



Morellato, Agustín Ezequiel

Relevancia del glutatión y su metabolismo en la defensa contra el formaldehído endógeno derivado del metabolismo tumoral



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Morellato, A. E. (2026). *Relevancia del glutatión y su metabolismo en la defensa contra el formaldehído endógeno derivado del metabolismo tumoral. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/6112>*

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Relevancia del glutatión y su metabolismo en la defensa contra el formaldehído endógeno derivado del metabolismo tumoral

TESIS DOCTORAL

Agustín Ezequiel Morellato

morellatoagustin@gmail.com

Resumen

El formaldehído es un compuesto químico electrófilo altamente reactivo, subproducto de importantes reacciones metabólicas y presente en nuestro entorno como contaminante ambiental. Si bien se consideraba la formación de enlaces aberrantes entre cadenas de ADN o entre ADN y proteínas como el único mecanismo de daño importante por el cual causaba citotoxicidad, mutaciones inactivantes de genes codificantes para enzimas que detoxifican formaldehído dan lugar a síndromes hereditarios con insuficiencia de la médula ósea, inclusive en presencia de mecanismos activos dedicados a la reparación del daño al ADN. Esto sugirió que debían existir otros mecanismos diferentes por el cual el formaldehído logra causar citotoxicidad, lo cual se vuelve de gran relevancia en un contexto de cáncer donde la alta tasa metabólica promueve su presencia y convierte a sus mecanismos de daño y defensa en potenciales blancos terapéuticos.

Inicialmente se propuso evaluar si el formaldehído causa una desregulación del equilibrio redox celular y, de ser así, cómo se ve involucrado el glutatión. Se descubrió que la reacción espontánea entre formaldehído y glutatión altera el potencial redox de este último, y que la activa síntesis de glutatión se vuelve esencial para la supervivencia celular ante tratamientos con formaldehído. A su vez, de entre un panel de líneas celulares tumorales más variado, se logró identificar que las células A549 de adenocarcinoma de pulmón eran las únicas que no dependen completamente del glutatión para sobrevivir a los tratamientos con formaldehído. Por el contrario, sí dependen fuertemente de la activa entrada de cistina al interior celular, proceso que se encuentra más activo en estas células al contar con altos niveles de actividad del factor de transcripción NRF2. Finalmente, trabajando con células A549 en un modelo de membrana corioalantóica de pollo, se observó que la inactivación simultánea de la importación de cistina y la síntesis de glutatión permite una reducción notoria en el tamaño de los tumores formados a partir de células A549.

Todo esto sugiere que el metabolismo del glutatión adquiere un rol muy importante en los mecanismos de defensa contra el formaldehído en células tumorales, pero que estos mecanismos pueden reconfigurarse en tumores con alta actividad de NRF2. Así, el diseño de estrategias terapéuticas con múltiples inhibidores de dicho metabolismo requerirá estudiar y considerar las alteraciones propias de cada caso.

Abstract

Formaldehyde is a highly reactive electrophilic chemical compound, a byproduct of important metabolic reactions, and present in our environment as an environmental pollutant. While the formation of aberrant cross-links between DNA strands or between DNA and proteins was initially considered the only major mechanism of damage through which it caused cytotoxicity, inactivating mutations in genes encoding enzymes that detoxify formaldehyde lead to hereditary syndromes characterized by bone marrow failure, even in the presence of active DNA repair mechanism. This suggested that other mechanisms must exist through which formaldehyde induces cytotoxicity, which becomes highly relevant in a cancer context, where the high metabolic rate promotes its presence and turns its damage and defense mechanisms into potential therapeutic targets.

Initially, it was proposed to assess whether formaldehyde causes a dysregulation of cellular redox balance and, if so, how glutathione is involved. It was discovered that the spontaneous reaction between formaldehyde and glutathione alters the redox potential of the latter and that active glutathione synthesis becomes essential for cell survival under formaldehyde treatments. Furthermore, among a diverse panel of tumor cell lines, it was identified that A549 lung adenocarcinoma cells were the only ones that did not completely depend on glutathione to survive formaldehyde treatments. Instead, they strongly rely on the active cystine import, which is overactivated in these cells due to high levels of NRF2 transcription factor activity.

Finally, working with A549 cells in a chicken chorioallantoic membrane model, we observed that the simultaneous inactivation of cystine import and glutathione synthesis resulted in a significant reduction in the size of A549-derived tumors.

All these findings suggest that glutathione metabolism plays a crucial role in formaldehyde defense mechanisms in tumor cells, but that these mechanisms can be reconfigured in tumors with high NRF2 activity. Thus, designing therapeutic strategies with multiple inhibitors of these metabolic pathways will require studying and considering the specific alterations in each case.



Relevancia del glutatión y su metabolismo en la defensa contra el formaldehído endógeno derivado del metabolismo tumoral

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencia y Tecnología de
la Universidad Nacional de Quilmes

Lic. Agustín Ezequiel Morellato

Director: Dr. Lucas Blas Pontel

Consejera de Estudios: Dra. Georgina Alexandra Cardama

Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires (IBioBA) –
CONICET – Instituto Partner de la Sociedad Max Planck

Quilmes, Provincia de Buenos Aires, Argentina - 2025

ÍNDICE

° 8k°) -#@ @Vu\o
° "k-†@uyk° o
@uk\) y##@V
7
-
7 7
U
#
8
-
"
7
)
k 8o=
Vk7
\
o
-
=@^u-oo
'
\ "K-u@ \o) - 'uk° "° K\
=
\
\
\
U° u-k@Q o' U/u\)\o
#
\ 'knock out #k@nk #

\
 -
 - #°
 -
 ‡ "
 hk# ku h#k
 kV°
 h#k ku h#k
 # 8o=
 # =U o8o= yhG# =kU o°
 #
 - #° U
 "
 °

k-oyQr°) \o°

“El importante rol del glutatión en la prevención de la toxicidad causada por formaldehído”

O°) =
 O° in vivo o =oU 8o=
 °
 O°

“Cisteína, un potencial mecanismo de defensa alternativo frente a la toxicidad del formaldehído”

u KEAP1
 # 8o=
 # u 8° Vk7
 #
 - M° h
 O°
 O°

y

“Múltiples bloqueos del metabolismo del glutatión podrían ser más eficientes como potencial estrategia terapéutica”

-

-

U

) @#yα@V

-

u

M° h V k 7

O

k-7-k-V#@o

AGRADECIMIENTOS

El texto de esta tesis es el resultado de 5 años y medio de trabajo. Con su defensa optaré por el título de Doctor en Ciencia y Tecnología, sin dudas un hito en mi vida y formación académica. En todo este período, al igual que durante toda mi vida, fueron muchos los que, con su gran aporte, permitieron sortear obstáculos y transitar el camino. En esta sección, me gustaría dar el merecido agradecimiento a todos ellos.

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia por incondicionalmente “estar”. Aunque referido de esta manera pueda sonar a poco, es el contar con ese acompañamiento mutuo lo que me da motivos para continuar día a día.

A todos los compañeros y amigos que pude conocer en tantos años de vida y de estudio, que siempre serán el método más eficaz para depurar las amarguras y frustraciones, como así también compartir las alegrías y celebrar la esperanza.

A todo el conjunto de la sociedad, porque es con su aporte que se sostuvo, se sostiene y se sostendrá la educación universitaria pública, gratuita y de calidad que tanto me ha dado. En ese sentido, a toda la comunidad de la Universidad Nacional de Quilmes (la UNQui), mi casa de estudios por ya más de 10 años y a la cual espero poder devolverle aunque sea una fracción de lo que recibí.

Al Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires (IBioBA) y todos los que, con su trabajo, construyen un hermoso entorno para trabajar con libertad y participar en proyectos de primer nivel. En particular, a todos los amigos becarios con quienes compartí mañanas, tardes, noches, mates, budines, cervezas, asados y un sinfín de conversaciones que hicieron cortos y alegres los años transcurridos.

Al todo el grupo de investigación en Metabolismo del Cáncer. A Carla, con quien compartimos mesada, reactivos y hoy la vida. A Lucas Pontel, mi director, quien a pesar de la distancia geográfica que nos separó durante estos últimos años, logró acompañarme en los momentos más inciertos y darme libertad para el aprendizaje en los momentos de mayor fluidez; que constantemente desafió mis límites, fijando las expectativas siempre alto y haciéndome parte de variados proyectos y publicaciones de gran envergadura.

En fin, agradezco a la vida por haberme permitido vivir estos años de la manera en que lo hice. Ha sido un privilegio que, espero, sea el comienzo de una larga carrera cargada del mismo entusiasmo por el descubrimiento de lo nuevo y la aventura de enfrentarse con un desafío cada día.

En una realidad que intenta empujarnos al individualismo, al egoísmo, la confrontación y la violencia; estos agradecimientos, siempre insuficientes, intentan dar cuenta de que la ciencia, la construcción de conocimientos y los sueños son actos necesariamente colectivos. Que la felicidad es un acto colectivo.

ABREVIATURAS

FA	Formaldehído
ICLs	Cruzamientos entre hebras de ADN
DPCs	Cruzamiento ADN-proteína
OMS	Organización Mundial de la Salud
THF	Tetrahidrofolato
SSAO	Aminooxidasa sensible a semicarbazida
MPO	Mieloperoxidasa
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
ADH5	Alcohol deshidrogenasa
GSNOR	S-nitrosoglutación deshidrogenasa
HSMGSH	Hidroximetil-glutación
DSBs	Quiebres de doble hebra de ADN
xCT	Completo antiportador glutamato-cisteína
Hcy	Homocisteína
CBS	Cistationina beta-sintasa
CTH	Cistationina beta-liasa
GCL	γ -glutamilcisteína ligasa
GPX	Glutación peroxidasa
GGT	γ -glutamil transpeptidasa
GST	Glutación S-transferasas
UPR	Respuesta a proteínas desplegadas
ISR	Respuesta integrada al estrés

TRX/TXN	Tioredoxina
TXNRD1	Tioredoxina reductasa
CHAC1-2	γ -glutamilciclo transferasas
GSCHO	Ester S-formilglutati3n
SFGH	S-formilglutati3n hidrolasa
KEAP1	Prote3na Kelch-like asociada a ECH
L-BSO	L-butionil sulfoximida
Eras	Erastina
SSZ	Sulfasalazina
NAC	N-acetil ciste3na
GSH-MEE	Glutati3n mono-etil ester
LUAD	Adenocarcinoma de pulm3n
LSCC	Carcinoma de c3lulas escamosas
NRF2	Factor nuclear eritroide

7

Estructura molecular y reactividad

- 7°

-

0

)

- 7°

ver Figura

1 0

7°

) V @O

intra/inter-strand crosslinks -

V k V

) V) h#

DNA-protein crosslinks

#

u @O) ho

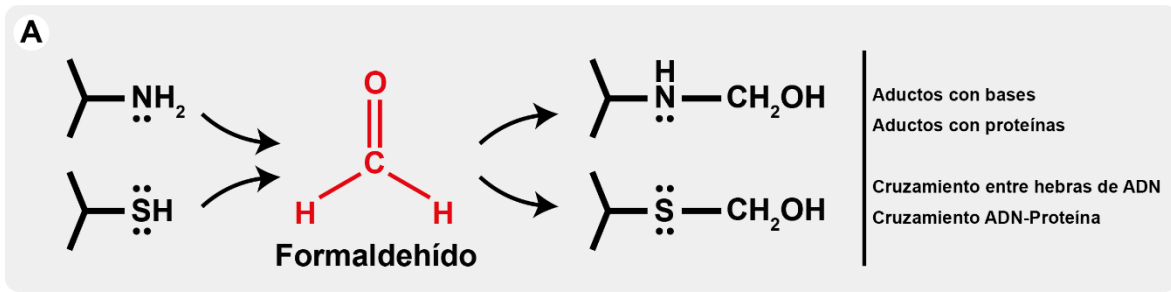


Figura 1 – Reacción del formaldehído con grupos amino y tioles, promovido por la densidad de carga positiva en su grupo carbonilo. Estas reacciones causan daño en macromoléculas de importancia como el ADN y proteínas. Adaptado de Reingruber et al .

Fuentes de exposición a FA

-

7°

O 7°

- 7°

U " ‡ =

@ 7°

O = ") CEE 7°

) 7°

O 7°

7° #
°) V 7°

h 7°
-

7°)

7° -
U o
7°
Uo

U - y 7° Food and Drug Administration

7°
7°

0
0) 7°)
= = M K #
=

0 7° OM

-
u=7

u=7
7°

0

∞° \ -
V= =

U h\

7°

V

Mecanismos celulares de defensa contra la toxicidad del formaldehído

u

7°

@

@

@

0 =

0 =

)

0

@

@

@

80=

@

†

)

@

) =

o

80V\k

7°

80= o

=dU 80=

80=

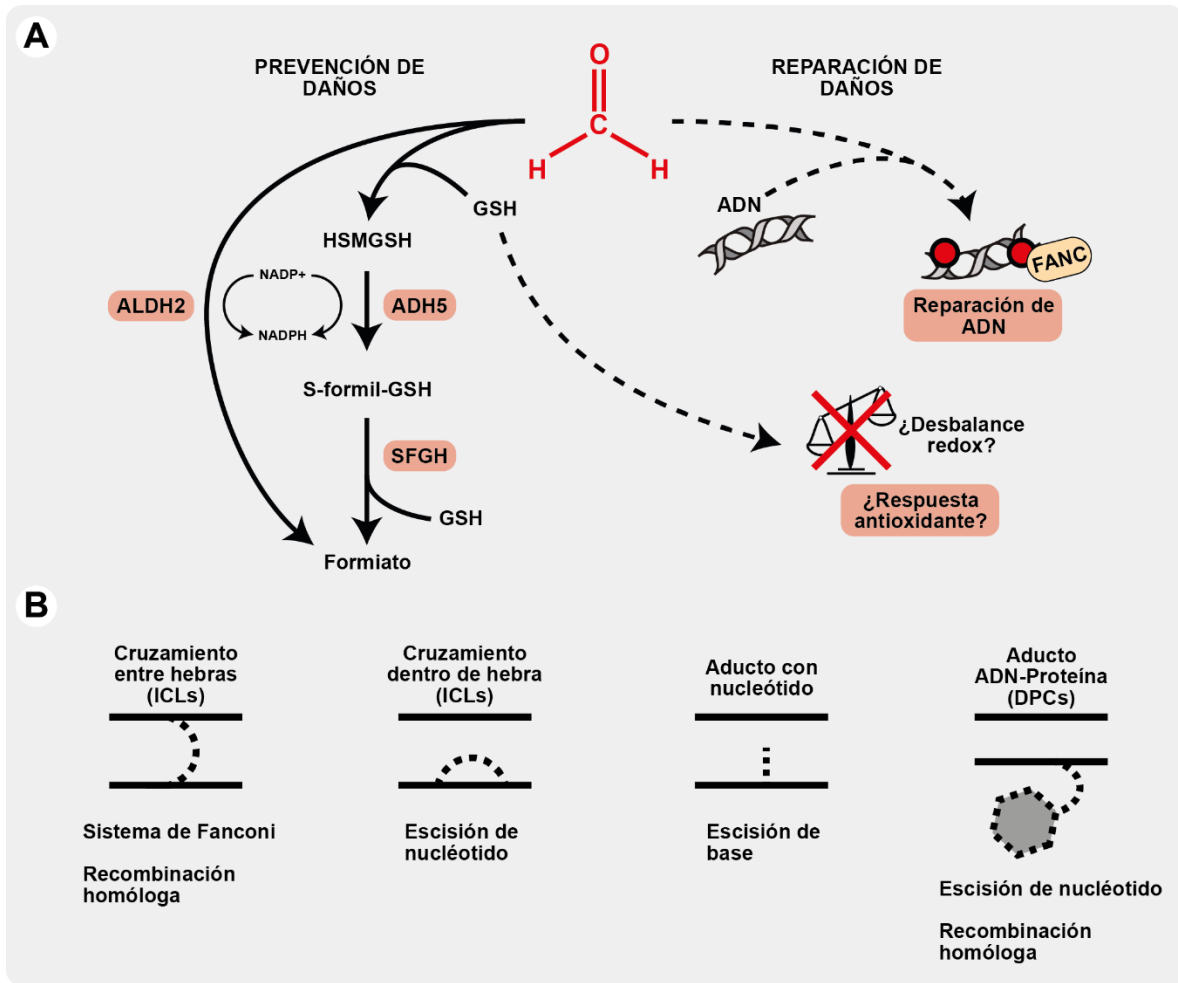
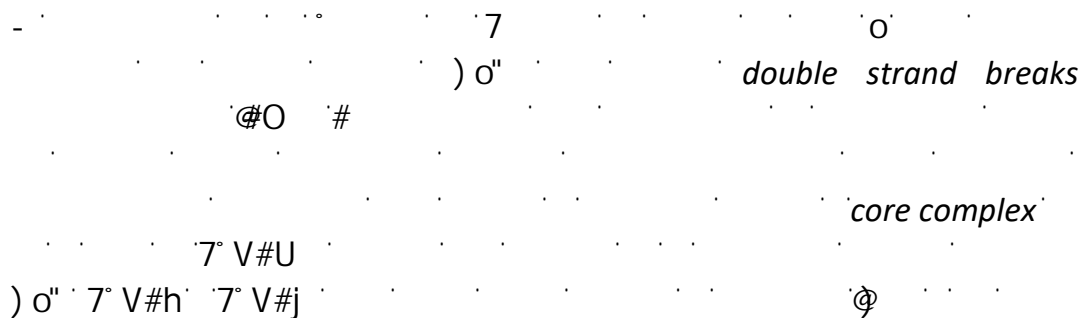


Figura 2 – Daño causado por formaldehído y respuesta celular. (A) Mecanismos de respuesta al formaldehído, tanto para la prevención de daños como la reparación de los mismos. (B) Resultados aberrantes posibles de la reacción entre formaldehído, ADN o proteínas; y mecanismos de reparación específicos asociados a cada caso. (B) adaptado de Yagi et al .

h

Figura 2



" k#° " k#° 7° V#\
 O) h#
 °) V dhkuV
) V
 V-k *Nucleotide Excision*
Repair
 # 7°
 k\o *Reactive Oxygen Species*
)
 O
 ver Figura 2
 U 7°
 ver Figura 3

Condiciones fisiopatológicas humanas asociadas a la toxicidad del formaldehído

)
 \Uo
 U

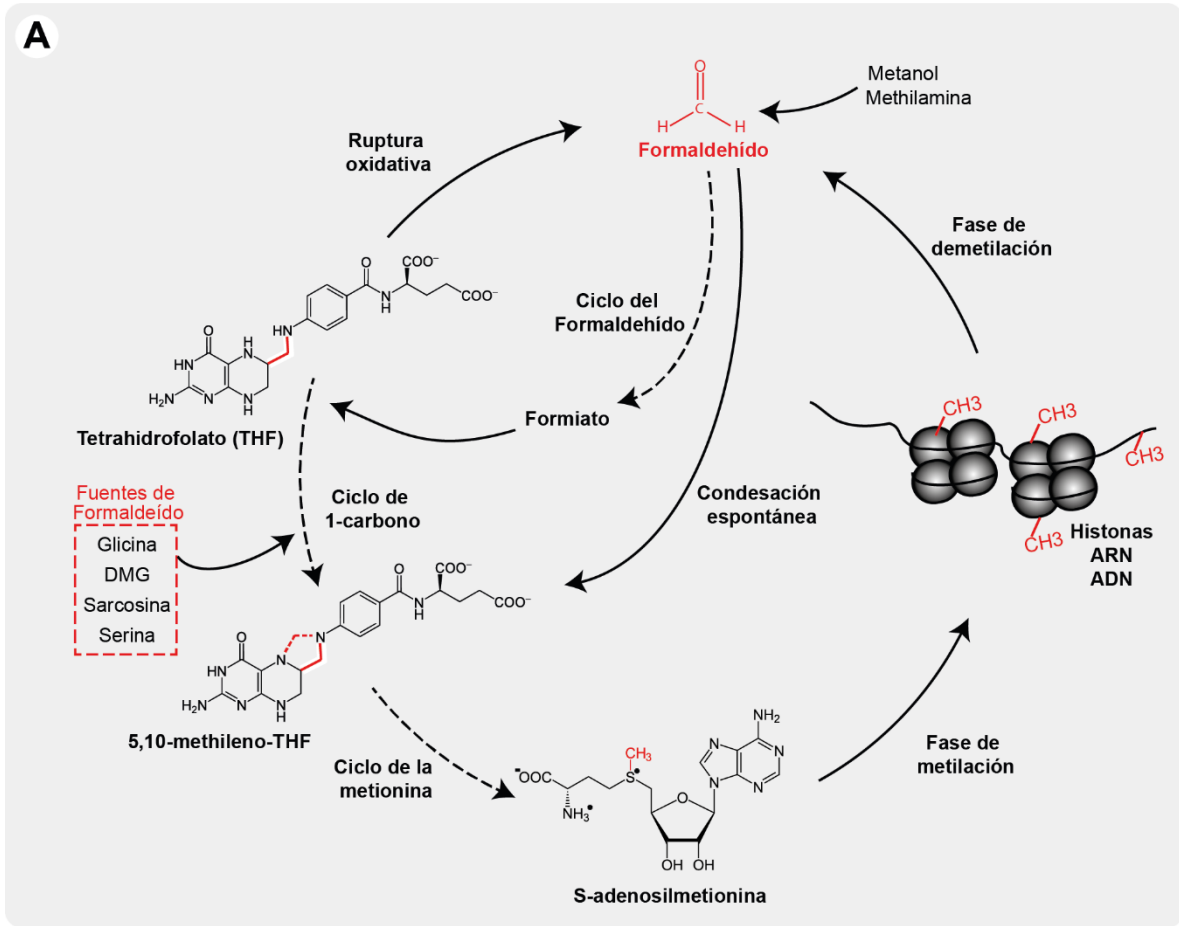


Figura 3 – Flujo del formaldehído. Se muestra su origen, detoxificación e ingreso al ciclo de 1-carbono. Adaptado de Morellato et al .

0 °° 7 °°) V °

0 °° 7 °°) V °

7 ° V#)

°°) =

wild type

FANC

BRCA2

k kK O

) h# -

ohkuV

†

7°

O

7°

oo° \

O

ALDH2

alcohol

flush reaction

K O

ADH5

U)

Aplastic

Anemia, Mental retardation Dwarfism V

8

Estructura molecular y generalidades

#

7° k\o -

80=

ver Figura 4

O

80=

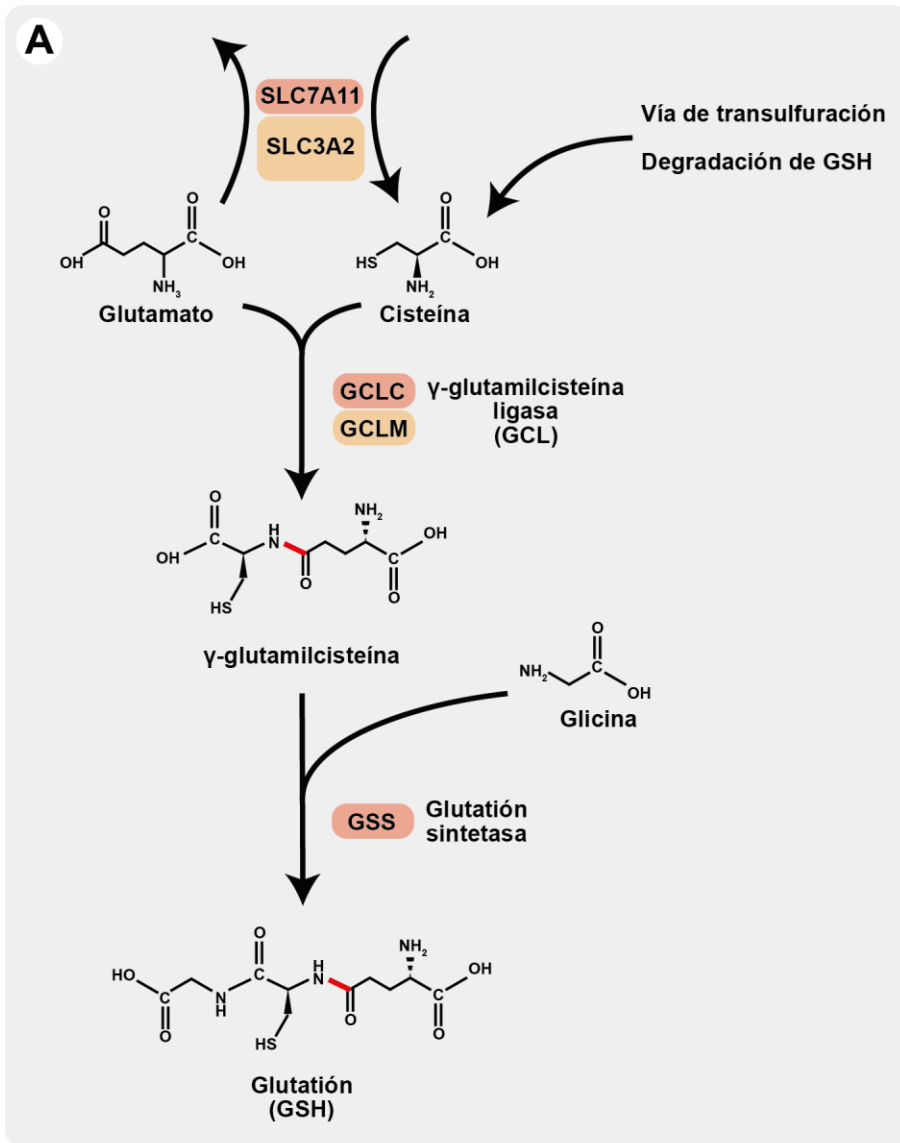


Figura 4 – Esquema de la vía de síntesis del glutatión. Se indican las fuentes de obtención de cisteína, el precursor limitante, y los pasos de síntesis catalizados por GCL y GSS.

