxisoma, hay enzimas que participan en el metabolismo de los ácidos grasos y, en nuestros estudios nos propusimos **investigar la función de la enzima peroxisomal EHHADH**, una de las menos estudiadas.

Uno de los puntos importantes de nuestra investigación y que nos llevaron a formular las hipótesis de los estudios es que la proteína EHHADH aumenta su expresión en situaciones de demanda energética como el ayuno, o en defectos mitocondriales de la β -oxidación, lo cual sugiere un papel más importante que el que se le ha dado históricamente. Los pocos estudios realizados hasta ahora sugerían que la función de la proteína EHHADH está directamente relacionada con el metabolismo de los ácidos dicarboxílicos^{2,3}. Estos compuestos se generan por otro proceso metabólico, llamado ω -oxidación (omega-oxidación). En nuestros estudios publicados recientemente en las revistas *Cellular and Molecular Life Sciences* y *Kidney360*, estudiamos la función de la enzima peroxisomal EHHADH y su impacto en el metabolismo del colesterol y el correcto funcionamiento renal utilizando modelos celulares y animales y técnicas de espectrometría de masas^{4,5}.

En profundidad...

La enzima EHHADH forma parte del sistema de β -oxidación peroxisomal, una vía encargada de metabolizar ácidos grasos, de forma similar a como

ocurre en la mitocondria. Sin embargo, el peroxisoma solo metaboliza ciertos tipos de ácidos grasos; es decir, está muy especializado. Mediante el sistema de β -oxidación, el peroxisoma metaboliza compuestos como los ácidos biliares, importantes en la digestión de grasas; los ácidos grasos de cadena muy larga, que son aquellos de 22 carbonos o más; o los ácidos dicarboxílicos de cadena larga. De las cuatro reacciones enzimáticas que consiste la β -oxidación peroxisomal, EHHADH, o proteína L-bifuncional, cataliza la segunda y la tercera reacción de la β -oxidación. Mientras que la otra proteína bifuncional del peroxisoma, HSD17B4 o D-bifuncional, participa en la β -oxidación de la mayoría de los compuestos indicados anteriormente, **la función de EHHADH permanece desconocida**. Además, al contrario que con el gen HSD17B4, no se conoce aun ningún caso de pacientes con mutaciones en el gen EHHADH, lo cual ha lastrado el avance en la investigación sobre la proteína.

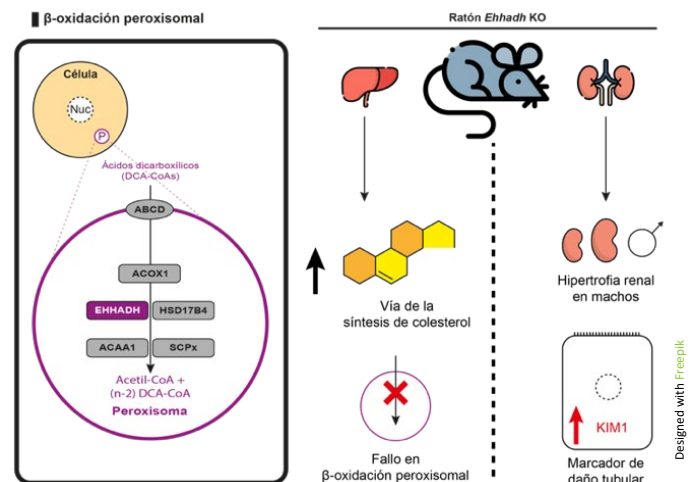


Figura 1. Esquema de los resultados obtenidos por Ranea-Robles et al. Sobre la función de la proteína EHHADH^{4,5}. Representación esquemática del proceso de β -oxidación peroxisomal de los ácidos carboxílicos (DCAs), en el cual está implicada la enzima EHHADH (izq); y resultados principales obtenidos en estos estudios relativos al hígado y el riñón de los ratones deficientes en EHHADH (der.). Figura diseñada con imágenes del repositorio Freepik.

Dado que teóricamente los ácidos dicarboxílicos podrían ser metabolizados tanto en la mitocondria como en el peroxisoma, primero usamos **CRISPR/Cas9**, la laureada técnica de edición genética descubierta por el investigador español Francisco Mojica, para **eliminar genes clave en la β -oxidación mitocondrial y peroxisomal** en células HEK-293, un tipo de células inmortal que permite a los investigadores estudiar funciones celulares. Cultivamos estas células con un ácido dicarboxílico de cadena larga, el ácido hexadecanodioico (C16-DCA), y observamos que aquellas células con defectos en la β -oxidación mitocondrial metabolizaban perfectamente el C16-DCA, mientras que las células con defectos en la β -oxidación peroxisomal eran completamente defectuosas. Estos resultados confirmaron el papel esencial del peroxisoma en el metabolismo de los ácidos dicarboxílicos.