U

ver Figura 4

@

8#0

glutamylcysteine ligase

0

0

0

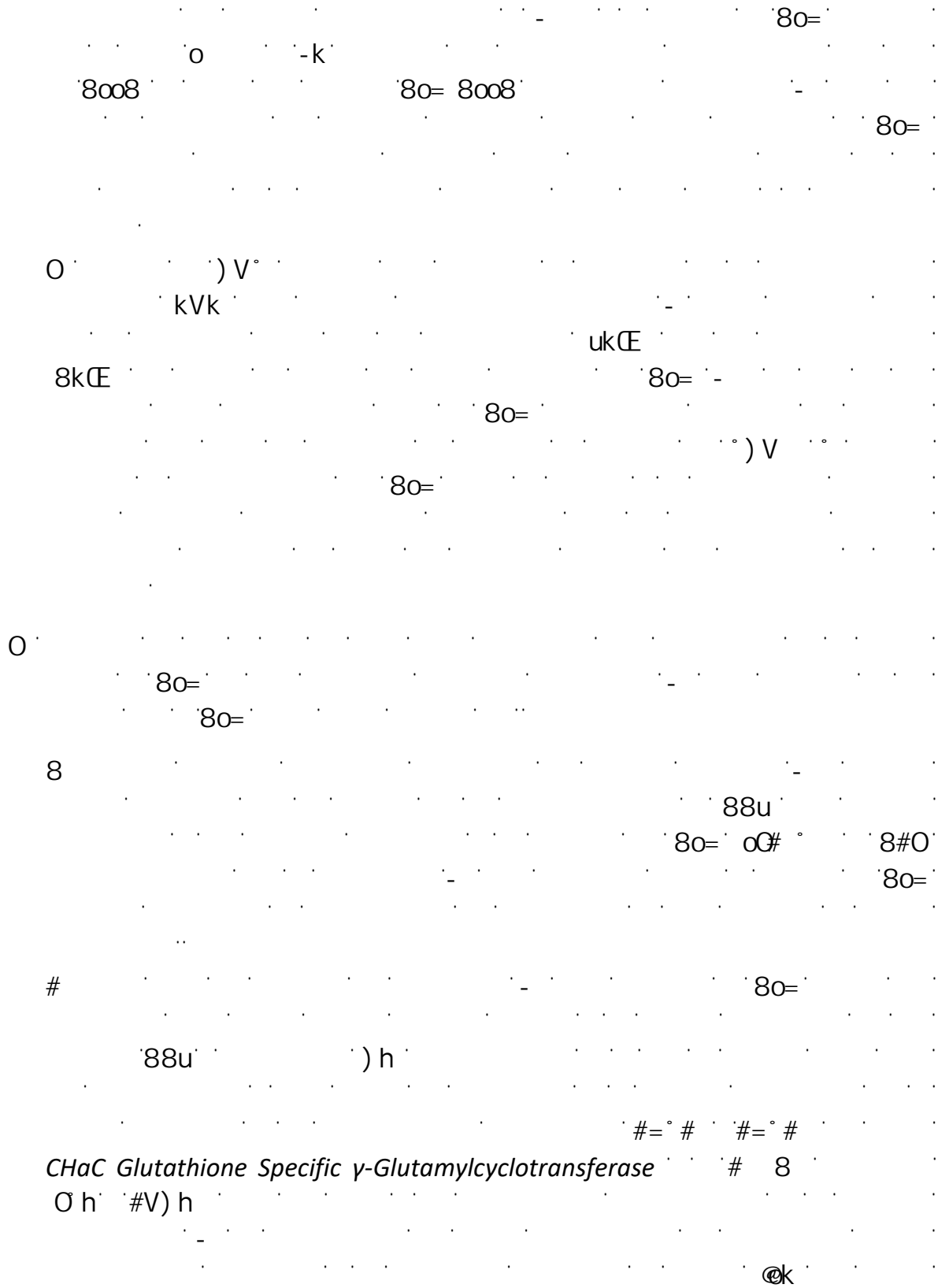
8hE
O 8#0) 8#0#
) 8#0U 8#0# 80=
feedback
V00 nuclear localization
sequence
8#0U 8#0#
M
M 80=
O 8#0#
h 8#0U
80=
- 800
glutathione synthetase
80= o
u
80=
80= de novo
80=
80= k
80=
88u o
80= 8008 # 8
U) " membrane-bound dipeptidases
80=
80=

) \ ° u
 \ ° u Organic Anion Transport system
 V

Funciones celulares y su relevancia

y 80= 0
0 80=
8hE = =
8008 8hE 80=
8hE
80=
0 80= 0
8ou y
U kh Multidrug Resistent Proteins
7 =V-
h 80= 8008
0 -k
h) @ Protein
Disulfide @ 8008
h o o 80=
y hk

Unfolded Protein Response



CHaC Glutathione Specific γ -Glutamylcyclotransferase

Integrated stress response

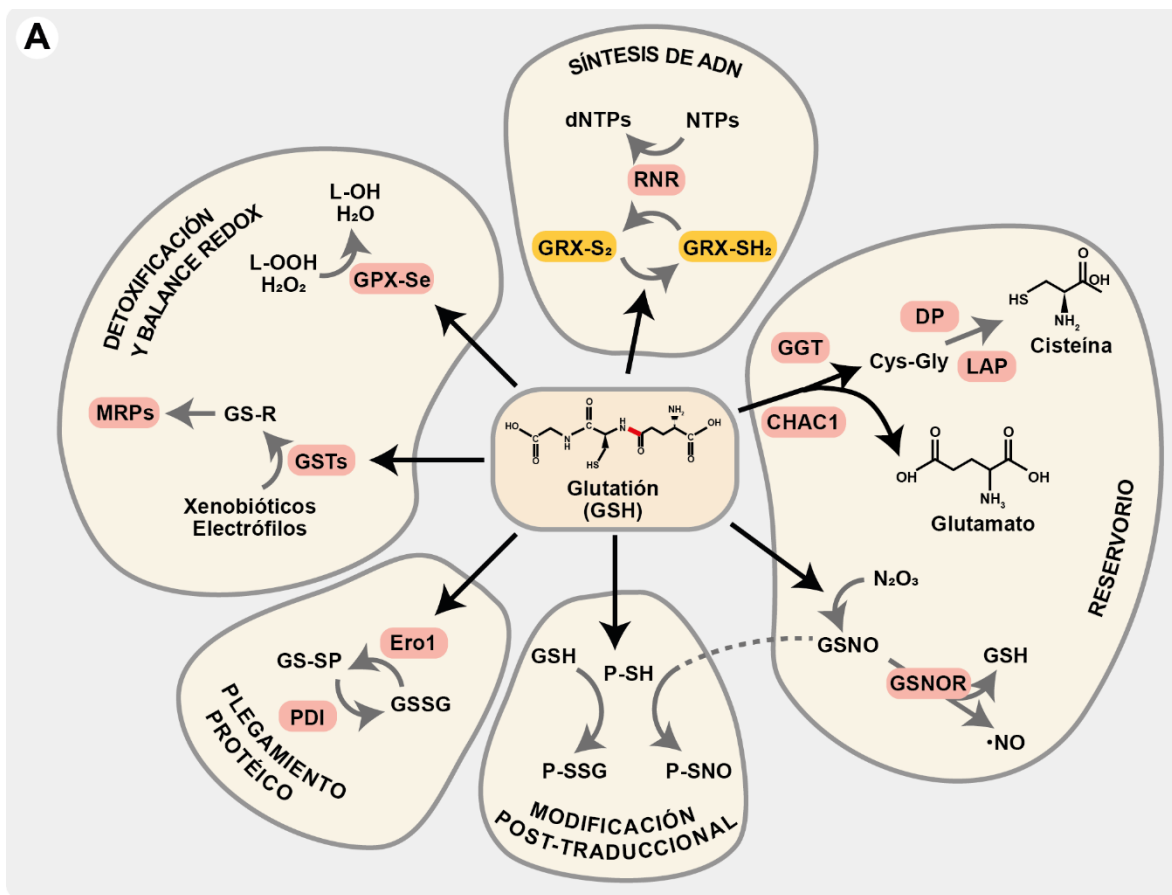


Figura 5 – Funciones principales del glutatión en el normal funcionamiento celular.

Detoxificación de formaldehído

#

7°

80=

7°

0

7°

80=

0

=oU 80= o

in vitro

) =

o

80#=\

V°)

7

80#=\

o

80=

o78=

Regulación del metabolismo del GSH

\

80=

NRF2, regulador transcripcional maestro

Vk7

nuclear factor erythroid 2-related factor 2

NFE2L2

80=

uCV

V°) h=

k\o

#

#

#

#V#

M° h Vk7 y
Vk7 U U 7
U 8 U M - °k-
antioxidant response element Vj \
8ou

Otros mecanismos regulatorios actuantes

- Vk7
8o=
- Vk7 @k
- h-kM hMk
°u7 - @
NFE2L2 Vk7
8o= #° #
O 8uh k° o V°)h=
Mk° o⁸) Vk7
#u
- SLC7A11
- 8o= k\o
- Vk7 M° h
) "k#°

o j ouU

Vk7

Alteración de su metabolismo en un contexto tumoral

o 8o=

O Vk7

o

uV7 h

h

V°) h=

8o=

"U hk °

⊗7 @8" K 8

h

k\o

oG# ° 8#0 8ok Vj \ 8ou

V

K

K/M

"#0

=U \ CE

uV7

O =U \ CE

†-87

o

V

O

Ukh

M° h

h)

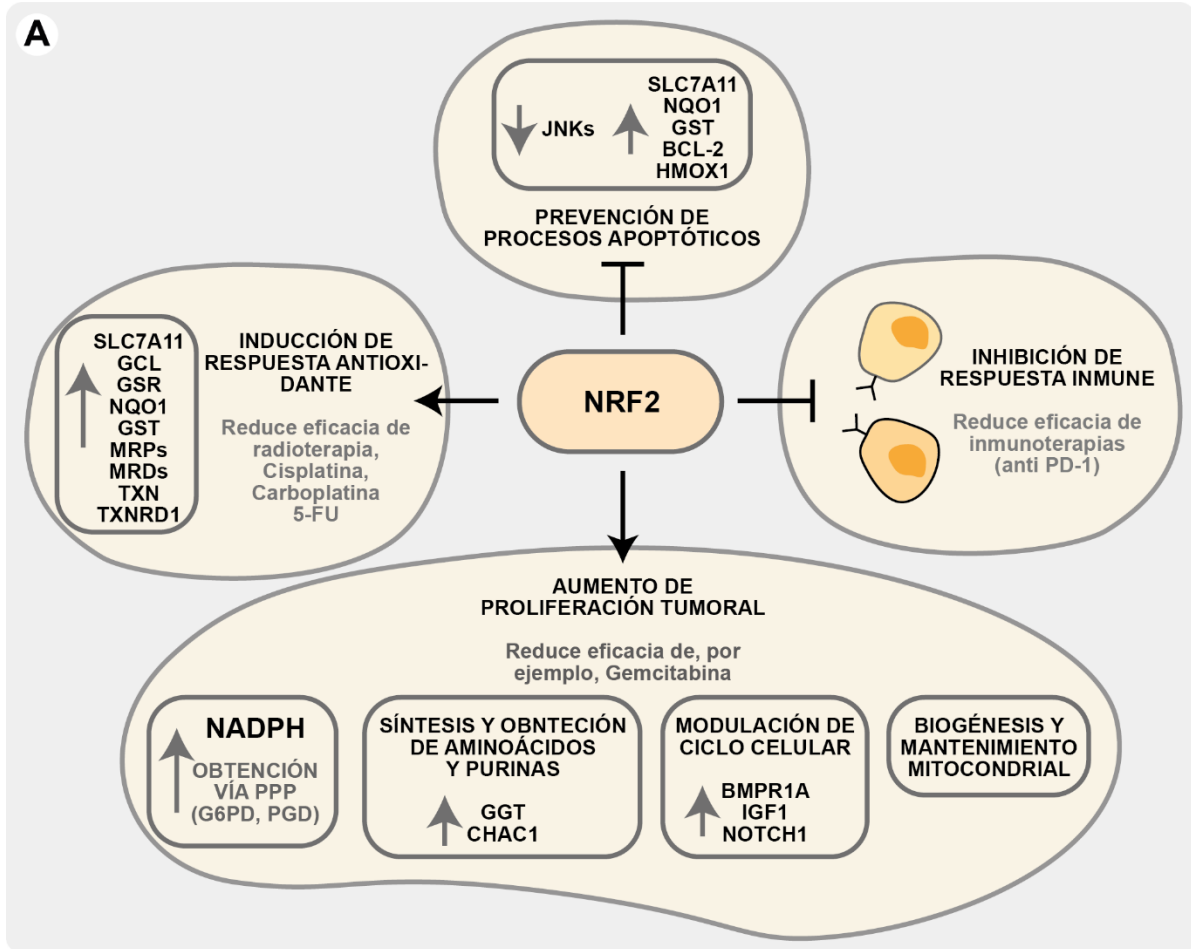


Figura 6 – Mecanismos dependientes de NRF2 asociados a la promoción del crecimiento tumoral y la resistencia a terapias.

#

KEAP1 CUL3

Vk7 M° h

k° 7

U

KEAP1

NRF2

Vk7

NFE2L2

Mk° o hu-V

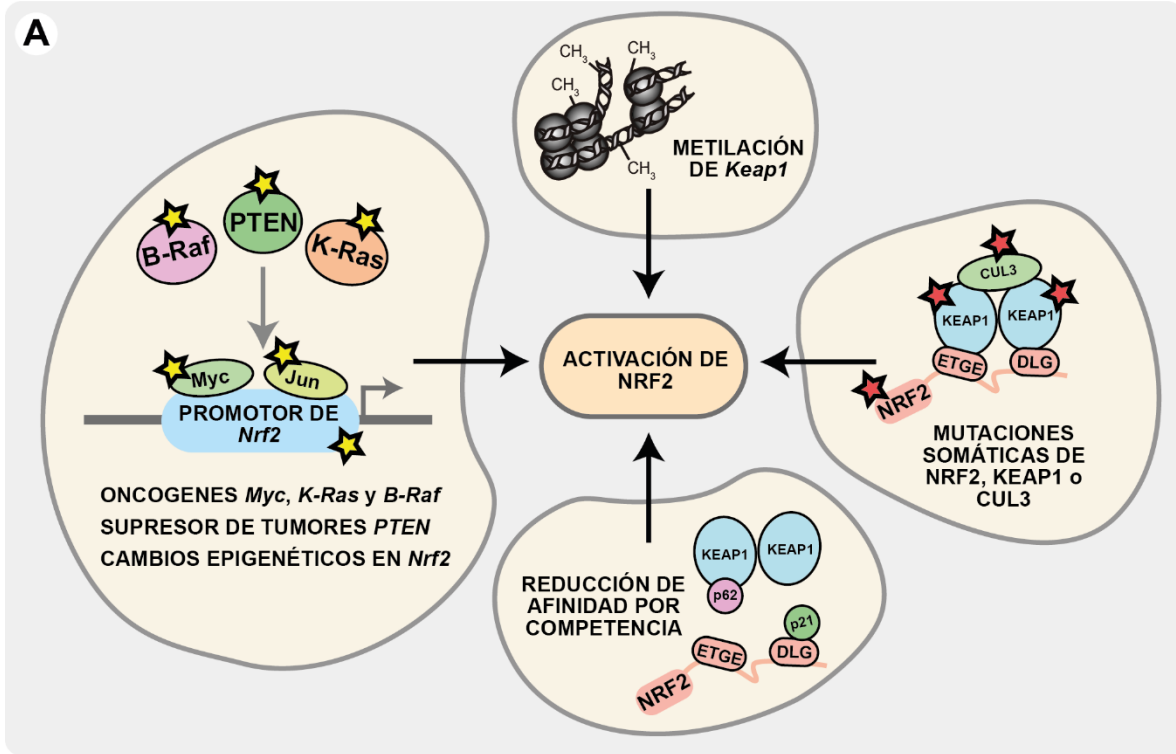


Figura 7 – Mecanismos alterados que causan activación de NRF2 en un contexto tumoral. Adaptado de Wu et al .

y 8" U

. 8" U

. uM

oj ouU vk7

uM vk7

h KEAP1

h

. 80=

)

° oG# °

8Qyu

Estrategias terapéuticas para el cáncer asociadas a su metabolismo

)

Vk7

y

#

-8#8

Brucea javanica

h

8o=

0

0" o\

8o=

8#0# ° °

@

#

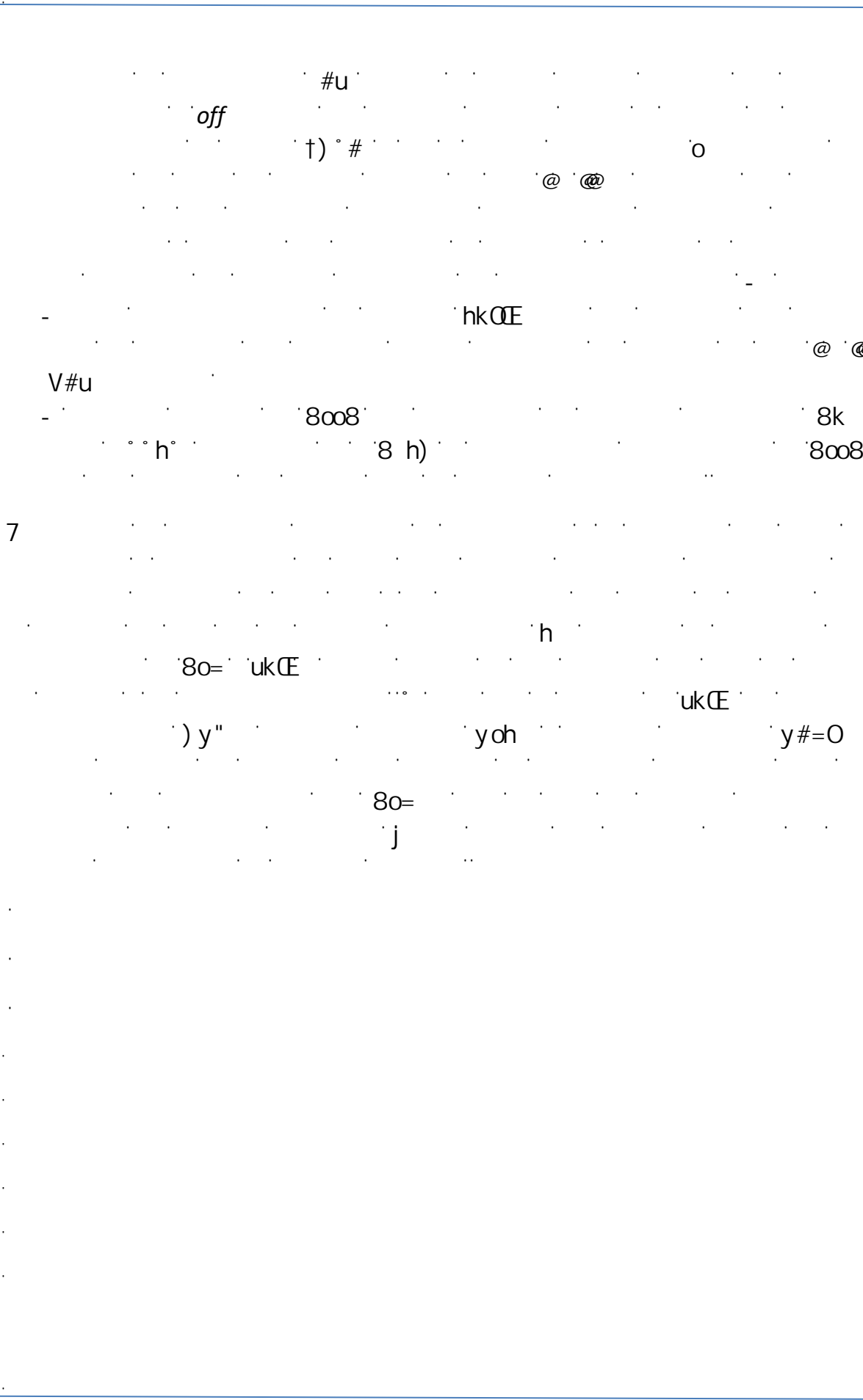
0" o\

in situ

0h

o

oo-



#u

off

t) ° #

@ @@

o

hkœ

@ @@

V#u

8008

8k

h

8 h)

8008

7

h

80= ukœ

ukœ

)y"

yoh

y#=0

80=

j

HIPÓTESIS
Y
OBJETIVOS DE TRABAJO

.

.

.

.

.

.

.

.

.

.

.

.

=

- 7°) V

0

7° 7°

0

80=

(~~0~~) = 0

7° 80=

0

=dJ 80=

in vitro

80=

=dJ 80=

=dJ 80=

80=

) V

u

7°

80=

#

80=

7°

#

\

Objetivo general de trabajo

h 80=

Objetivos específicos

) =oU 80=

80= .. 80=

7° 80=

h 80=

7°

xenograft

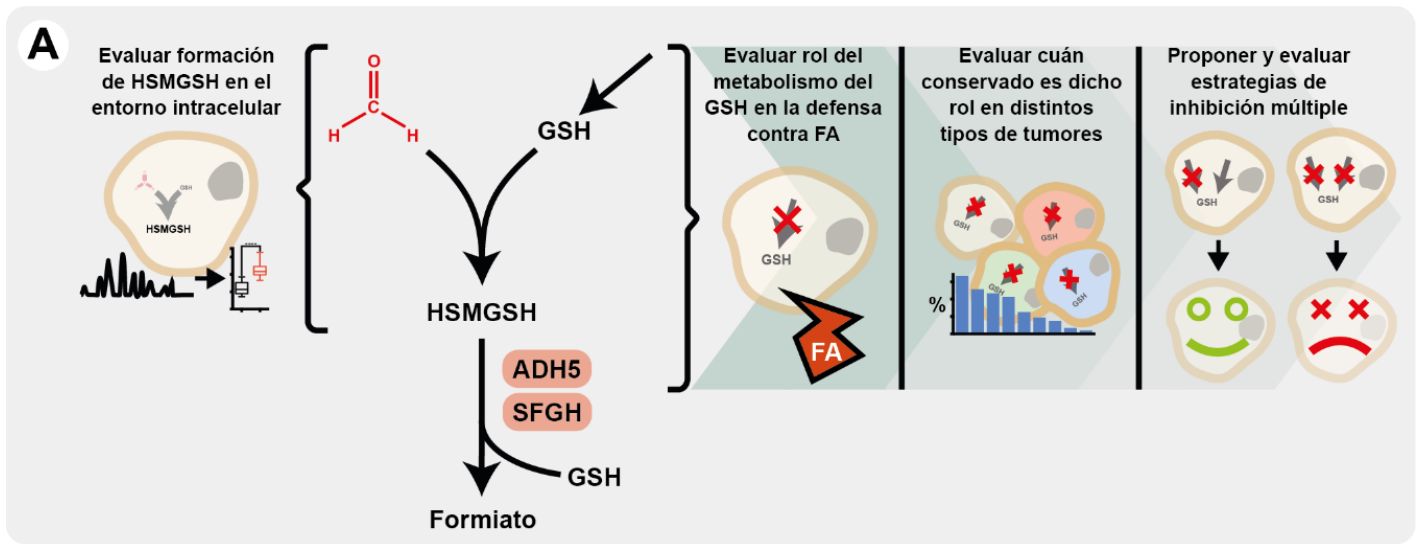


Figura 8 - Objetivos específicos del proyecto, presentados en su hipotético orden jerárquico y cronológico.

MATERIALES Y MÉTODOS

.

.

.

.

.

.

.

.

.

.

.

.

Cultivo celular

O =#u
) 8 o) " †
K = y " U) kk@ #†#O
= kk@ #†#O)
h # @ " #\V@-u°
American Type Culture Collection °u##
) † 8 @ O ° u
Dulbecco's Modified

Eagle's Medium) U-U u o
h o 8@#\
7"o V

O V) M h †
@ U U
) = M M @ " k K
kk@ #†#O# u## -
Roswell Park Memorial Institute 1640

khU@ h o 7"o
- # # u

O 7° u o
o
koO U # - = ' 8hE O
"o\ o " 8#O - U # -
= ' U # - = ' oO# °
V U # - = ' °) = V O
V° # o 8o= U-- o #
uk\OÆo

Obtención de líneas celulares *knock out* por CRISPR/Cas9

O =#u ADH5 GCLM ADH5 GCLM
ADH5 kV° u8#u88° °uu8u8° °°8u8uu

GCLM kV #8888 ##u8#u8 #u8 O
 CE Figura 9a
 O u o 87h
 7 #o @")
 O
 western blot
) = 8#U
 =h
)V
 7 5' u#uu8u u#u8u ##u#u8 3' k
 5' ##uu# 8#uu 8u #u# 3' ADH5 7 8#U 5'
 8° 8# #uu#u#88#u #8 3' k 8#U 5' u##uu #u88° # 888u8 3'
 GCLM U

O ADH5 SLC7A11
 ADH5 kV u8#u88° uu8u8° 8u8uu SLC7A11 kV
 8u88° 88 #8° # ##8u8# 888° u8uu #8888uuu 8° 8#u 8° u
 O y #
 Figura 9b h CE
 U) K h h =-M u
 h
 #
 O #
 #
 h
 # O
 #
 7
 western blot
) = oG# ° ° "

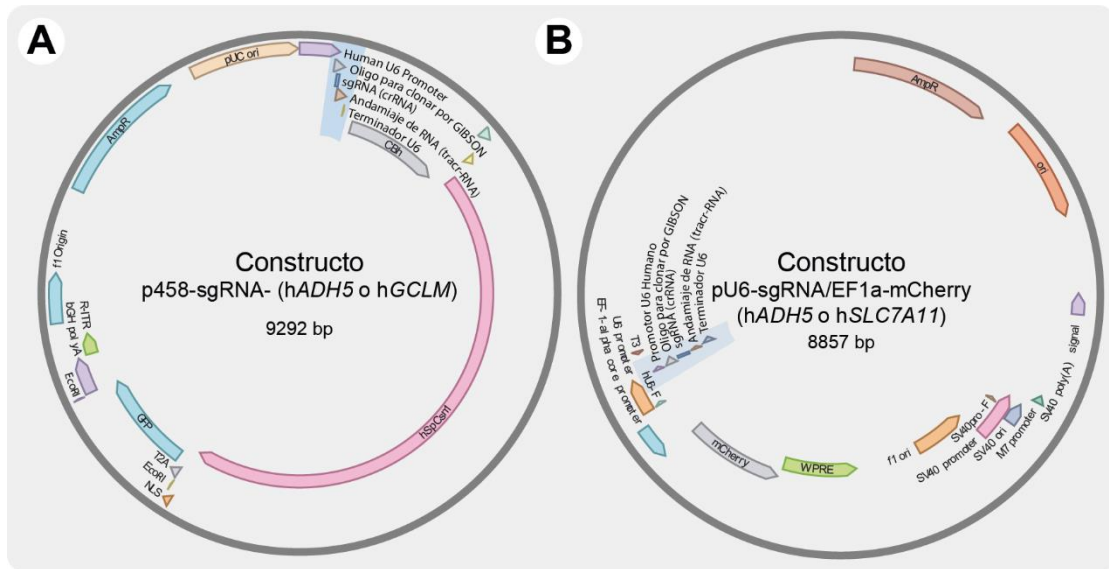


Figura 9 – Constructos utilizados en la obtención de líneas celulares *knock-out*. Se muestran esquemas simplificados de los constructos generados al clonar las secuencias guías en los plásmidos p458 (A) y pU6-EF1a-mCherry (B). En azul se resaltan las regiones de inserción del sgRNA correspondiente.

Obtención de líneas celulares de expresión estable

h =#u GCLM GCLM
. GCLM U 8# U =o
. 7 5' uuuu88#° ° ° 8° ° u88u#8° ##8#u8##° u888#° ##8° # 3'
k 5' 8###uu8#u#° ##° u8u#8° u° 8° ####uu#uuuu° 8#uu8u° ° ° u8 3'
. 8 " O U
° ° †o # **Figura 10a**
. o @ -
. =#u ° ° †o u° QV k' ° ° †o u° QV O
. O
. # 7° #o° @@ "
)
h KEAP1 wild type M° h
. Q # 70 8' **Figura 10b**
. †ot8') h-@
. =-M u O
. O 87h
. h

87h
87h
M° h
7
7° #0° @ ")
western blot

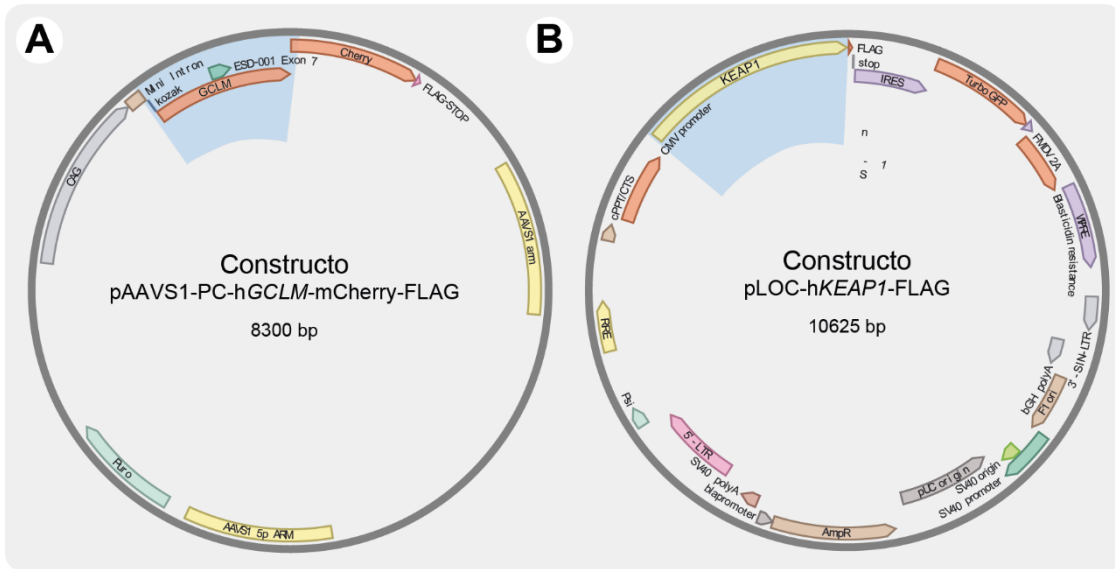


Figura 10 - Constructos utilizados en la obtención de líneas celulares de sobre-expresión estable. Se muestran esquemas simplificados de los constructos generados al clonar las secuencias codificantes (cDNA) de hGCLM en el plásmido pAAVS1-PC-mCherry-FLAG (A) y de hKEAP1 en pLOC-FLAG (B). En azul se resaltan las regiones de inserción del sgRNA correspondiente.

O = SLC7A11 O#
y #
KEAP1
=-M u K h
h

Ensayos de viabilidad

K V =#u
=

v O"o\ - k kO
O #
O
o U O
h
yu
U E

Ensayo de formación de colonias (CSA)

@
O
h"o O
o
8 7
O

Ensayo de formación de esferoides

O O
O
O
#° V\vk u - ° °

o

-0°

Western Blot

h

western blot

u

#

O

h" o

#

#

h

h

O

"

u

=#

U

=

o)

o

@

#

o

#

o

h

"uO

h

)V

\V

\77

"

)

#

O

V

O

u

o

#

" U

œ U

"

)

#

h

"

o

O

uk° Vo°) U o #
 @" @ = @ = † ° ' M
 O u =# U o) o †
 7
 u 7 †
 u =# U -
 u u"ou "o u"o
 7 #
 7
 u"ou
 - =kh -#O°
 u o 8" \ Œ o #) " k -
 \ @#\k
 O) @" @ = @ = † ° ' M " k U
 O o# ° #u ° " 8#O#
 8#U °) = u

PRC cuantitativas (RT-qPCR)

O kV°
 O
 western blot kV°
 kV° U Ma j y@8-V O

V O u o O
 o "k k h" O -
 #7CE " k O

SLC7A11 7 u##u8#uuu88#u##° u8° #8°
 k ° 8° 88° 8u8u8#uu8#88° #°

GCLC 7 8#° 8° u#° #uu° ° 88##° 88°
 k u##u88u#uuu###° #u8° 8°

HMOX1 7 ##° 88#° 8° 8° ° u8#u8° 8uu#°
 k ° ° 8° #u888#u#u##uu8uu8#°

CHAC1 7 8u88u8° #8#u##uu8° ° 8° u#°
 k 8° ° 88u8° ##u##uu88u° u#8°

CHOP 7 ° 8u#u° ° 88#° #u8° 8#8u° u#°
 k #u8#uuu#° 88u8u88u8° u8u°

BBC3 7 ° #8° ##u#° ° #8#° #° 8u° #8°
 k ##u° ° uu888#u##° u#u#888°

FDXR 7 u° #° ° #888#uu##u8° 8° ° ##°
 k u° #° ° #888#uu##u8° 8° ° ##°

CDKN1A 7 ° 88u88° ##u88° 8° #u#u#° 8°
 k u##u#uu88° 8° ° 8° u#° 8##8°

RNAseq

O° kv°
 O°
 ° 7° - - 7° V -
 U ° 7° U

O°
 western blot kv° kv°
 U M@j y@8-V O°
 y V O u o
 O° V o
 kv° u o kv° U

O 7° ouj
 @ @ # O K # @# "

Cuantificación de la formación de HMSGSH por UPLC-HRMS

h *in vivo* =U o8o=) U -
U # @ " # @ V # \ V @ -u #
standard
yh# =kU o *Ultra-Performance*
Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry h
7 ° o o @
7 =# O o o @
8o= o # O V =#\
u O \j u U - " # O
#= \ = # = #V
yh# =kU o
h =#u ‡ u =#u *ADH5* 7
o O 7
o V #
V O vortex #
O # 7 O #

)
u
h
-) u° u U = V # U

u
" "o° O
7 u O\j u #
O
vortex O # O
#

yhG# =kU o°
O † ° #j y@' yhG' @#
† ° #j y@' y\G' "- = #
† # U U° yo°
U yM'oV ') ° electro spray -o@ O
7 # 7 h"
O y
† u ADH5 † u U
7° ADH5 7°

- † † O
O O
O spray

h U° yo° O † #
U U° yo° O
UoUo

h outliers
h# Principal Components Analysis
U° uO " k u U † V U° yo° 8 h o
O

u

Cuantificación del ritmo de importación de cistina

h

y M) \ K @) \ y h o

"

=#u =

7" o o
7" o

O
O

o

h" o

O

7

)

=#u

Ensayos en modelo de membrana corioalantoide de pollo (CAM)

-

@

@

O

K

#

) 8 k

@# "

#° U

Chick Chorioallantoic Membrane h

8

o

@

#

#

h o
U
O O
O" o\ - O
O
U
U

Bases de datos y Análisis bioinformático

KEAP1 h
y Cancer Types Summary Cancer Type
Cancer Type Detailed
O 80=) U)
Gene Effect
(CHRONOS)¹⁴⁶
O M h

missense *stop*
gained *inframe deletion*

#

KEAP1

)

h

h

adenocarcinoma *lung*

KEAP1

KEAP1 " h

) *Lung adenocarcinoma (TCGA, FirehouseLegacy)*

KEAP1

y 80° kV°

80° *Gene set Enrichment Analysis* h

= y h @ U o)" = chip *platform*

Normalized Enrichment Score V-o

KEAP1

h

KEAP1 80°

k

heat map

o

Análisis estadístico

)

h 8 h o @ O

°V\†°

°V\†°

)

u

-

o-U

RESULTADOS

.

.

.

.

.

.

.

.

.

.

.

.

.

@

*“El importante rol del glutati3n en la
prevenci3n de la toxicidad causada por
formaldeh3do”*

@
7°)V
°)V
7°

La actividad de ADH5 previene la citotoxicidad de formaldehído en células tumorales humanas

in vitro
#k@hk #
ADH5
ver Figura 11
V

wild
type Figura 12

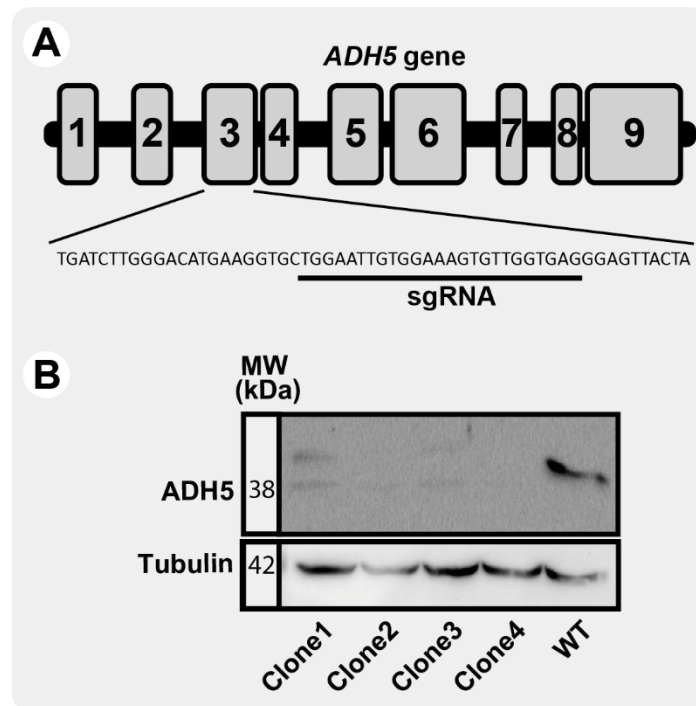


Figura 11 – Obtención de células HCT116 deficientes en ADH5. Se muestra la estructura del gen *ADH5*, el exón afectado, la secuencia diana y el sgRNA utilizado (A). Por otro lado, se muestran las imágenes derivadas del *wester blot* realizado para el chequeo de los clones obtenidos.

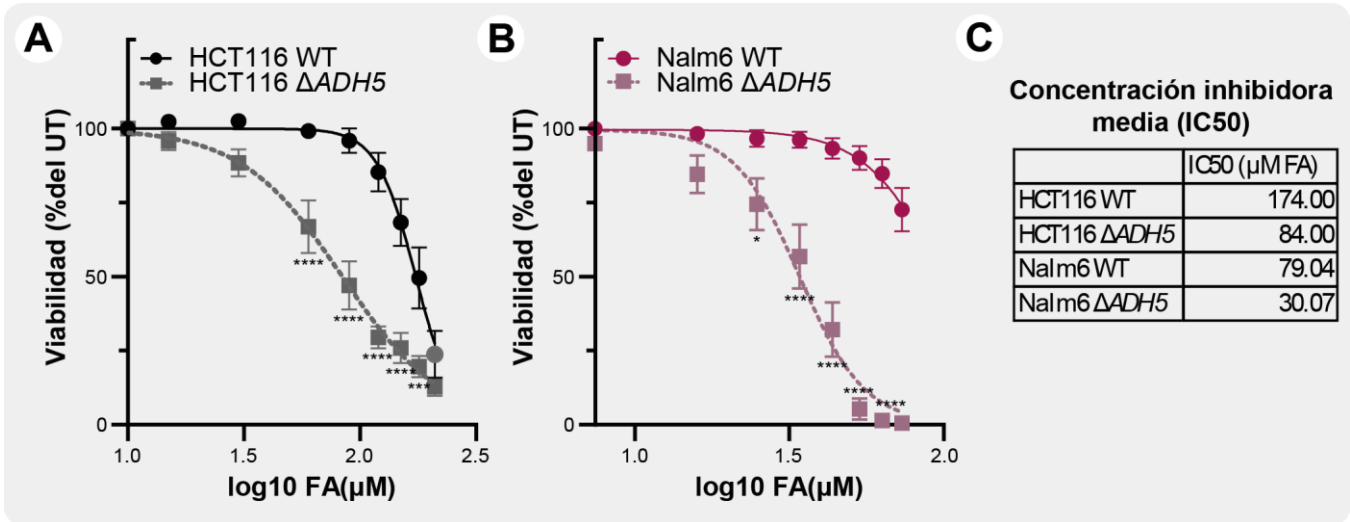


Figura 12 - Ensayos de viabilidad comparando células WT contra $\Delta ADH5$. Se muestran la viabilidad (calculada en cada caso respecto a la condición sin tratar) en función del logaritmo de las concentraciones de formaldehído utilizadas para células HCT116 (A) y Nalm6 (B). Se representan, además, la regresión no-lineal calculada (líneas conectoras), la comparación estadística realizada por 2way-ANOVA (método Tukey) y los IC50 (μMFA) calculados para cada caso (C).

... ..) =
 V
 7° K
 acute lymphocytic leukemia
 =#u **Figura 13**

Cabe destacar también que, con la intención de evaluar cuán conservada es la importancia de ADH5 en los mecanismos de defensa contra FA, colaboradores de nuestro grupo de investigación en Colonia (Alemania) a cargo del Dr. Björn Schumacher, lograron observar fenotipos similares al obtener gusanos *C. elegans* deficientes en el gen H24K24.3, ortólogo de ADH5, y exponerlos a FA¹⁴⁸.

V 7° V#"
 V O
 7° V#"
) = **Figura 14**

Pese a esa similitud, ante similares tratamientos con FA nuestro grupo de investigación no logró observar un aumento en la fosforilación del marcador de daño al DNA γ -H2AX en células deficientes en $ADH5^{148}$.

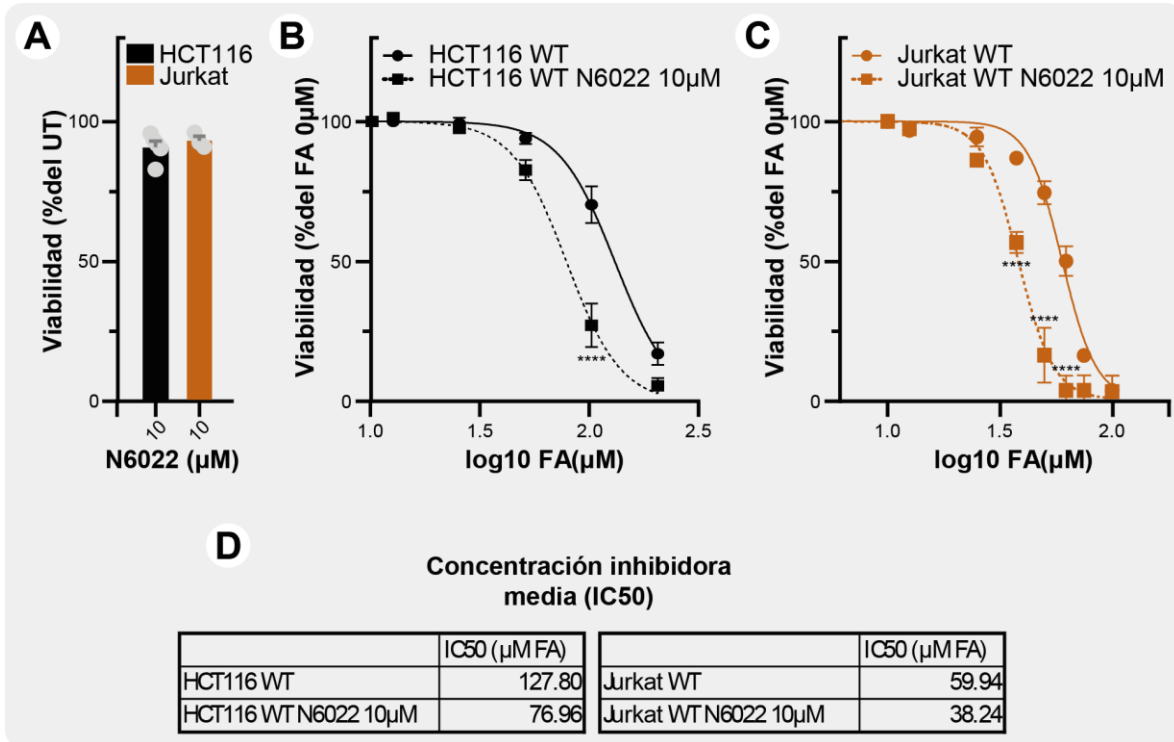


Figura 13 – Ensayos de viabilidad con N6022. Se muestran las viabilidades (media +/- SEM) de base para cada línea celular en presencia del inhibidor (A) y los resultados obtenidos al tratar con FA en presencia y ausencia del inhibidor (B y C). Se representan, además, la regresión no-lineal calculada (líneas conectoras), la comparación estadística realizada por 2way-ANOVA (método Tukey) y los IC50 (μ MFA) calculados para cada caso (D).}

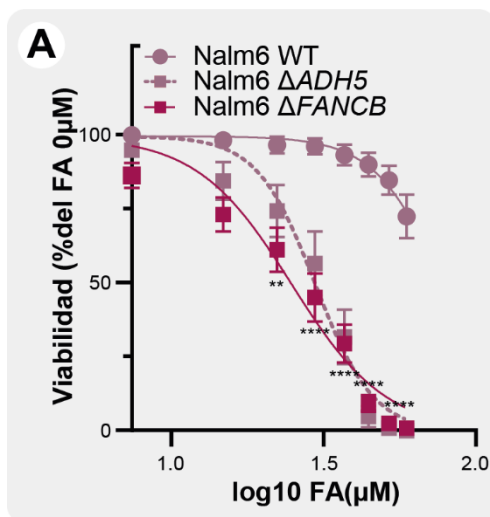


Figura 14 – Ensayos de viabilidad comparando células Nalm6 WT, $\Delta ADH5$ y $\Delta FANCB$. Se representan la media +/- SEM, las regresiones no-lineales calculadas y los asteriscos correspondientes a la comparación estadística entre WT y $\Delta FANCB$ realizada por 2way-ANOVA (método Tukey). Todas las comparaciones entre $\Delta ADH5$ y $\Delta FANCB$ resultaron no significativas.

$\Delta G^{\circ} = -nF\Delta E^{\circ}$
 $\Delta G^{\circ} = -2 \times 96485 \text{ C/mol} \times (-0.17 \text{ V})$
 $\Delta G^{\circ} = 32806 \text{ J/mol}$

La formación *in vivo* del aducto S-hidroximetil-glutión (HSMGSH) coincide con un desbalance del potencial redox del glutatión

u $\Delta G^{\circ} = -nF\Delta E^{\circ}$
 $\Delta G^{\circ} = -2 \times 96485 \text{ C/mol} \times (-0.17 \text{ V})$
 $\Delta G^{\circ} = 32806 \text{ J/mol}$

) # @ " # @ V # \ V @ - u
 $\Delta G^{\circ} = -nF\Delta E^{\circ}$
 $\Delta G^{\circ} = -2 \times 96485 \text{ C/mol} \times (-0.17 \text{ V})$
 $\Delta G^{\circ} = 32806 \text{ J/mol}$

15a

) *in vitro* $\Delta G^{\circ} = -nF\Delta E^{\circ}$

ver Figura 15b

0 $\Delta G^{\circ} = -nF\Delta E^{\circ}$ $\Delta G^{\circ} = -nF\Delta E^{\circ}$

ver Figura 15c

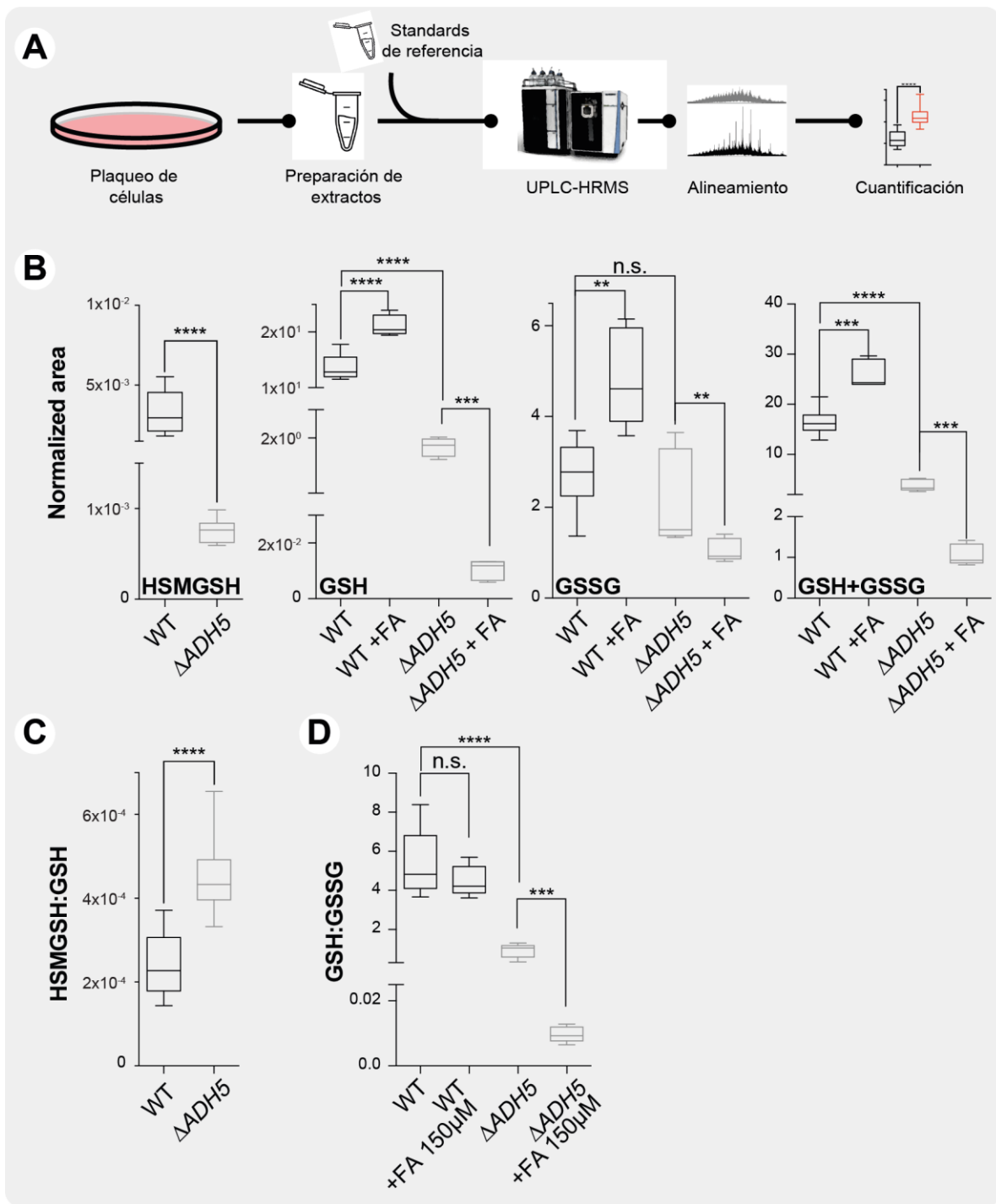


Figura 15 - Determinación de HSMGSH endógeno por espectrometría de masas (UPLC-HRMS). Se muestra el flujo de trabajo (A); las determinaciones absolutas de HSMGSH, GSH, GSSG y GSH+GSSG calculadas como áreas de pico relativas a la cantidad de células viables (B); la cantidad de HSMGSH relativa a GSH total (C); y la cantidad de GSH relativa a GSSG (D). En todos los casos $n=9$ y los asteriscos derivan de una prueba de Mann-Whitney. Las líneas de cada diagrama de caja representan la media, los límites externos refieren a los percentiles 25 y 75, y los bigotes los valores extremos obtenidos.

$80 = 8008$ $= \mu U$ *wild type*
 $80 =$ $) =$ **ver Figura 15b**
ver Figura 15b
 0 $80 = 8008$ 7
 $) =$ 7 μU **ver Figura 15d**

Cabe destacar también que, en un trabajo que es parte del proyecto de Carla Umansky, se pudo evaluar con múltiples sondas la formación de especies reactivas del oxígeno en células HCT116 ante tratamientos con FA. Ambas, diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (H2DCFDA, sensora de especies oxidantes) y dihidroetidio (DHE, sensor de superóxido y otras especies oxidantes), mostraron una clara acumulación de ROS sólo en células deficientes en ADH5, sugiriendo que esto sucede como consecuencia de la presencia de FA no metabolizado. En línea con esto, se lograron obtener células HCT116 que expresaran constitutivamente la proteína sensora Grx1-roGFP2, tanto en su versión citoplasmática como en su versión con exclusiva localización mitocondrial. Lecturas de la oxidación de estas proteínas por citometría de flujo permitieron observar una clara inducción de la señal mitocondrial en células wild type y deficientes en ADH5, así como en el citoplasma de células deficientes en ADH5¹⁴⁸.

$80 =$
 7
 $= \mu U$ $80 = h$ 7 U
 $80 =$
 $) =$
 $80 =$

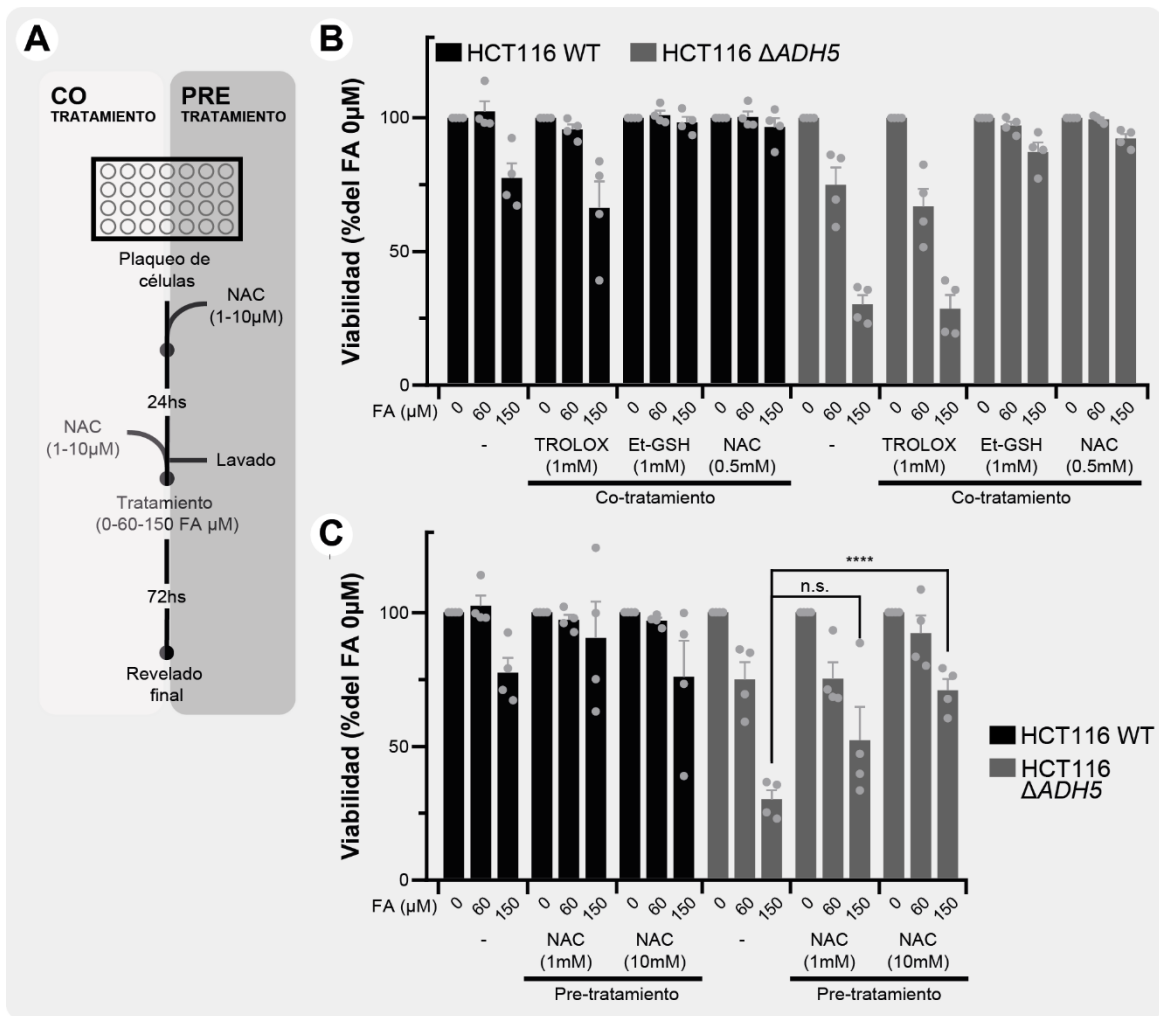


Figura 16 - Compuestos antioxidantes de naturaleza tiólica logran revertir la toxicidad del FA. Se muestran los esquemas de tratamiento (A) y resultados correspondientes a ensayos de viabilidad con células HCT116 ante 0-150 μM de FA en combinación simultánea con TROLOX, Et-GSH y NAC (B), o diferida con NAC (C). Los datos representan la media \pm SEM y los asteriscos corresponden a la comparación estadística entre condiciones realizada por 2way-ANOVA (método Tukey). Todas las comparaciones entre ΔADH5 y ΔFANCB resultaron no significativas.