Sin embargo, este modelo celular se queda corto a la hora de estudiar el papel fisiológico de una proteína ya que es un método in vitro, así que decidimos **usar ratones con un defecto genético en el gen que codifica la proteína EHHADH**. Para realizar estudios de los fluidos y órganos de estos ratones y compararlos con aquellos cuya enzima está intacta (ratones control), utilizamos técnicas avanzadas de espectrometría de masas junto con el uso de isótopos estables de ácidos dicarboxílicos que nos permiten detectar diferencias entre el carbono-13, muy poco abundante en la naturaleza, y el carbono-12 el cual predomina. Con estas técnicas, observamos que **aquellos ratones sin la proteína EHHADH tenían un metabolismo defectuoso de los ácidos dicarboxílicos**³.

El siguiente objetivo de estos estudios era investigar las posibles consecuencias fisiológicas de la deficiencia de EHHADH. Para ello, estudiamos los dos órganos en los que el gen EHHADH se expresa de forma más abundante, el hígado y el riñón, que tienen un elevado

número de peroxisomas. Hicimos secuenciación de ARN de estos órganos de los ratones defectuosos en EHHADH y comparamos el perfil de transcripción con el de los ratones control. En el hígado, encontramos una activación de los genes implicados en la síntesis de colesterol, como la hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMGCR), en aquellos animales sin la proteína EHHADH. Por tanto, nuestros datos indican que una **deficiencia en la proteína EHHADH impacta directamente en la homeostasis del metabolismo del colesterol**. En cuanto al riñón, nos llamó mucho la atención que los riñones de ratones macho deficientes en EHHADH eran más grandes que los riñones control. Estudiando la estructura de estos riñones observamos un crecimiento de tamaño de las células del túbulo proximal del riñón, es decir, **una hipertrofia**. También identificamos un marcador fluorescente de daño tubular, la proteína KIM-1, solo en los riñones de ratones macho sin la proteína EHHADH. Además, mediante la castración de los ratones macho deficientes en EHHADH demostramos que las hormonas sexuales juegan un papel fundamental en el desarrollo del daño renal en estos ratones. Por último, también identificamos cambios metabólicos en unas moléculas llamadas glucosilceramidas y galactosilceramidas, que se relacionan con el aumento del tamaño del riñón⁴.

En conclusión...

Nuestros estudios demuestran la **función de EHHADH** en el metabolismo de ácidos dicarboxílicos y su impacto en la homeostasis del metabolismo del colesterol y el funcionamiento renal, aspectos totalmente desconocidos hasta ahora (**figura 1**). Estos datos pueden servir para la **búsqueda de biomarcadores de una hipotética deficiencia de EHHADH** en humanos, que podría ser descubierta en un futuro próximo, con el auge de las técnicas de secuenciación masiva del genoma.

Referencias:

1. Watergan HR Ferdinandusse S, Wanders RJA. 2016. Human disorders of peroxisome metabolism and biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1863:922-933.
2. Ding J, Loizides-Mangold U, Rando G, Zoete V, Michelin O, reddy JK, Wahli W, Riezman H, Thoerns B. 2013. The peroxisomal enzyme L-PBE is required to prevent the dietary toxicity of medium-chain fatty acids. *Cell rep.* 5:248-258.
3. Houten SM, Denis S, Argmann CA, Jia Y, Ferdinandusse S, Reddy JK, Wanders RJA. 2012. Peroxisomal L-bifunctional enzyme (EHHADH) is essential for the production of medium-chain dicarboxylic acids. *J Lipid Res.* 53:1296-1303.
4. Ranea-Robles P, Violante S, Argmann C, Dodatko T, Bhattacharya D, Chen H, Yu C, Friedman SL, Puchowicz M, Houten SM. 2021. Murine deficiency of peroxisomal L-bifunctional protein (EHHADH) causes medium-chain 3-hydroxydicarboxylic aciduria and perturbs hepatic cholesterol homeostasis. *Cell Mol Life Sci.* 78:5631-5646.
5. Ranea-Robles P, Portman K, Bender A, Lee K, He JC, Mulholland DJ, Arbmman C, Houten SM. 2021. Deficiency of peroxisomal L-bifunctional protein (EHHADH) cause male-specific kidney hypertrophy and proximal tubular injury in mice. *Kidney360 ASN.* 10.34067/KID.0003772021.

Conflictos de interés

El autor de este artículo ha participado en los estudios descritos y es coautor de los artículos originales.

Sobre el autor

Pablo Ranea-Robles es investigador postdoctoral en la Icahn School of Medicine at Mount Sinai, en el laboratorio de Sander Houten. Licenciado en Biología por la Universidad de Granada y doctor en Biomedicina por la Universidad de Barcelona/IDIBELL, sus investigaciones se centran en el estudio del metabolismo celular con un especial interés en el metabolismo de las grasas en la mitocondria y el peroxisoma.

 pranea88@gmail.com

 [@pranea](https://twitter.com/pranea)

 [Pablo Ranea-Robles](https://www.linkedin.com/in/PabloRanea-Robles)

ECUSA News&Views Editors-in-Chief:

Antonio Cembellin Prieto, B.S.

Fernando de Miguel, Ph.D

Copyright © 2021 Españoles científicos en Estados Unidos (ECUSA) News&Views