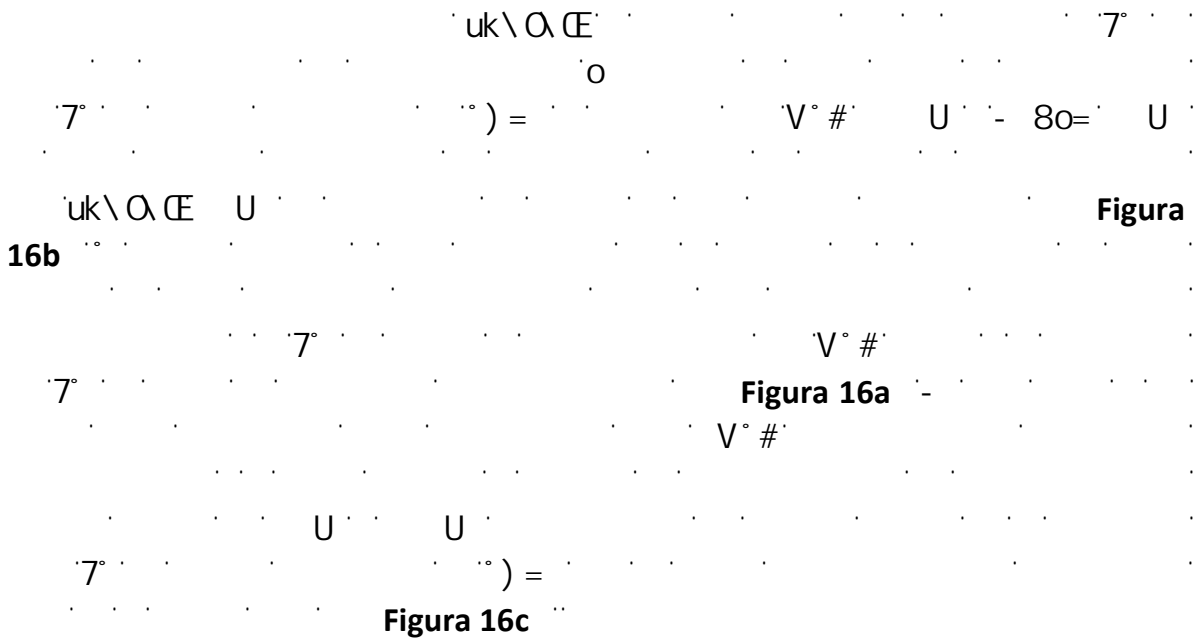
Antioxidantes tiólicos previenen la citotoxicidad del formaldehído

= 7 80=

) =

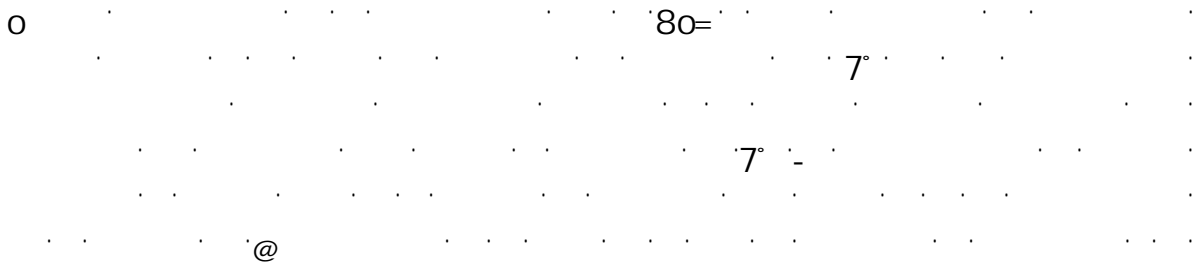
80= 800= h

V # - 80=



Cabe mencionar también que, bajo este mismo esquema de co-tratamiento y gracias a la naturaleza adherente de las células HCT116, como parte del proyecto de Carla Umansky logramos observar el mismo patrón de rescate en la capacidad de formación de esferas ante tratamientos con 150uM de FA, siendo las células deficientes en ADH5 solamente capaces de formarlas cuando, al mismo tiempo, se suplementaba NAC o Et-GSH. De la misma manera, dicha suplementación aumentó considerablemente el tamaño y cantidad de las esferas formadas por las células HCT116 wild type. Este efecto no se observó al suplementar el medio con TROLOX¹⁴⁸.

La activa biosíntesis del glutatión es requerida para limitar la citotoxicidad del formaldehído



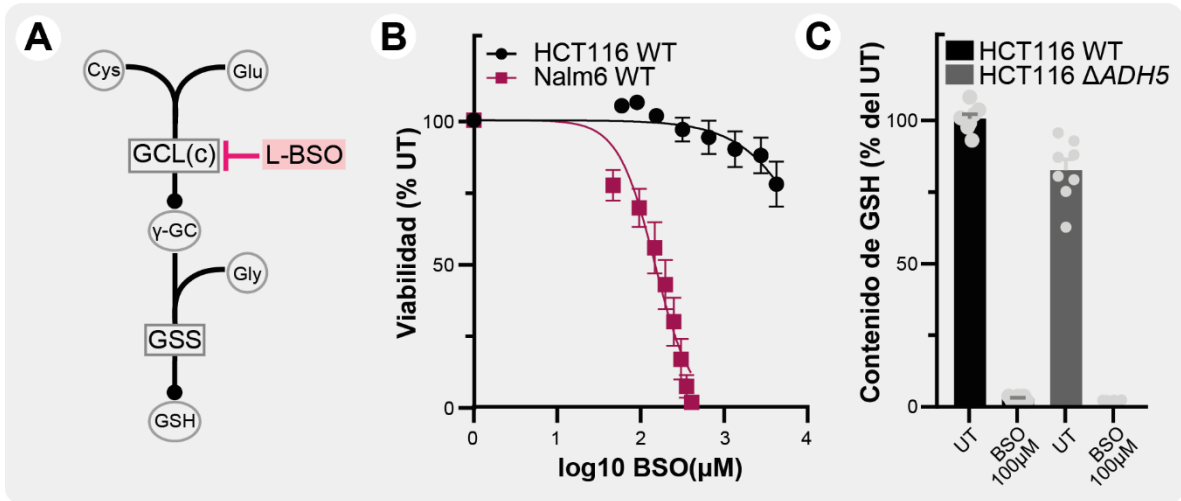


Figura 17- Bloqueo de la síntesis de GSH con el inhibidor L-BSO. Se esquematiza la vía de síntesis de GSH y el bloqueo que L-BSO ejerce sobre él (A), el perfil de sensibilidad de las células HCT116 y Nalm6 al inhibidor (B), y los niveles de GSH determinados con el kit comercial GSH-Glo en células HCT116 al utilizar L-BSO en la concentración elegida para ensayos de viabilidad (C).

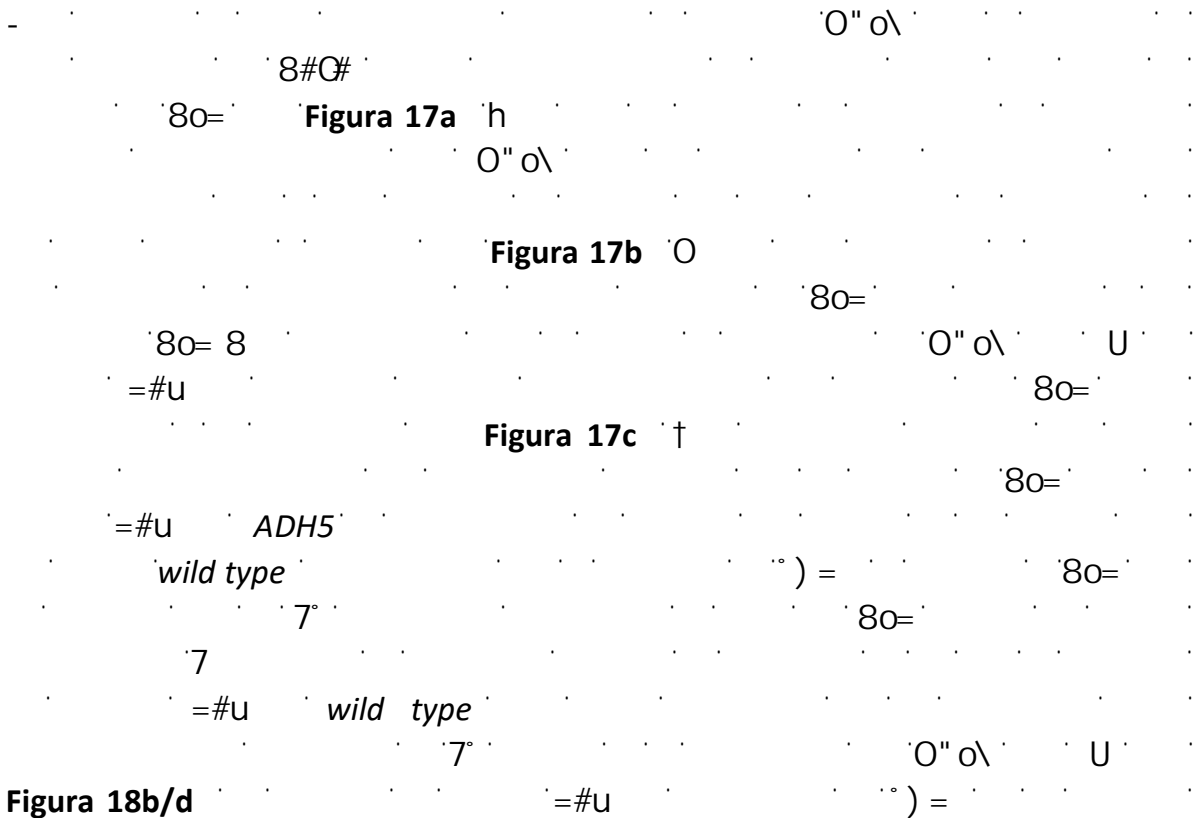


Figura 18e
wild type

Figura 18c/d

Figura 18f

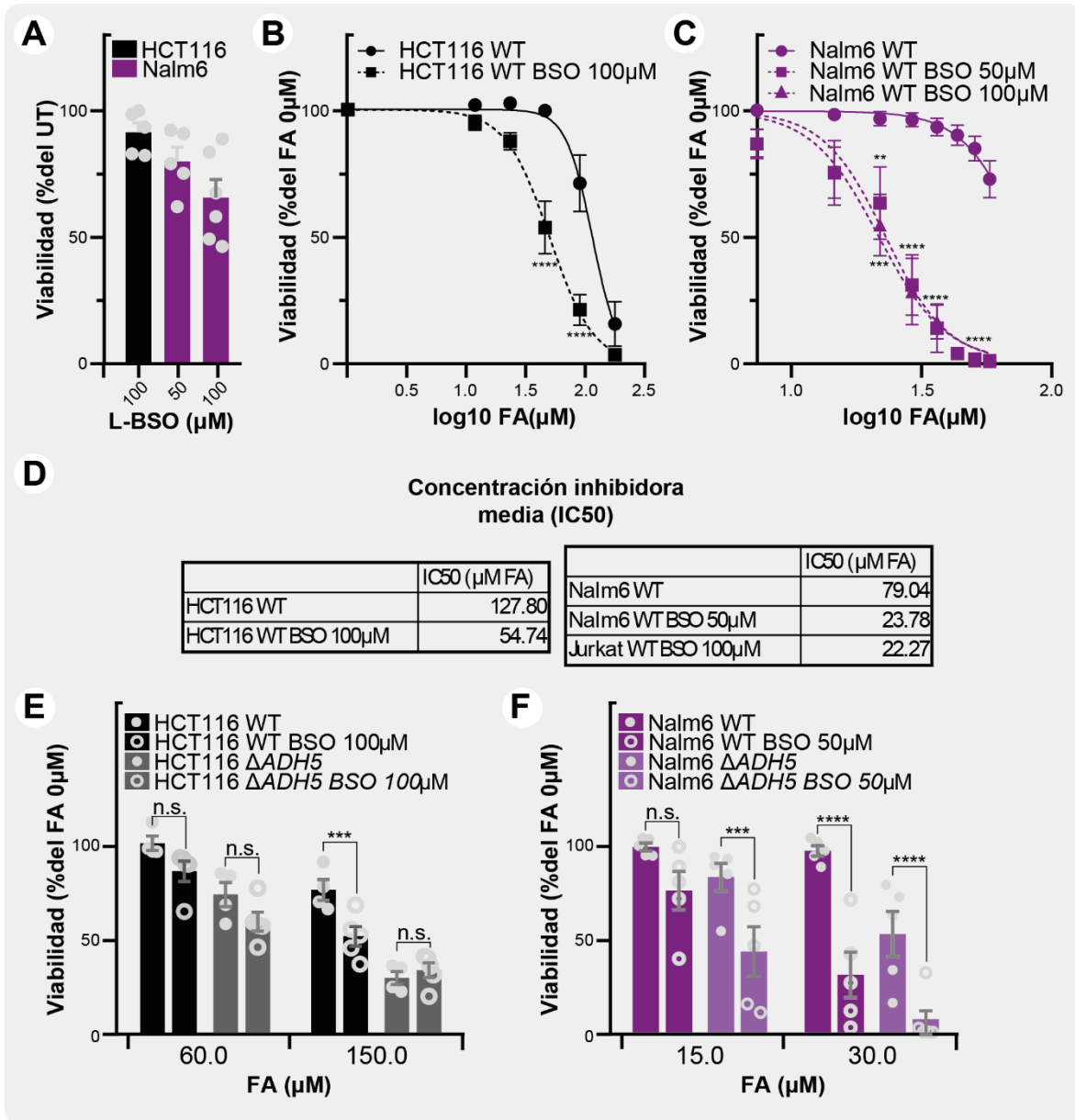


Figura 18 - Ensayos de viabilidad combinando FA con L-BSO. Se muestran las viabilidades de base obtenidas ante 100 μM y 50 μM de L-BSO en células HCT116 y Nalm6, respectivamente (A); las viabilidades observadas ante concentraciones crecientes de FA en presencia y ausencia de L-BSO para células HCT116 (B) y Nalm6 (C), junto con los IC50s calculados en cada condición evaluada (D); y los fenotipos de sensibilidad observados ante dos concentraciones de FA para

células HCT116 (E) y Nalm6 (F) en presencia y ausencia de L-BSO, ambas en sus variantes *wild type* y $\Delta ADH5$. Los datos representan la media \pm SEM y los asteriscos corresponden a la comparación estadística entre condiciones realizada por 2way-ANOVA (método Tukey).

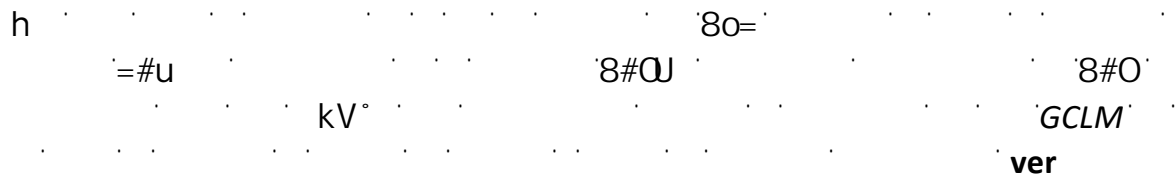


Figura 19

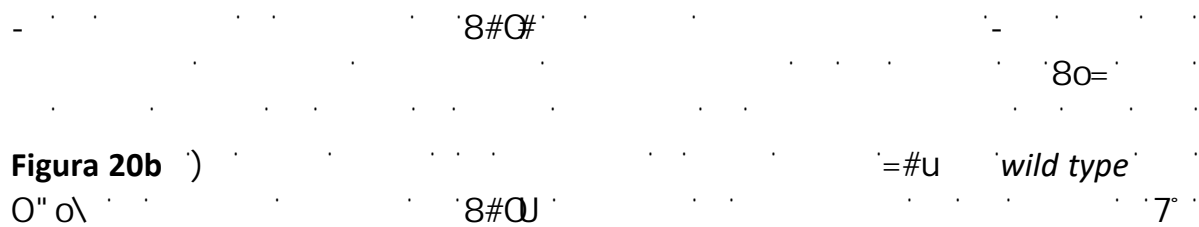


Figura 20b

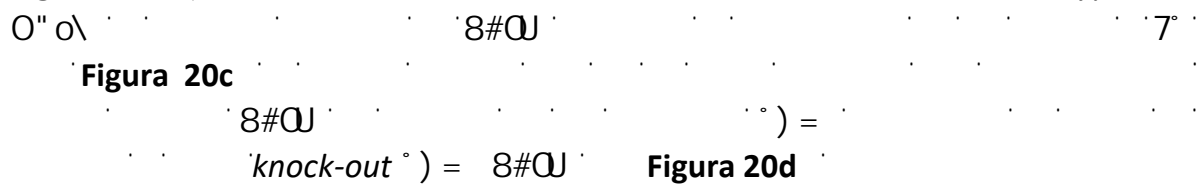


Figura 20c

Figura 20d

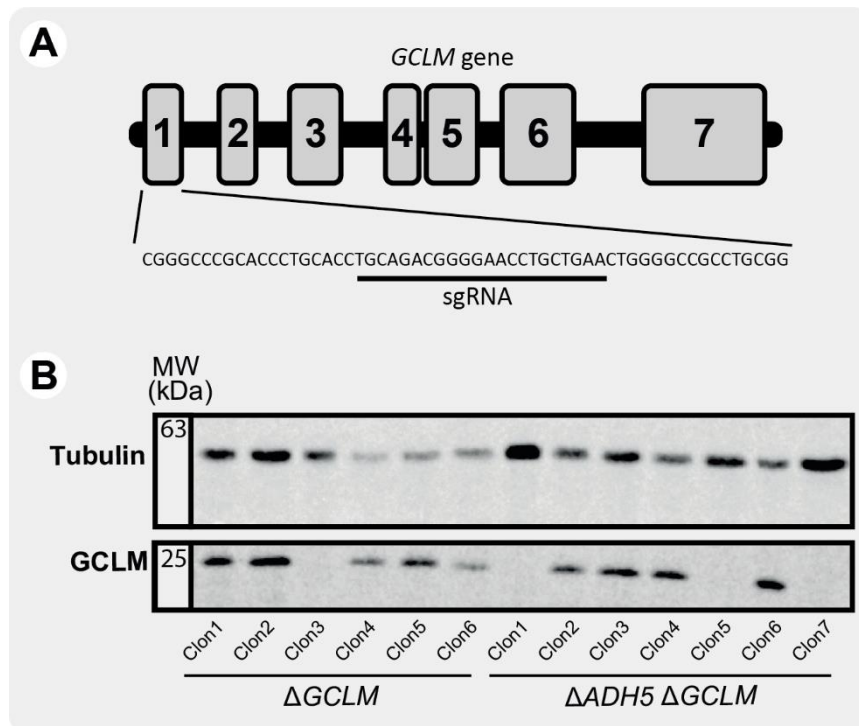


Figura 19 - Obtención de la línea celular HCT116 $\Delta GCLM$ y HCT116 $\Delta ADH5/\Delta GCLM$. Secuencias diana seleccionada y sgRNA diseñado para su clonado en el plásmido p458 (A). Chequeo por WB de los clones obtenidos (B).

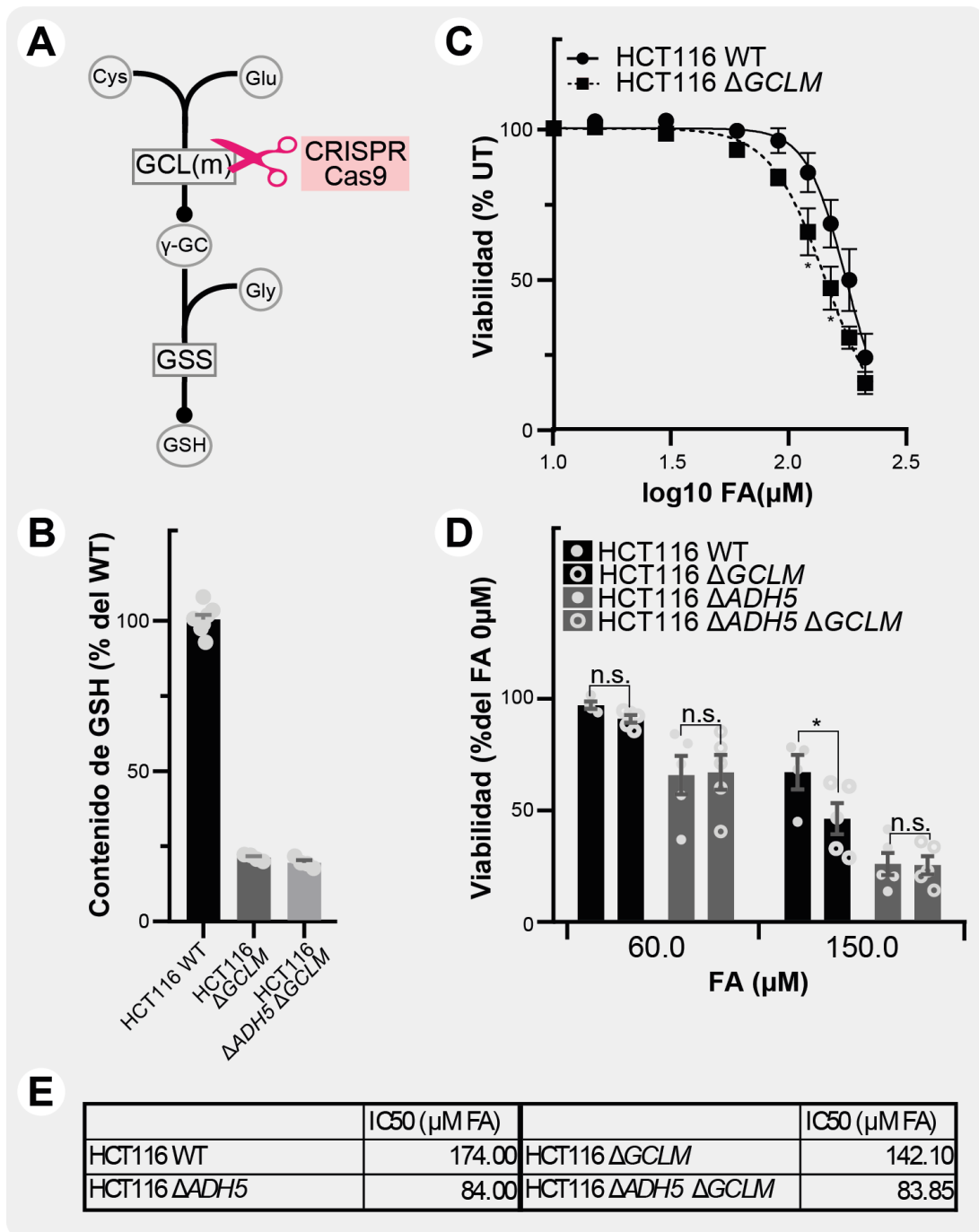


Figura 20 - Ensayos de viabilidad con células deficientes en GCLM. Se esquematiza la vía de síntesis de GSH y el bloqueo que la ausencia de GCLM ejerce sobre él (A); los niveles de GSH determinados con el kit comercial GSH-Glo en células HCT116 *wild type* y HCT116 Δ GCLM (B); los resultados obtenidos en ensayos de viabilidad para dichas líneas celulares ante concentraciones crecientes de FA (C); y las viabilidades obtenidas ante dos concentraciones puntuales de FA al evaluar las células HCT116 *wild type*, HCT116 Δ ADH5, HCT116 Δ GCLM y HCT116 Δ ADH5 Δ GCLM (D). Finalmente, se muestran los IC50s calculados en cada caso. Los datos representan la media \pm SEM y los asteriscos corresponden a la comparación estadística entre condiciones realizada por 2way-ANOVA (método Tukey).

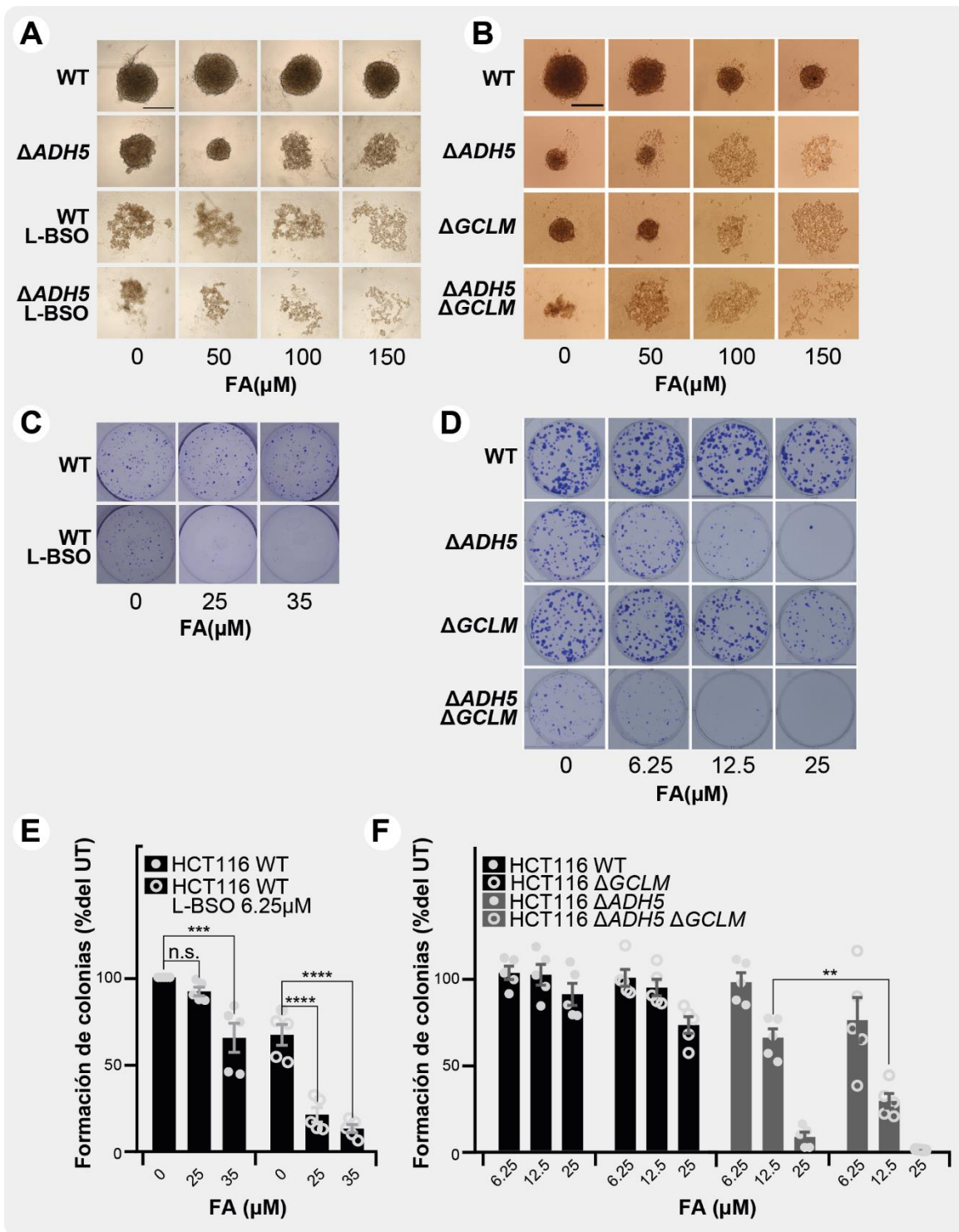


Figura 21 - Ensayos de formación de esferas y colonias con células HCT116. Se muestran fotografías representativas de los ensayos para formación de esferas ante concentraciones crecientes de FA y suplementación con L-BSO, tanto para células WT como $\Delta ADH5$ (A); ensayos de formación de esferas ante FA con células $\Delta GCLM$ y $\Delta ADH5 \Delta GCLM$ (B); ensayos de formación de colonias, nuevamente, al tratar con FA en combinación con L-BSO (C) y con células $\Delta GCLM$ y $\Delta ADH5 \Delta GCLM$ (D); y las cuantificaciones correspondientes a los ensayos de formación de

colonias (E y F). Los datos representan la media +/- SEM y los asteriscos corresponden a la comparación estadística entre condiciones realizada por 2way-ANOVA (método Tukey).

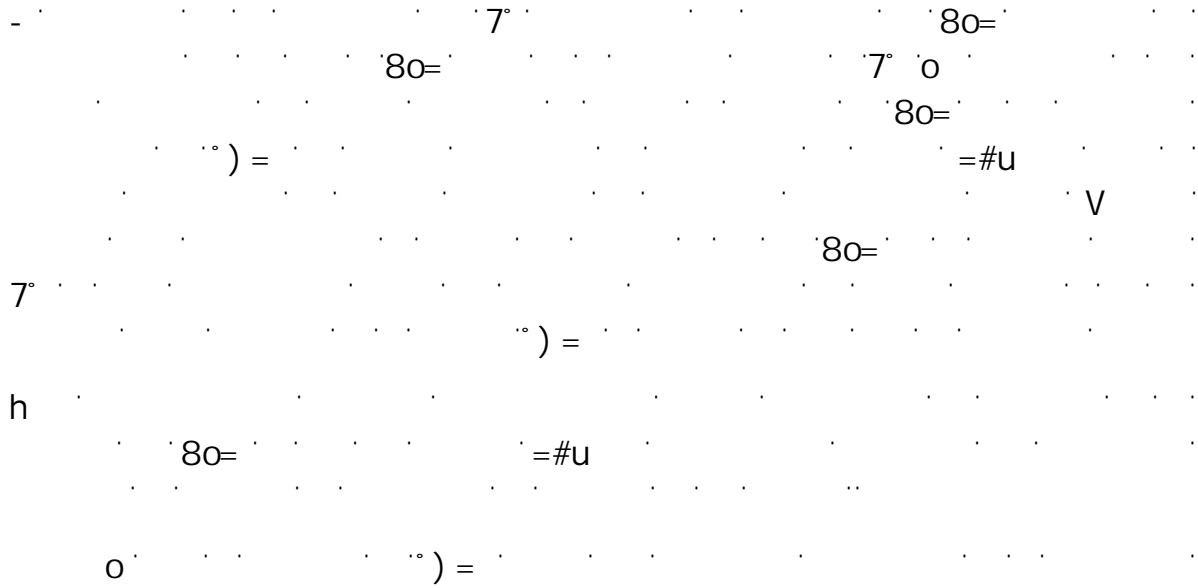


Figura 21a

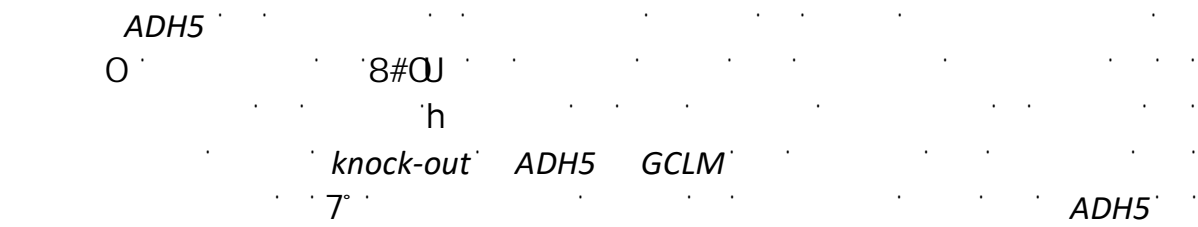


Figura 21b

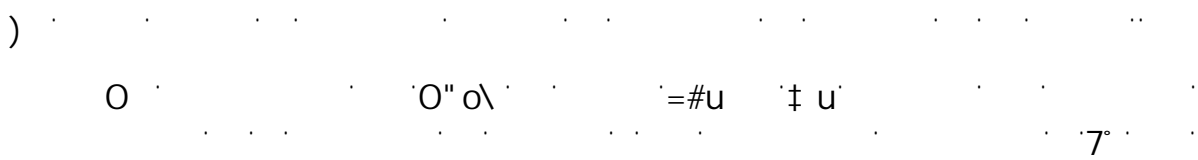


Figura 21c/e

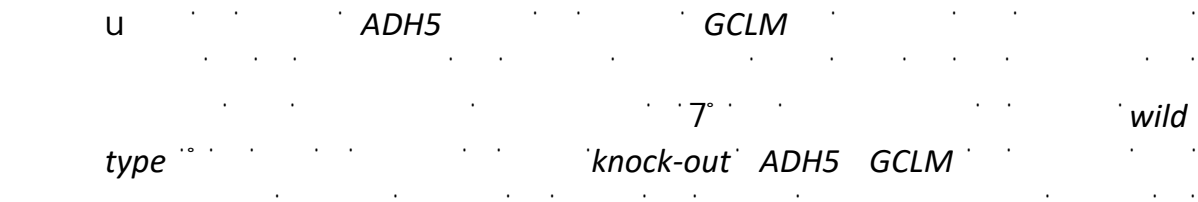


Figura 21d/f

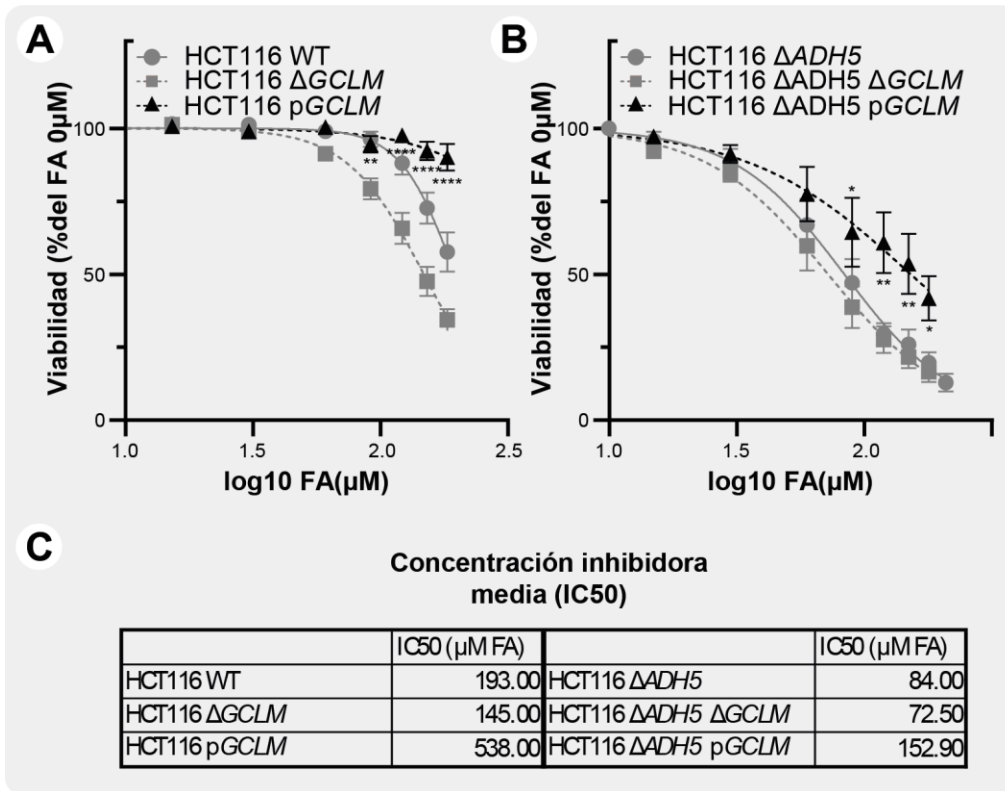


Figura 22 – Ensayos de viabilidad con células HCT116 Δ GCLM pGCLM complementadas. Se muestran los ensayos de viabilidad, tanto para células HCT116 pGCLM (A) como para HCT116 Δ ADH5 pGCLM (B) con sus correspondientes comparaciones. A su vez, se muestran los IC50s calculados para cada caso. Los datos representan la media +/- SEM y los asteriscos corresponden a la comparación estadística (Δ GCLM vs pGCLM y Δ ADH5 Δ GCLM vs Δ ADH5 pGCLM) realizada por 2way-ANOVA (método Tukey).

U

) =

80=

O

=#U

8#UJ

#

@

*“Cisteína, un potencial mecanismo de
defensa alternativo frente a la toxicidad
del formaldehído”*

) = V
=#u -
7
u
Vk7
7
M° h Vk7

Tumores con mutaciones en *KEAP1* muestran menor dependencia en genes asociados a la síntesis de GSH

@ M° h
Vk7 O

k " h
KEAP1

Pan-cancer analysis of whole genomes -ICGC/TCGA, Nature 2020- U
Oy°) lung adenocarcinoma
O## lung squamous
cell carcinoma **Figura 23a** -

Pan-Lung Cancer -TCGA, Nat Genet 2016 Lung Adenocarcinoma, TCGA-Firehouse Legacy Lung Squamous Cell Carcinoma, TCGA, Firehouse Legacy **Figura 23b**)

@

KEAP1 Oy°)
O## ver **Figura 23c**)
Vk7
M° h
7° 8o=

h) U
KEAP1 O

8o= oG# 8#G# 8#U
KEAP1

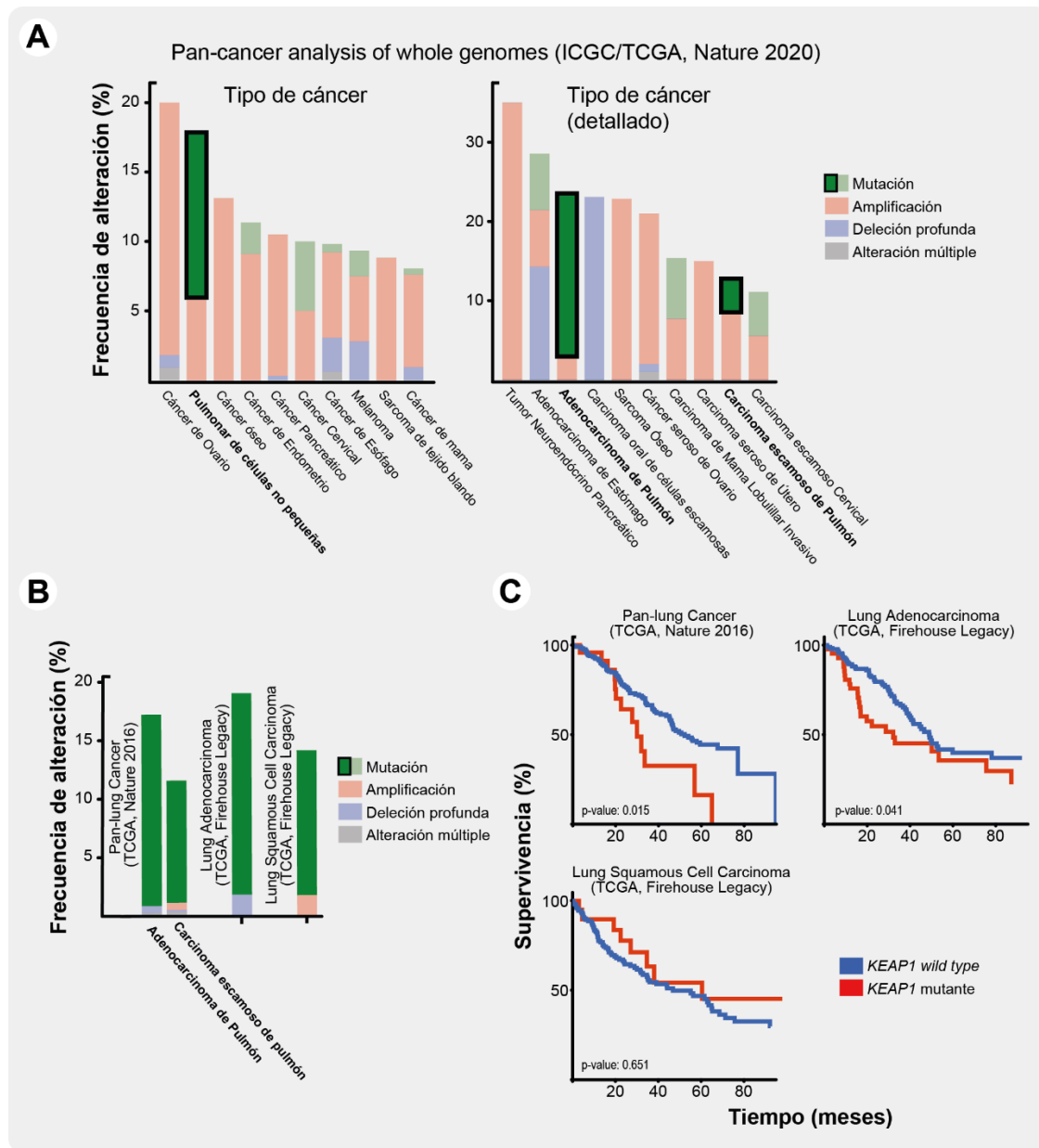


Figura 23 – Frecuencia de mutaciones afectando KEAP1 en cáncer. Se muestran los resultados de analizar la frecuencia mutacional de KEAP1 utilizando el portal cBioPortal (cbioportal.org) y los datos de un estudio cubriendo todos los tipos de cáncer (A). También se muestra un análisis similar al utilizar los datos de estudios cubriendo sólo cáncer de pulmón (B). Además, para los mismos estudios analizados anteriormente, se muestra la prognosis general de pacientes según el estado mutacional de *KEAP1* de sus tumores (C).

Figura 24a

Qy)

lung adenocarcinoma

Figura 24b

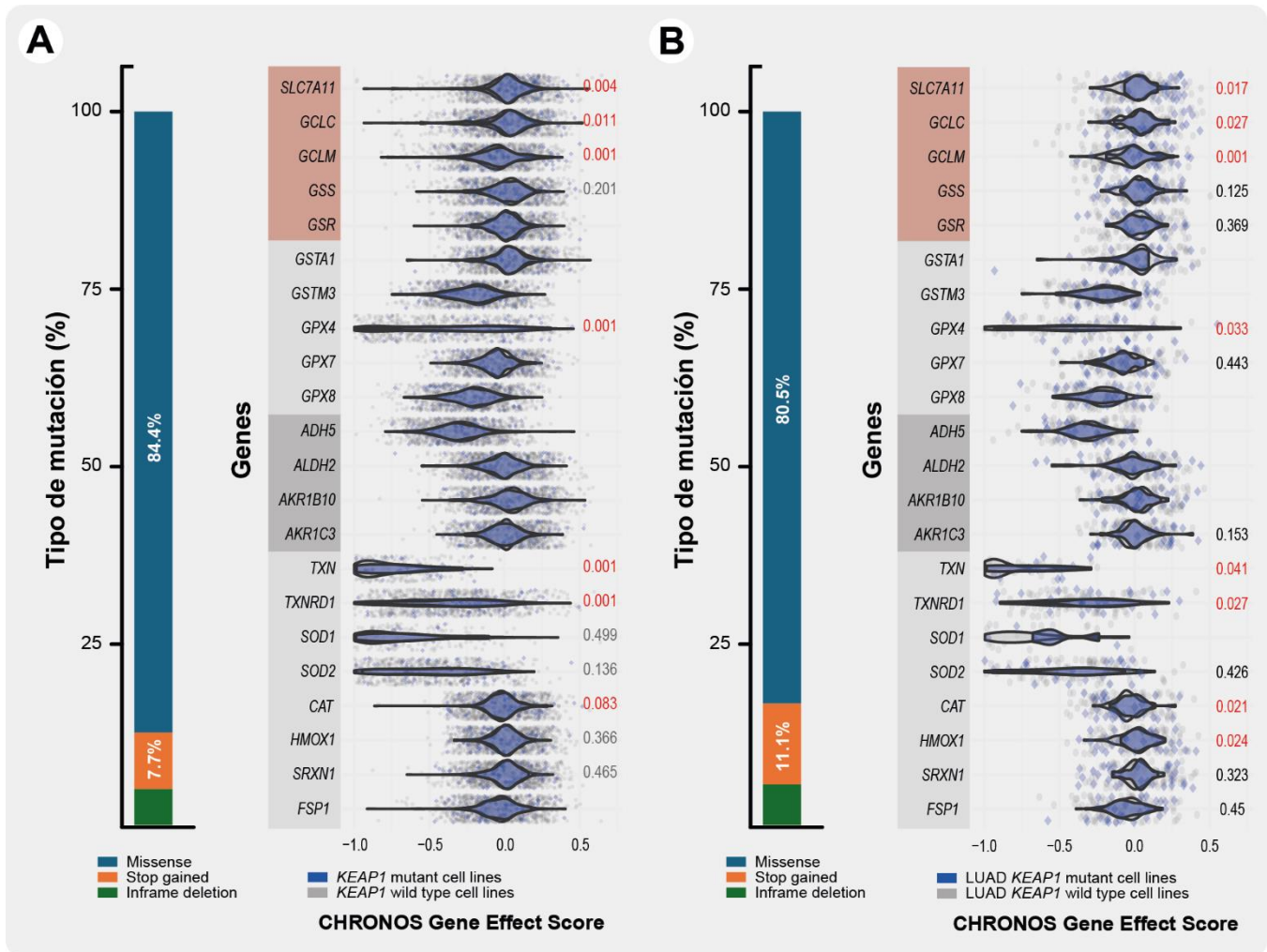


Figura 24 – Esencialidad de genes asociados al metabolismo del GSH en líneas celulares según el estado mutacional de *KEAP1*. Se muestran los análisis resultantes de incorporar todas las líneas celulares disponibles en la base de datos del portal DepMap (A) y de incorporar únicamente las derivadas de adenocarcinoma de pulmón (B). En cada caso se grafican: como porcentajes del total, los tipos de mutación presentes en la población de líneas celulares *KEAP1* mutantes analizadas; el score de esencialidad (CHRONOS Gene Effect Score) para cada gen listado y línea celular analizada (como puntos grises o azules); como diagramas de violín, el score de esencialidad para cada población de células según el estado mutacional de *KEAP1*; y los p-valores resultantes de comparar ambas poblaciones a través de 1way-ANOVA (método Dunnett).

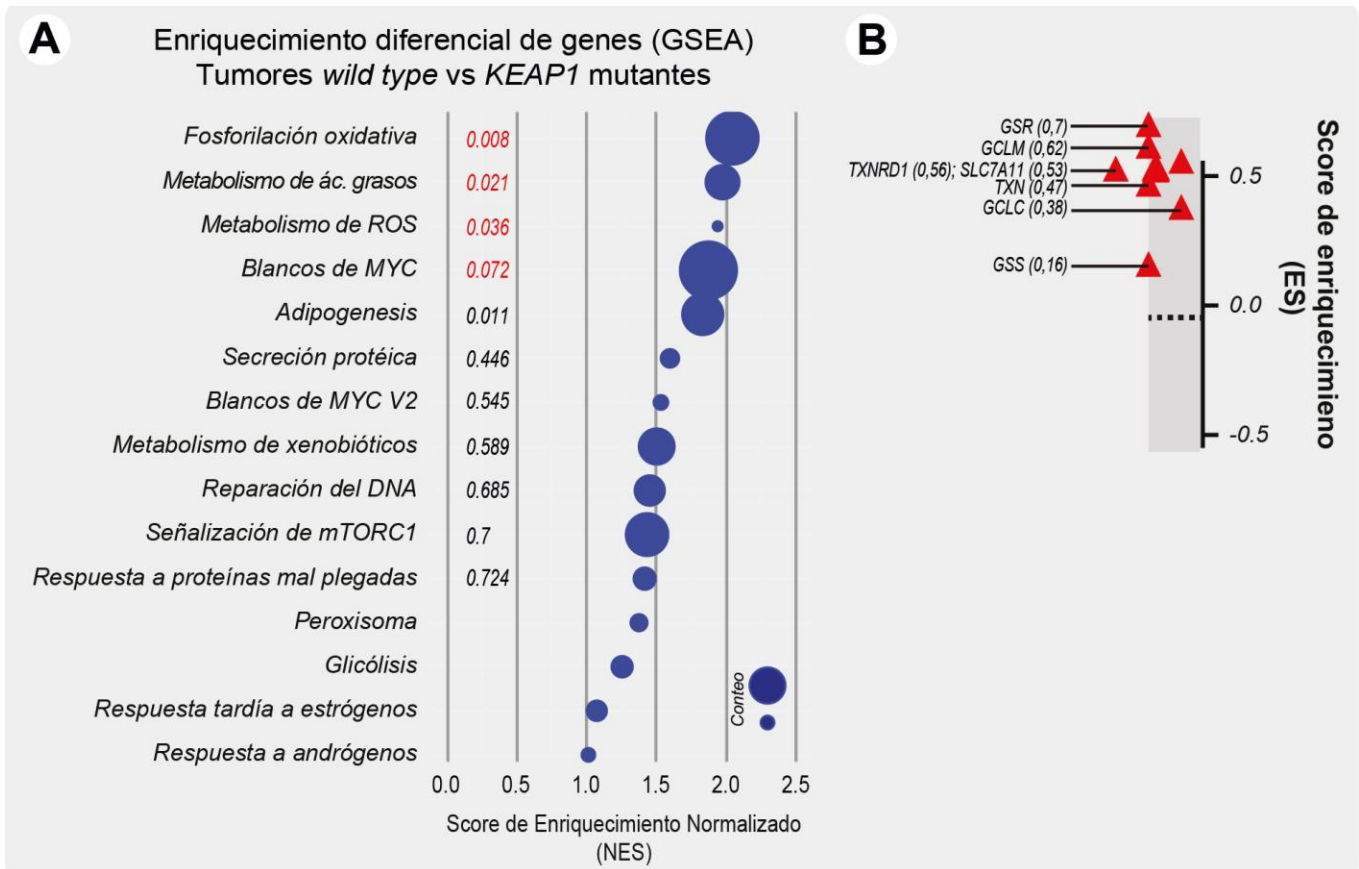
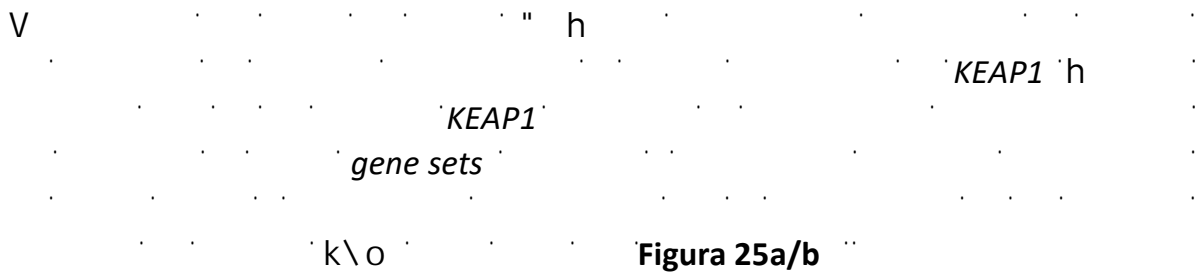
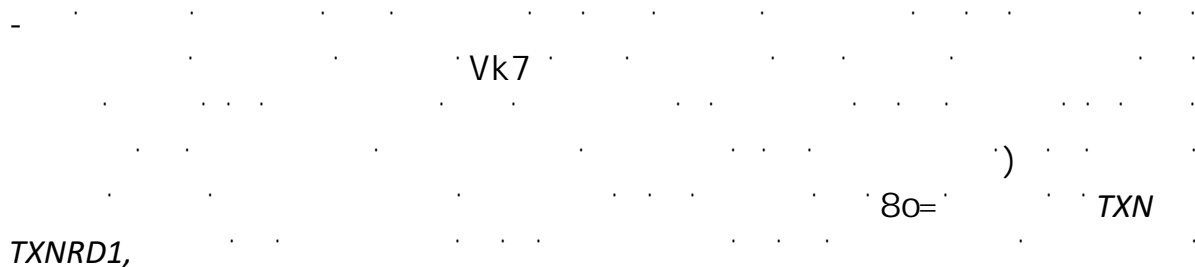


Figura 25 – Perfil de expresión de tumores según el estado mutacional de *KEAP1*. Se muestran resultados del análisis de enriquecimiento diferencial de genes (GSEA) contrastando tumores según el estado mutacional de *KEAP1* (A) y los scores normalizados de enriquecimiento individuales resultantes para genes de interés (B).



ver Figura 25c

h

type

KEAP1 wild type
KEAP1 wild type

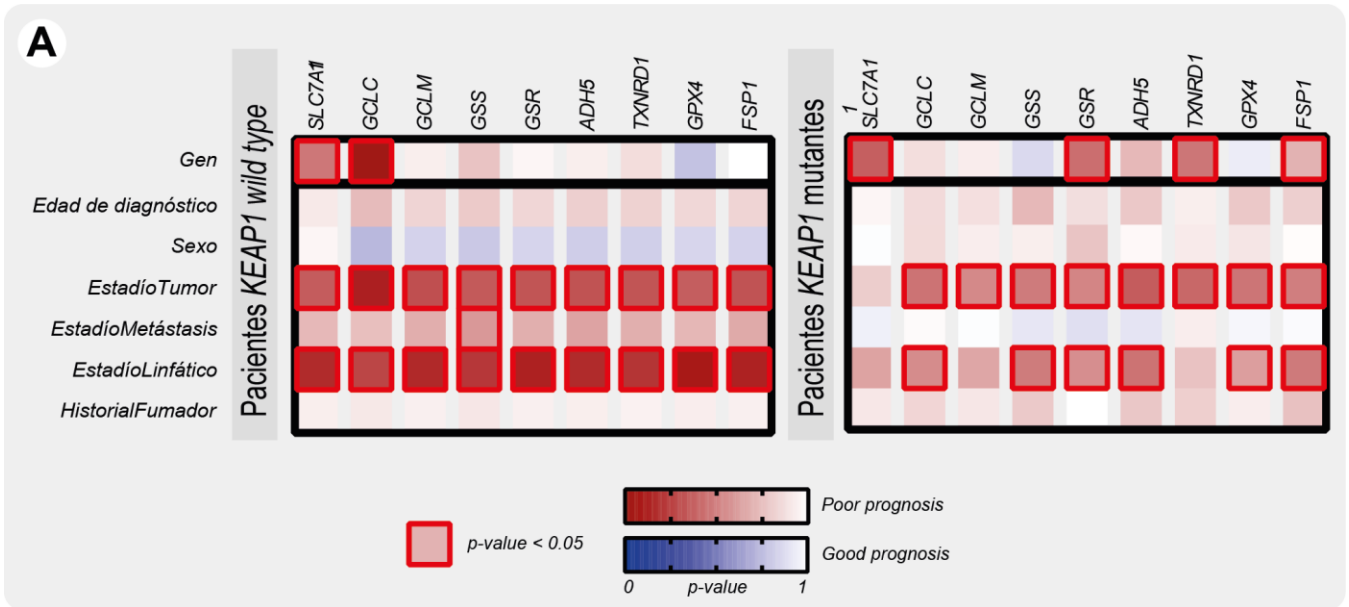


Figura 26 – Prognosis de pacientes en función del estado mutacional tumoral de *KEAP1*. Se muestran los resultados del análisis de prognosis en función de los niveles de expresión de genes de interés tanto en presencia o ausencia de mutaciones en *KEAP1*, efectuando para ello un modelo de riesgos proporcionales (regresión de Cox) para cada uno de los genes (listados en la parte superior) en conjunto con las variables de control (listadas en la parte izquierda). Los efectos reconocidos en la prognosis se representan con los colores rojo (correlación negativa) o azul (correlación positiva), mientras que la magnitud de los p-valores se representa según la intensidad del color correspondiente y se destacan aquellos menores al valor de corte 0,05.

KEAP1

8#0#

26 #

Figura 26

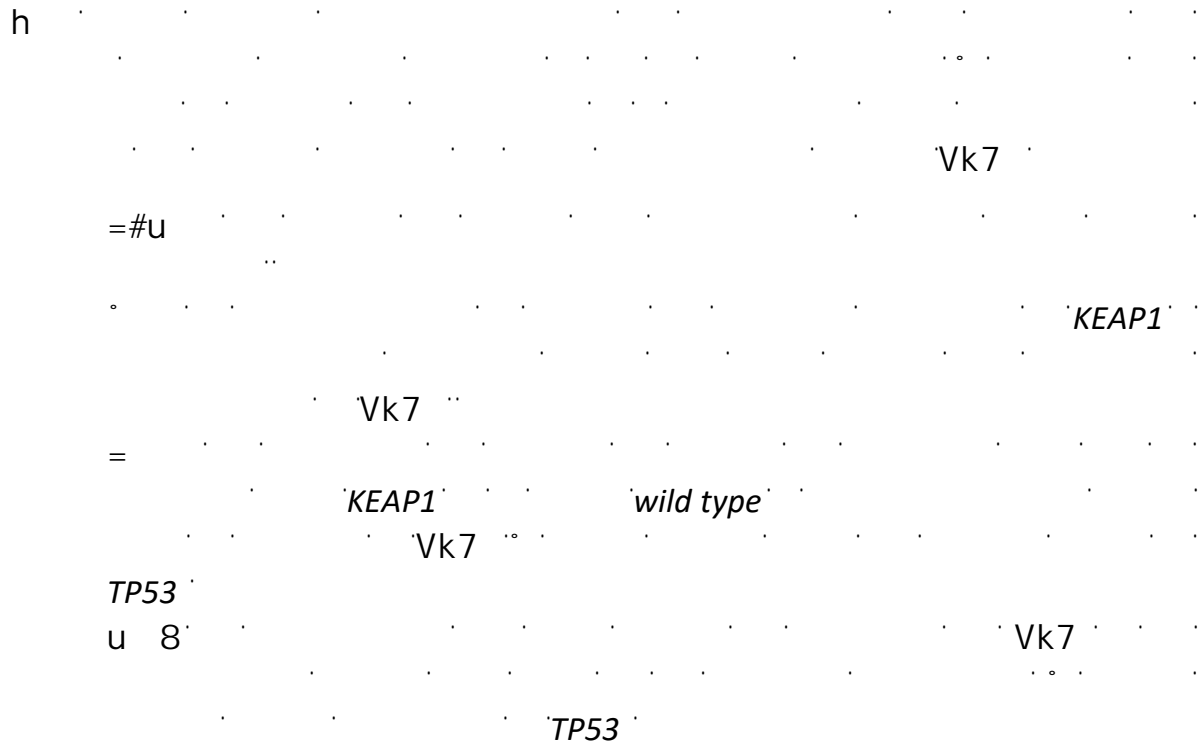
KEAP1

80=

ver Figura 23c

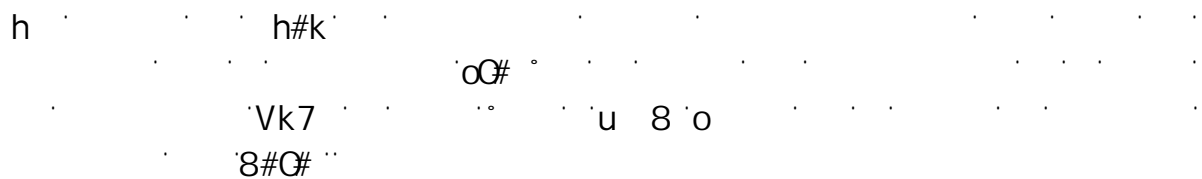
80=

Células A549 y T98G recapitulan lo observado en tumores con hiperactividad en NRF2



@

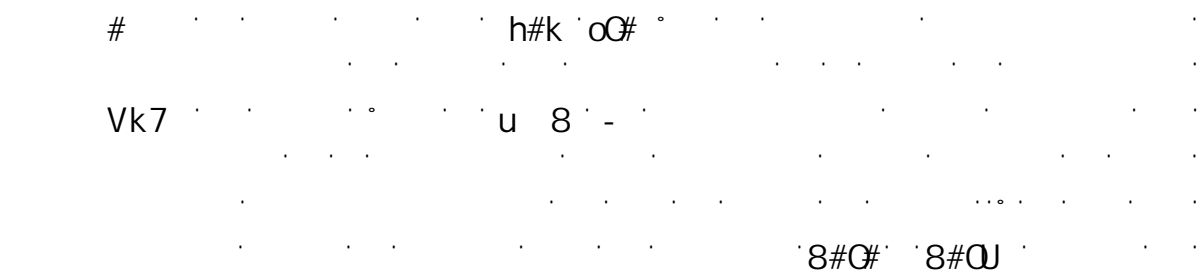
80= 7



h

wester blot

Figura 28a/b



0

u 8 k

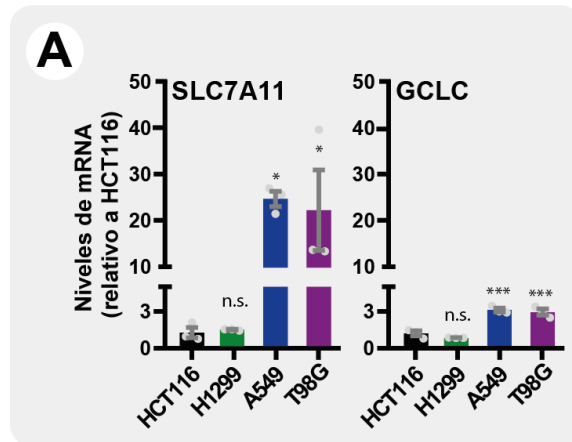


Figura 27 – Cuantificación por qPCR de los niveles de expresión de SLC7A11 y GCLC en las líneas celulares seleccionadas. Los asteriscos derivan de una comparación estadística por 1way-ANOVA (método Dunnett).

Vk7

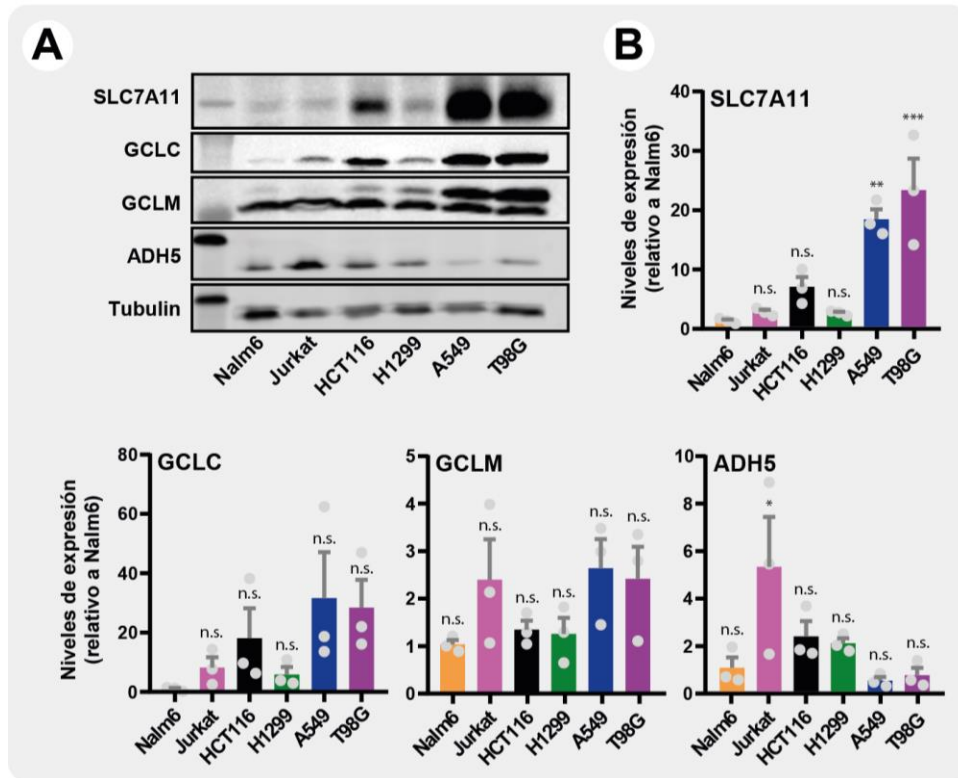
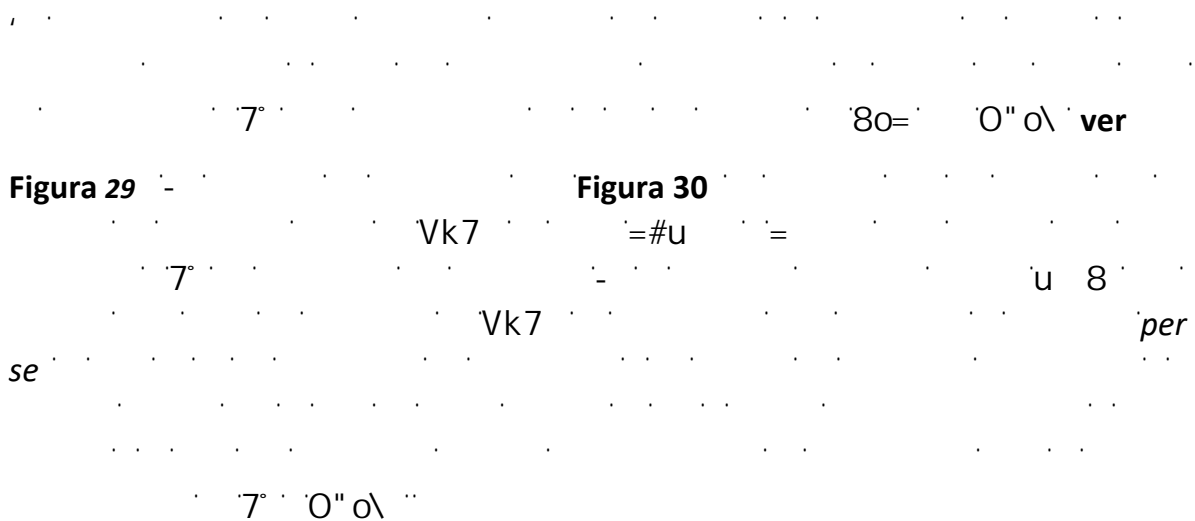


Figura 28 – Determinación por *western blot* de proteínas asociadas al metabolismo de GSH en las líneas celulares seleccionadas. Se muestra una fotografía representativa (A) y cuantificaciones correspondientes (B) para los niveles de expresión de GCLC, GCLM y SLC7A11. En cada caso, los asteriscos corresponden a la comparación estadística contra los niveles de Nalm6 por 1way-ANOVA (método Dunnett).

Células A549 previenen la toxicidad de formaldehído a través de mecanismos independientes de glutatión



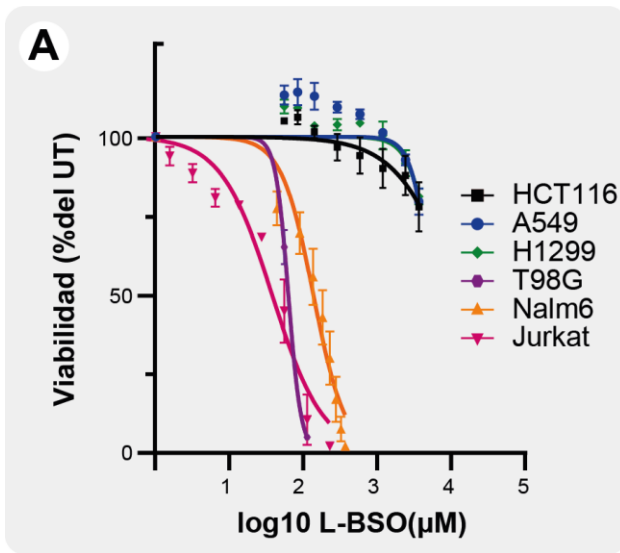


Figura 29 – Evaluación de la sensibilidad a concentraciones crecientes de L-BSO en el panel de líneas celulares completo.

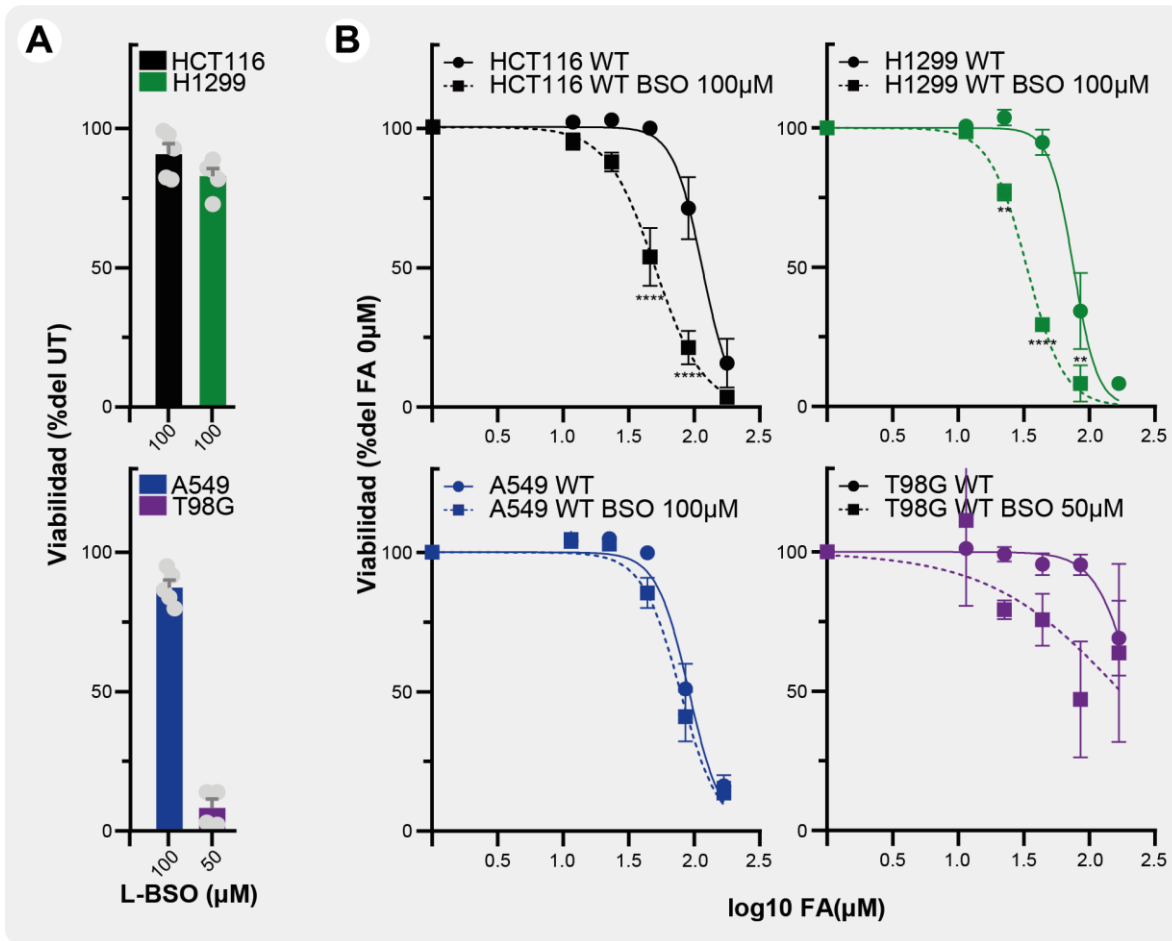


Figura 30 - Ensayos de viabilidad contra FA en ausencia de GSH. Se muestran las viabilidades de base obtenidas para las distintas líneas celulares ante las concentraciones elegidas del inhibidor L-BSO (A) y los resultados obtenidos de combinar L-BSO en dichas concentraciones al mismo tiempo que se aplicaban concentraciones crecientes de FA (B). Los asteriscos corresponden a la comparación estadística realizada contra la condición sin inhibidor por 2way-ANOVA (método Tukey).

#

Vk7

7°

7°

80= k

80=

Figura 31c

=#u

=

Figura

31a/b #

u 8

0" o\

80=

7°

) = h

7°

V

7°

=#u

) =

=

7°

80= #

) =

u 8

7°

) = o

80=

=#u

ver Figura 17

80=

7°

Vk7

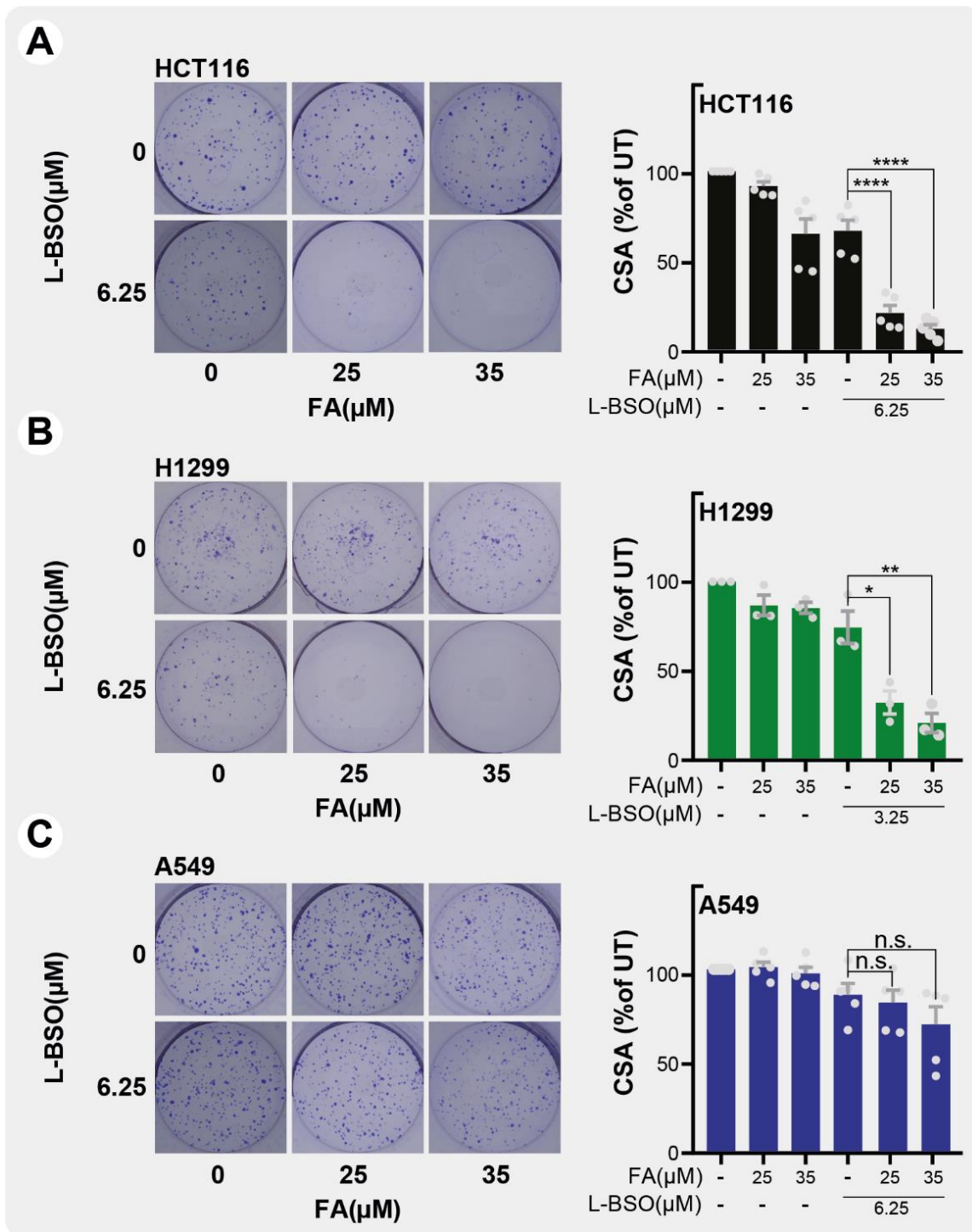


Figura 31 – Ensayos de formación de colonias contra FA en ausencia de GSH. Se muestran fotografías representativas y cuantificaciones obtenidas en ensayos de formación de colonias al combinar L-BSO y concentraciones crecientes de FA para las líneas celulares HCT116 (A), H1299 (B) y A549 (C). Los indicadores estadísticos resultan de una comparación por 1way-ANOVA (método Dunnett).

Expresión de KEAP1 wild type restituye el rol indispensable del glutatión en células A549

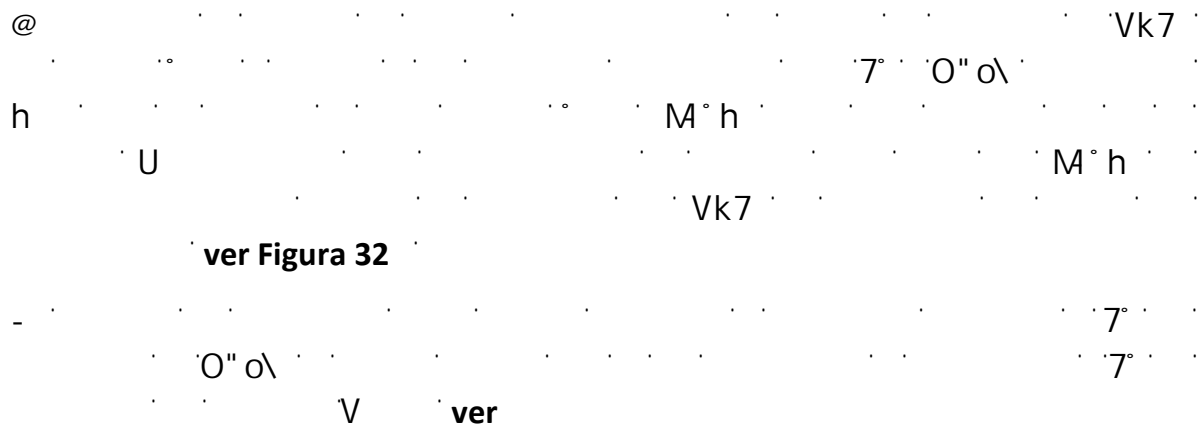


Figura 33b/c

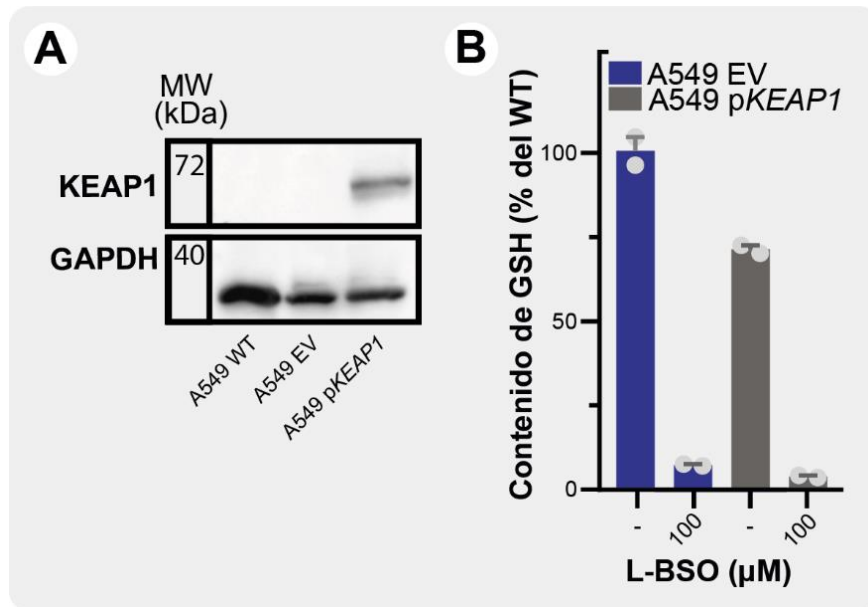


Figura 32 – Obtención de células A549 sobre-expresando KEAP1. Se muestra el chequeo por técnica de *western blot* de la expresión de KEAP1 en la línea celular estable generada (A) y los niveles de GSH medidos en cada caso (B).

Vk7

KEAP1 wild type

Vk7 -

Vk7

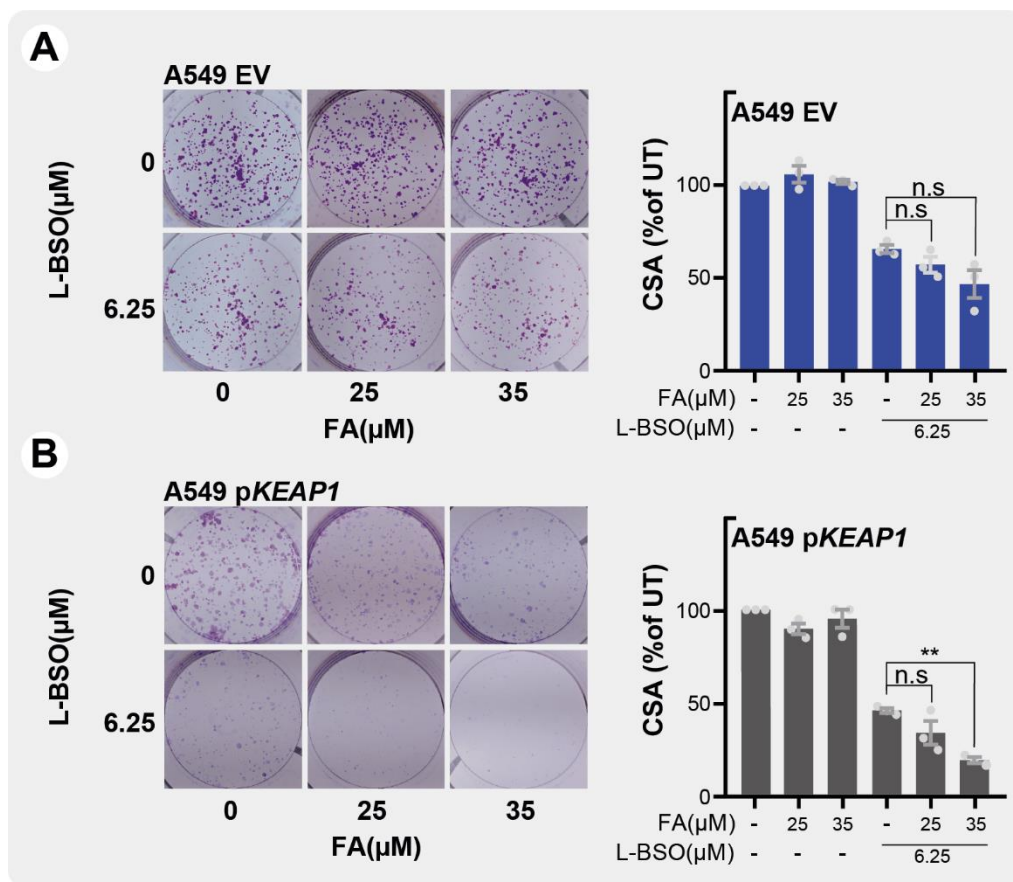


Figura 34 - Ensayos de formación de colonias en presencia de FA. Se muestran fotografías representativas y cuantificaciones obtenidas en ensayos de formación de colonias al combinar L-BSO y concentraciones crecientes de FA para las líneas celulares A549 EV (A) y A549 pKEAP1 (B). Los indicadores estadísticos resultan de una comparación por 1way-ANOVA (método Dunnett).

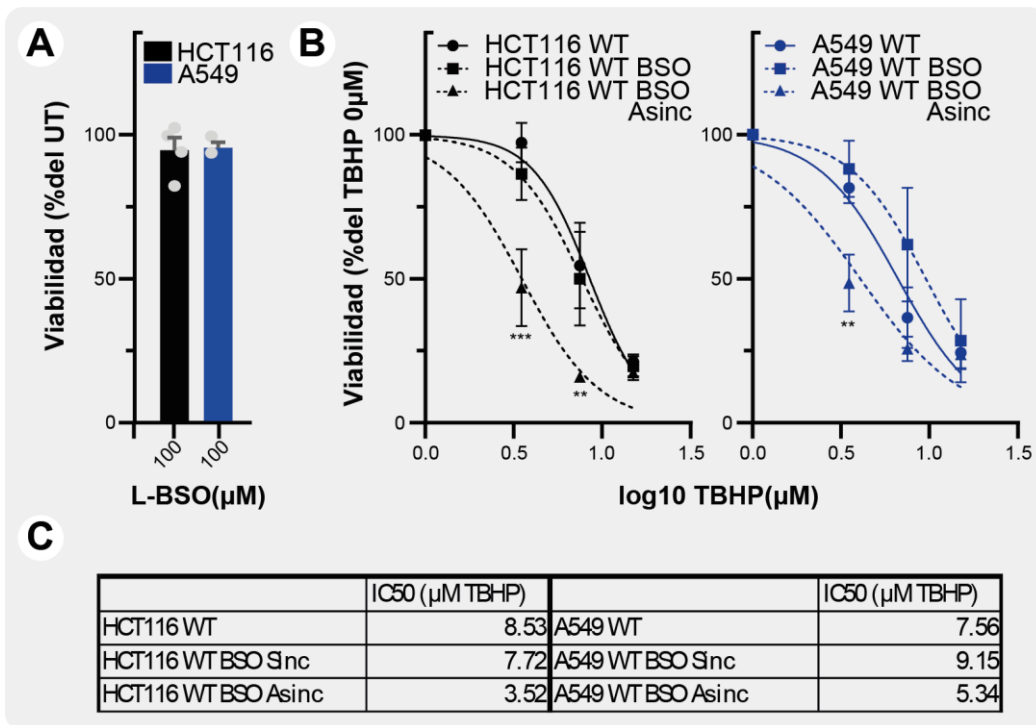


Figura 35 – Ensayos de viabilidad ante TBHP. Se muestran las viabilidades de base ante el inhibidor L-BSO (A) y los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad para células HCT116 y A549, ambas ante concentraciones crecientes de TBHP y combinación sincrónica y asincrónica (24hs antes del TBHP) con L-BSO (B). Se muestran también los IC50s calculados a partir de dichos ensayos (C). Los asteriscos corresponden a la comparación contra el tratamiento sin L-BSO por 2way-ANOVA (método Tukey).

La síntesis de glutatión sigue siendo importante para lidiar con algunos agentes oxidantes, inclusive en células A549

o @ 80=

7°

7°

h

= u" = h k\o

7° =#u

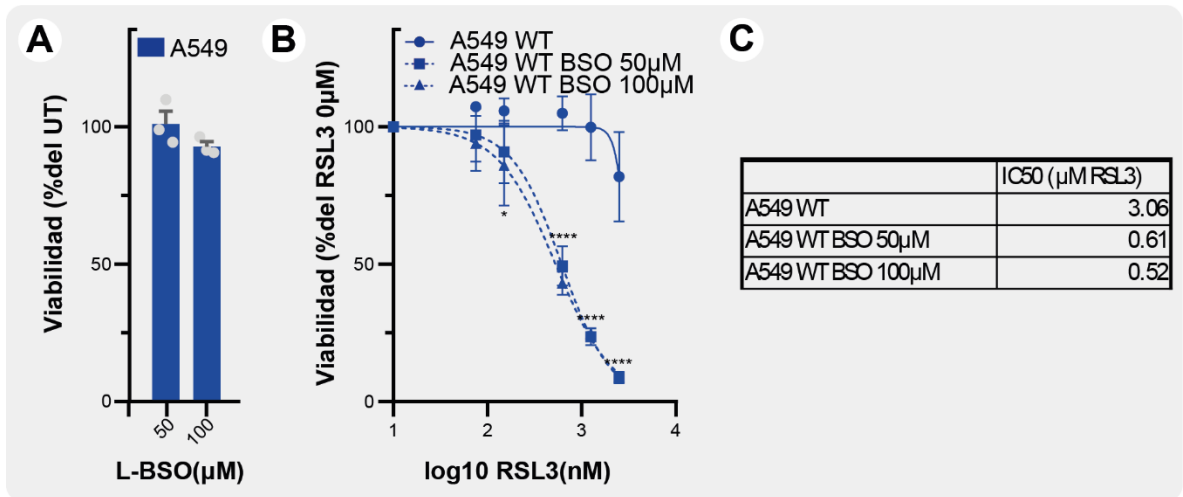
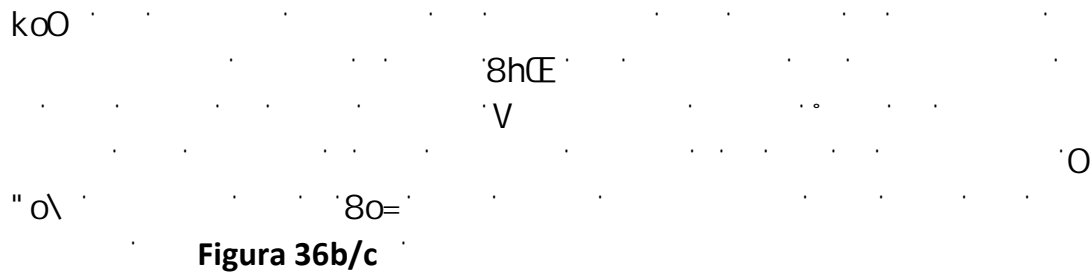


Figura 36 – Ensayos de viabilidad ante RLS3. Se muestran las viabilidades de base con el inhibidor L-BSO (A), las viabilidades obtenidas para las combinaciones de RLS3 y L-BSO (50 μM y 100 μM) (B) y los IC50s calculados a partir de dichos ensayos. Los asteriscos derivan de una comparación estadística por 2way-ANOVA (método Tukey).



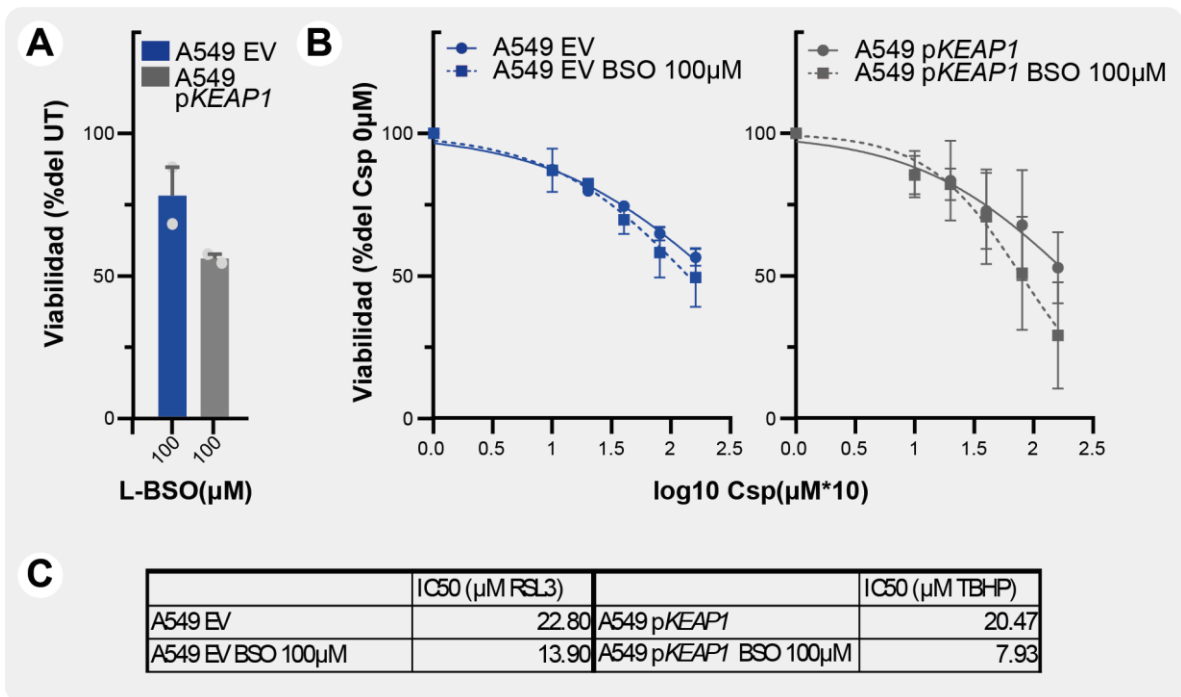


Figura 37 – Ensayos preliminares de viabilidad con Cisplatino. Se muestran las viabilidades de base obtenidas ante los tratamientos con L-BSO (A) y ante la combinación de dicho inhibidor con Cisplatino, tanto para células A549 EV como para A549 pKEAP1 (B). También se muestran los IC50s calculados a partir de dichos resultados (C).

#

O" o\

KEAP1 Figura 37b # Figura

37c - † #

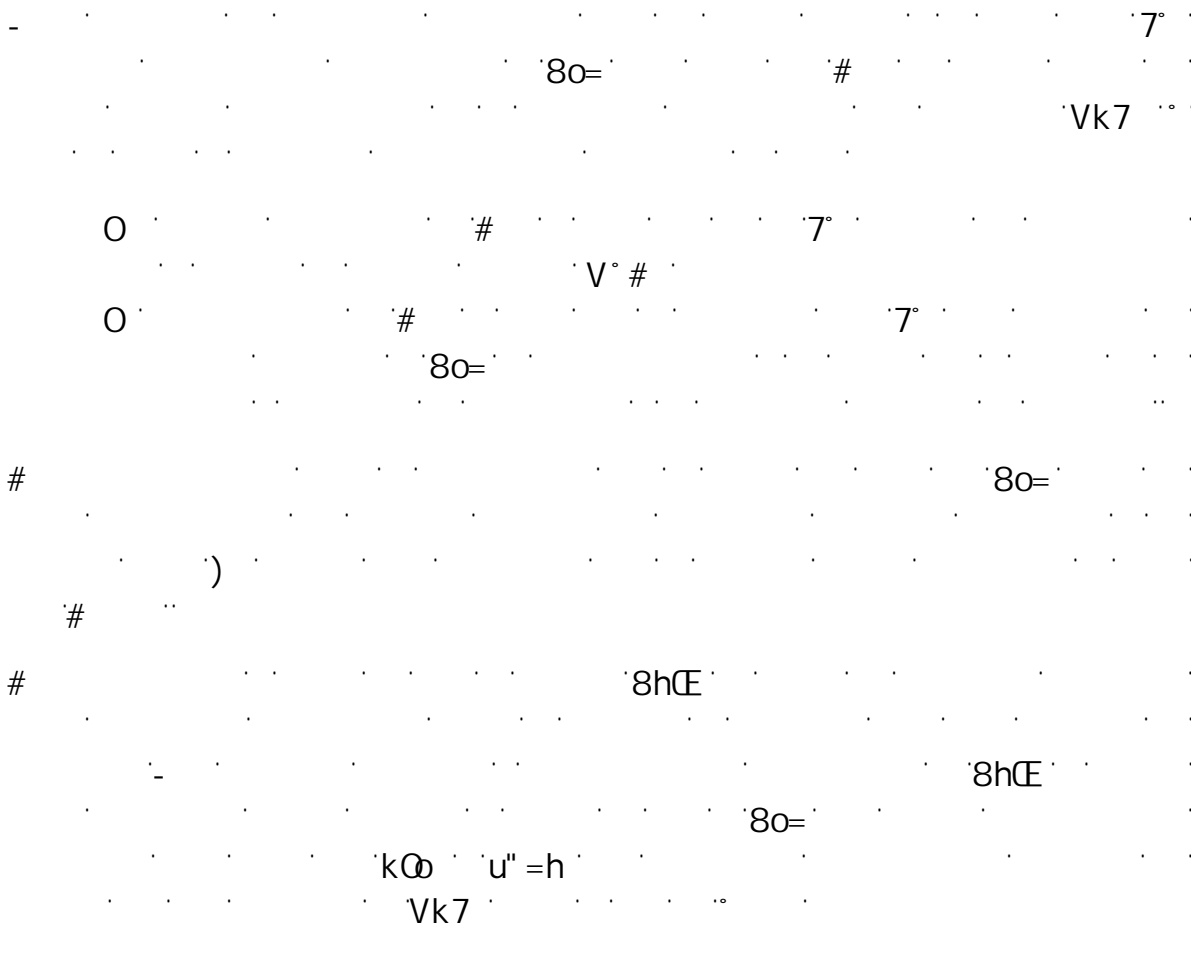
Vk7

7° #

O" o\

Vk7 u" =h' koO

Vk7



La activa importación de cistina es necesaria para prevenir la toxicidad de formaldehído, inclusive en células A549

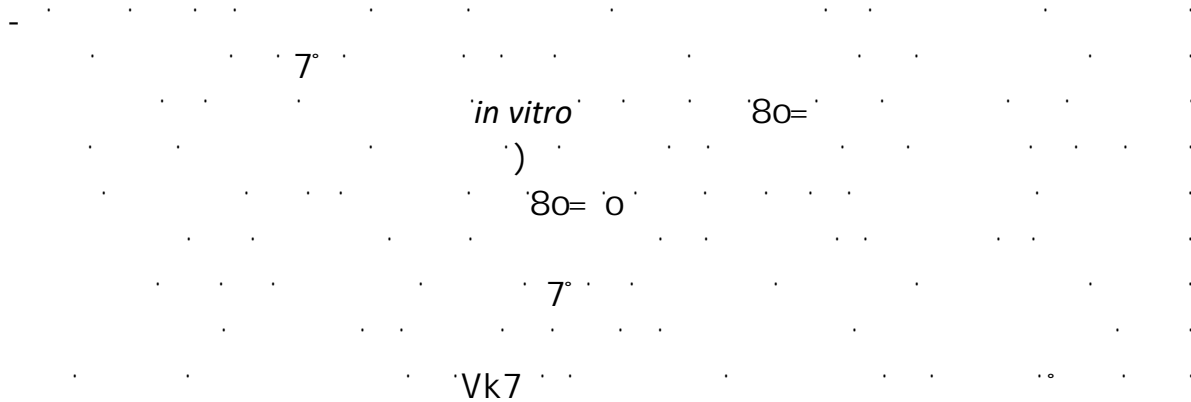


Figura 27

Figura 28

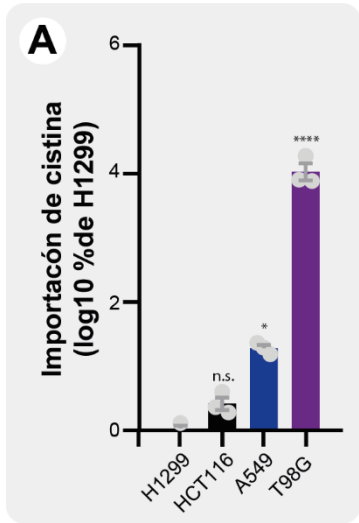


Figura 38 – Determinaciones de la velocidad de importación de cistina en células H1299, HCT116, A549 y T98G. Los asteriscos derivan de una comparación por 1way-ANOVA (método Dunnett).

@

oG#

u 8

=

u 8

Figura 38

Vk7

oG#

o

oG#

7 h

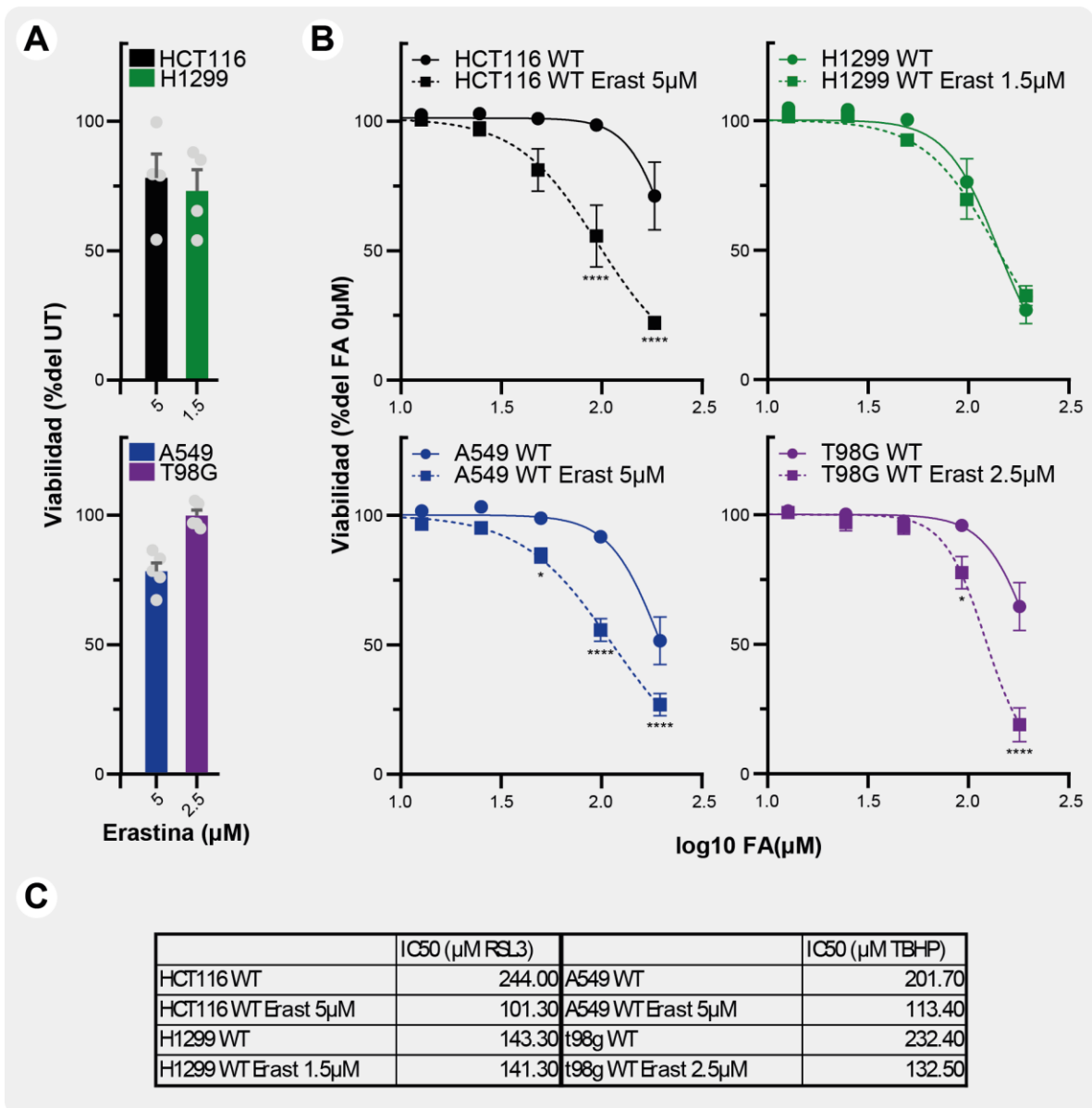


Figura 39 – Ensayos de viabilidad ante combinaciones de FA y Erastina. Se muestran las viabilidades de base observadas ante las distintas concentraciones de Erastina utilizadas para cada línea celular (A), los resultados obtenidos de combinar dicho inhibidor con FA (B), y los IC50s calculados a partir de dichos resultados. Los asteriscos corresponden a la comparación estadística por 2way-ANOVA (método Tukey).

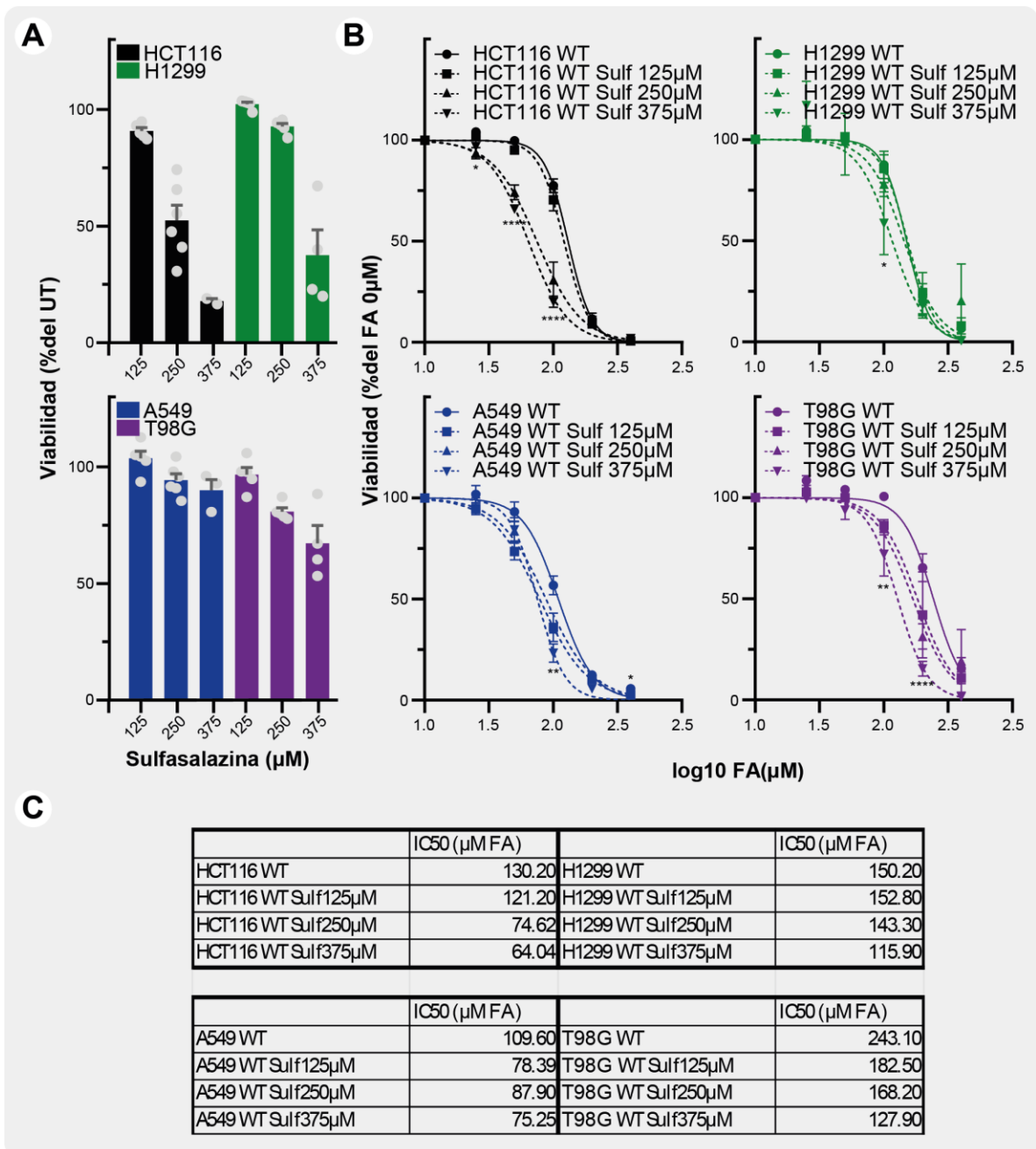


Figura 40 – Ensayos de viabilidad con el inhibidor Sulfasalazina. Se muestran las viabilidades de base obtenidas ante tres concentraciones diferentes del inhibidor (A), los resultados obtenidos de combinar concentraciones crecientes FA y Sulfasalazina (B) y los IC50s calculados a partir de dichos resultados (C). Los asteriscos derivan de una comparación estadística por 2way-ANOVA (método Tukey).

=#u

80= 0" o\ 0

=

oo#

7° k

u 8

Vk7

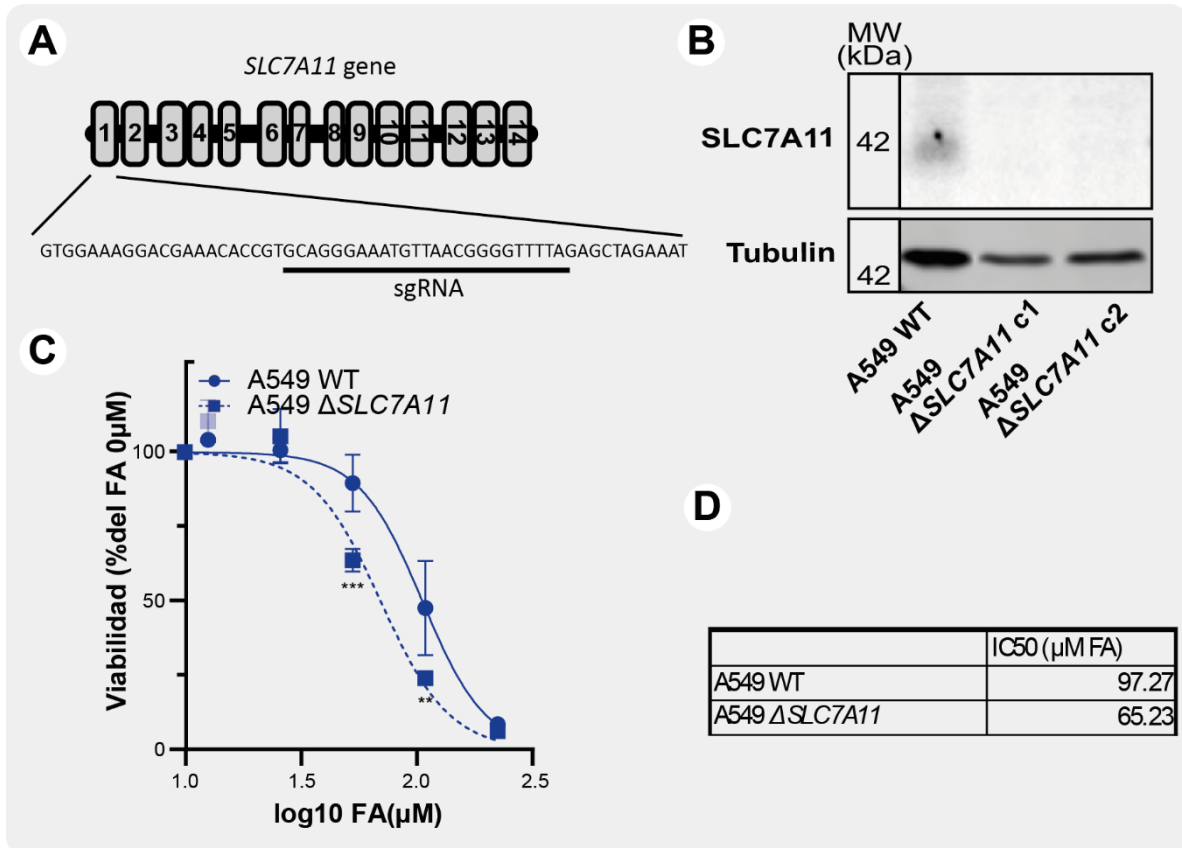


Figura 41 - Ensayos de viabilidad con células A549 *SLC7A11* knock out. Se muestra la secuencia del sgRNA utilizado para la obtención de la línea celular deficiente en *SLC7A11* (A), el chequeo por técnica de *wester blot* de dicha deficiencia (B), los resultados obtenidos al someter células A549 *wild type* y A549 Δ *SLC7A11* a concentraciones crecientes de FA en ensayos de viabilidad (C) y los IC50s calculados a partir de dichos resultados (D). Los asteriscos derivan de una comparación estadística por 2way-ANOVA (método Tukey).

oo#

0

0

7°

Figura 40

#

=#u =

Figura 40a

Vk7

u 8

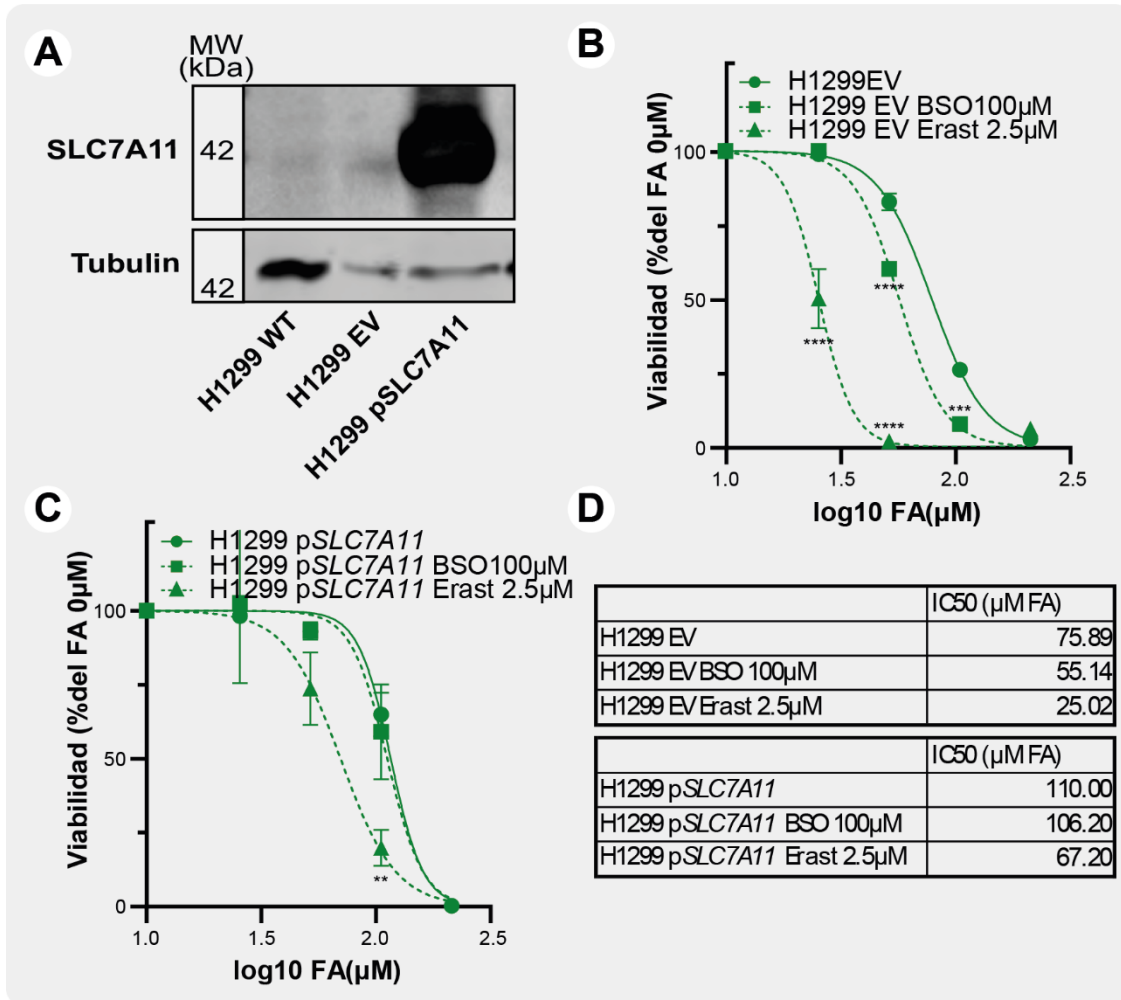


Figura 42 - Ensayos de viabilidad con células H1299 pSLC7A11. Se muestra el chequeo por técnica de *wester blot* de los niveles de SLC7A11 expresados en cada caso (A), los resultados obtenidos en ensayos de viabilidad al someter células H1299 EV (*empty vector*) (B) y H1299 pSLC7A11 (C) a concentraciones crecientes de FA en combinación o no con L-BSO y Erastina, y los IC₅₀s calculados a partir de dichos resultados (D). Los asteriscos derivan de una comparación estadística por 2way-ANOVA (método Tukey).

h

off targets

#k@hk #

knock out ° oG# °

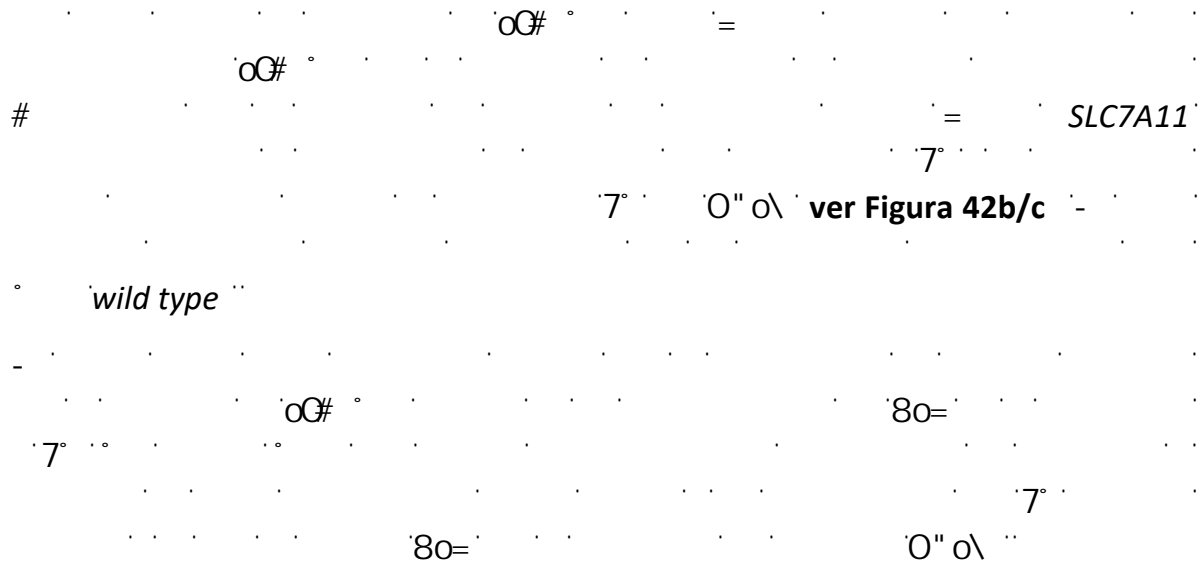
Figura 41a/b

7

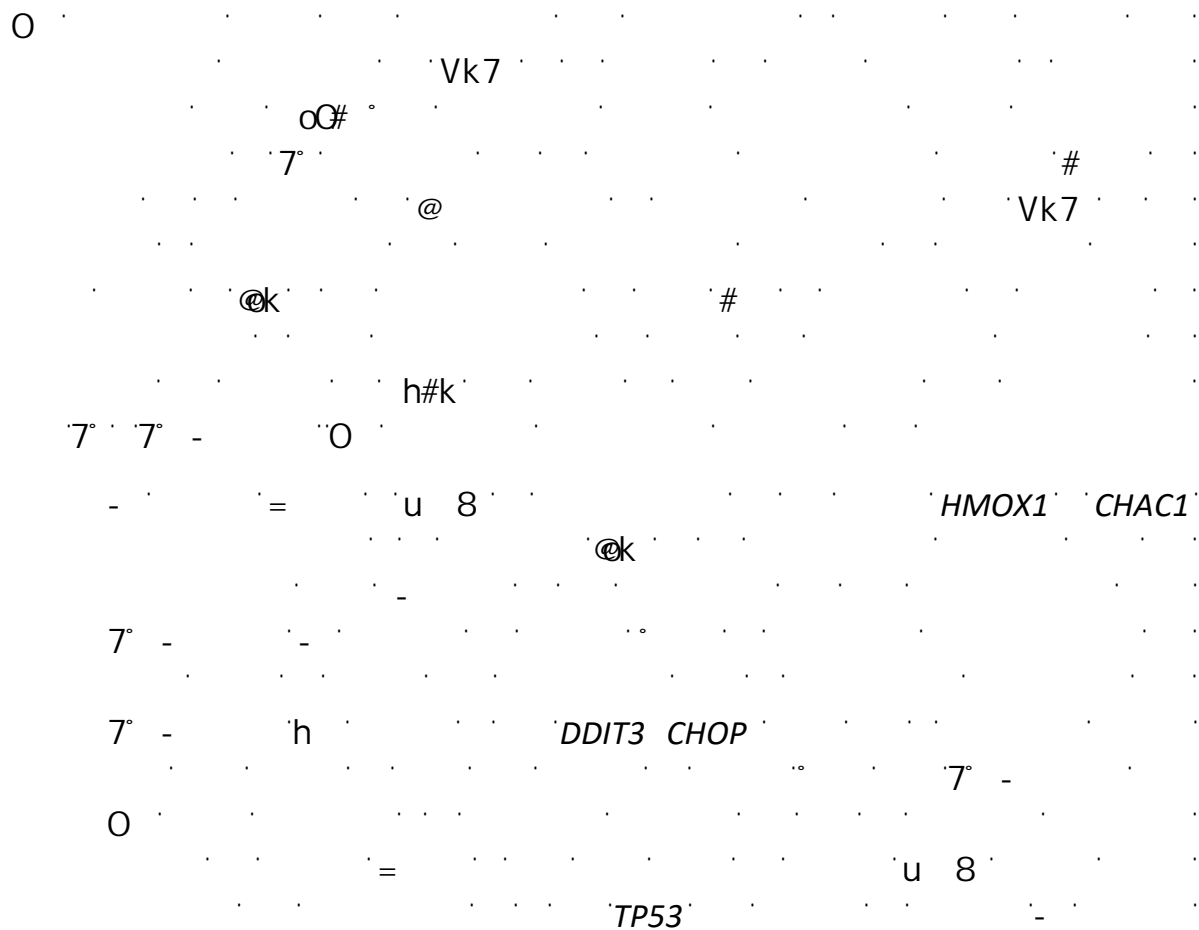
wild

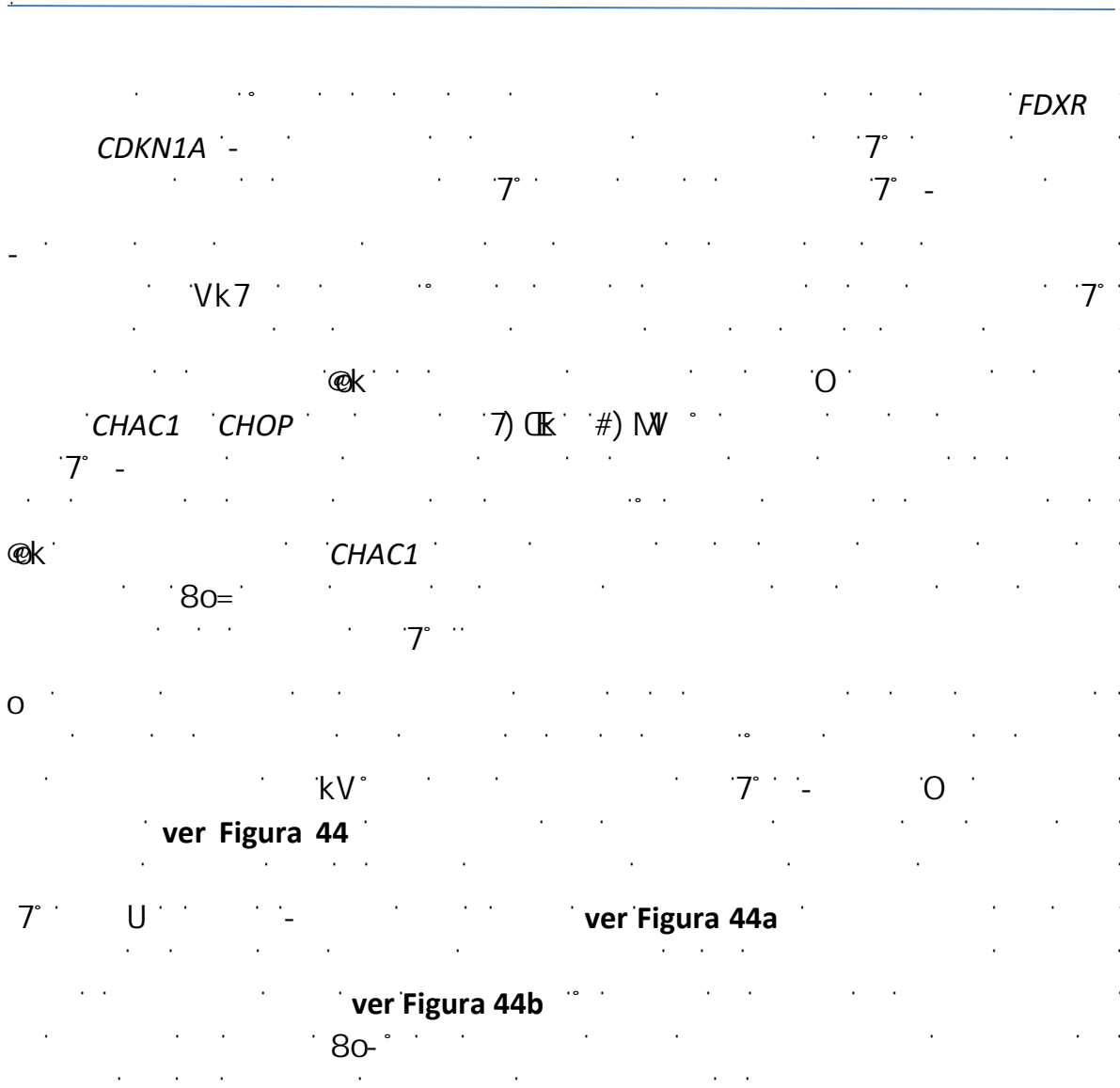
type Figura 41c/d

7



Una respuesta integrada al formaldehído sería más eficiente en células tumorales adaptativamente preparadas





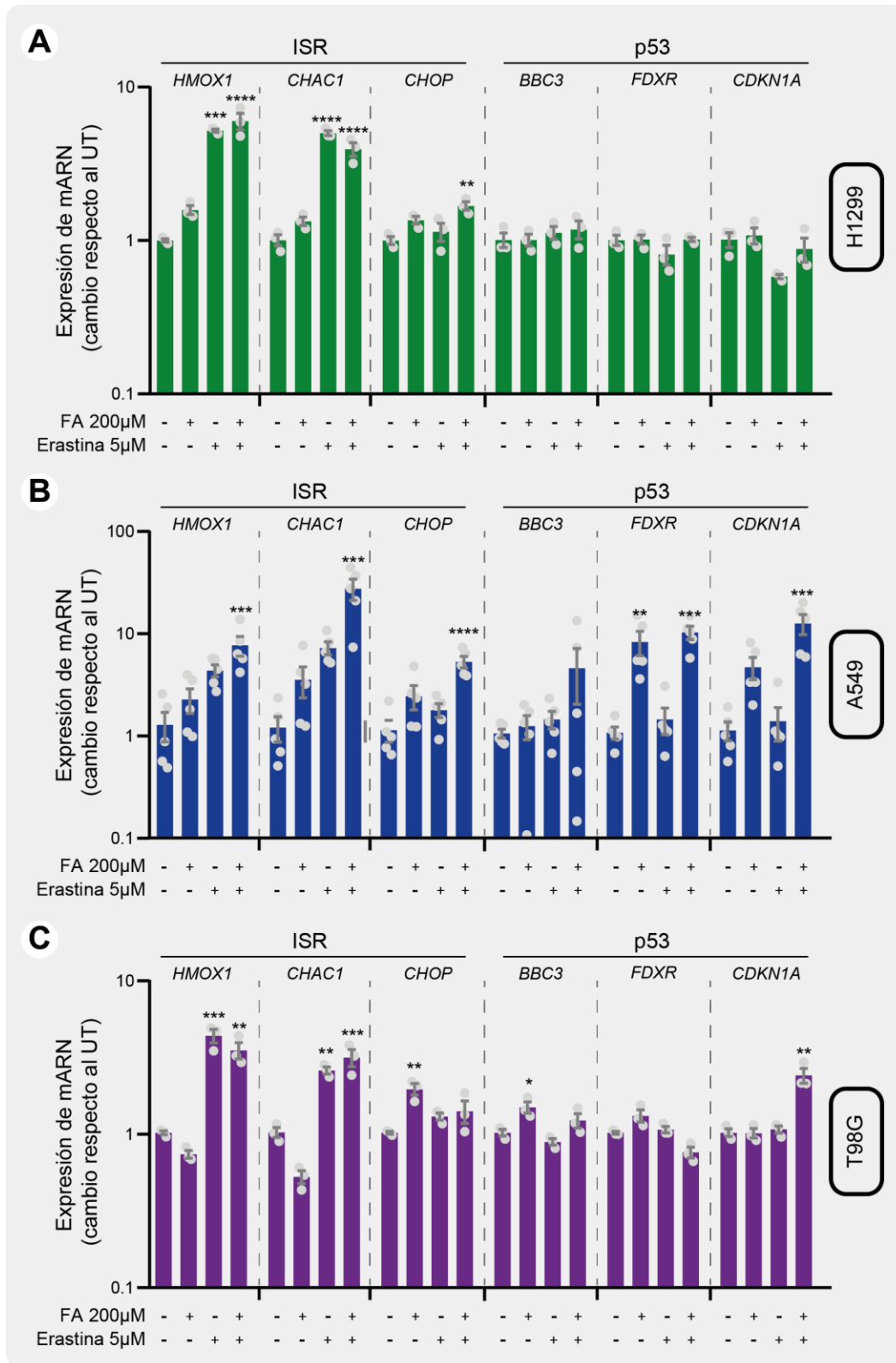


Figura 43 – Determinaciones por qPCR de genes asociados con la respuesta ISR y la respuesta mediada por p53. Se muestran los resultados obtenidos en células H1299 (A), A549 (B) y T98G (C).

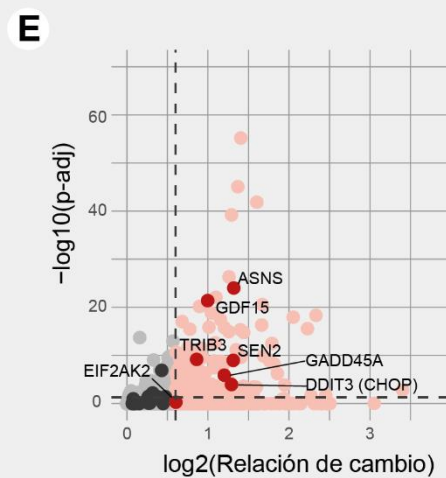
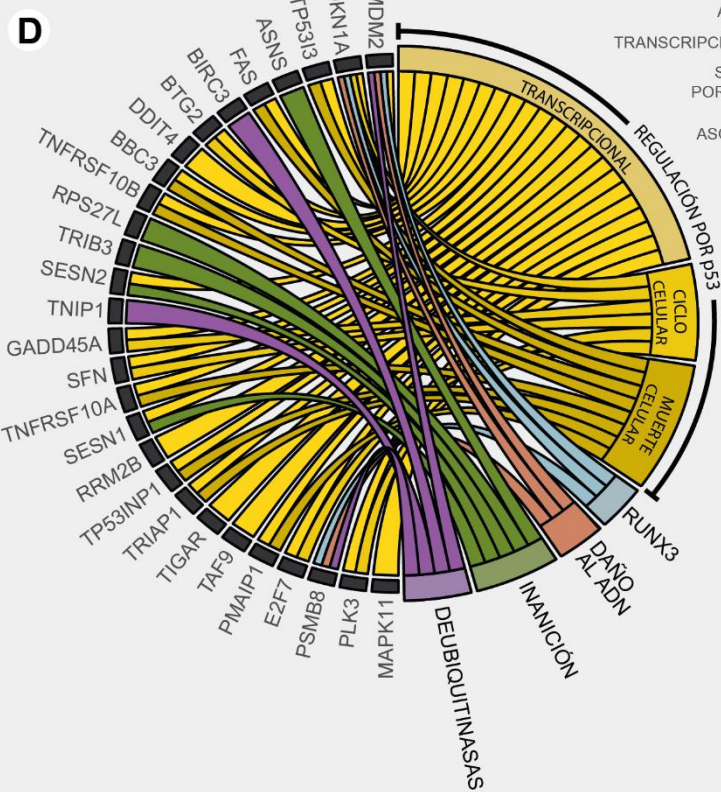
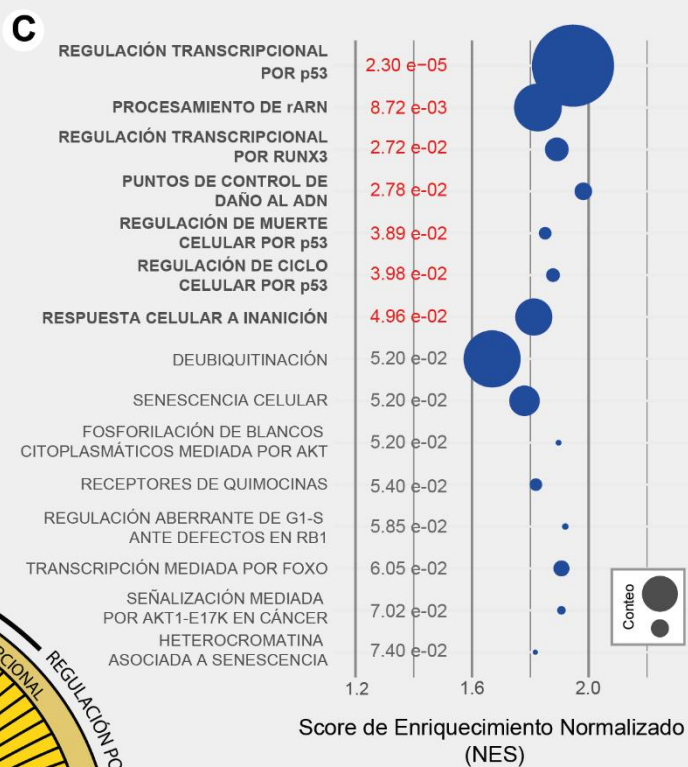
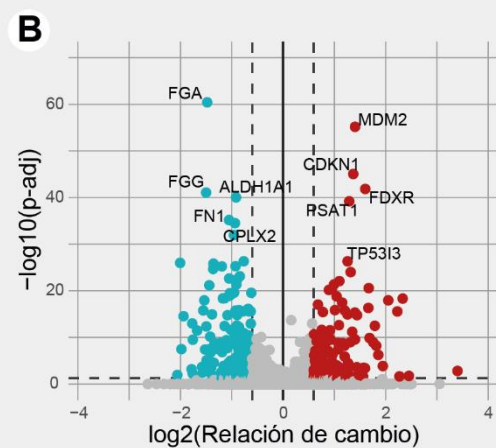
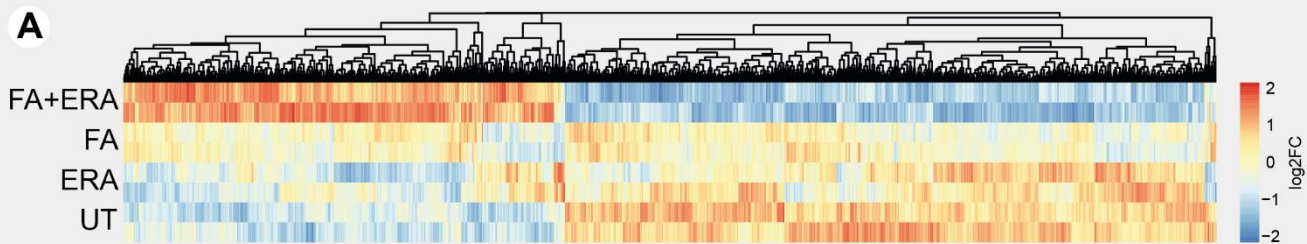
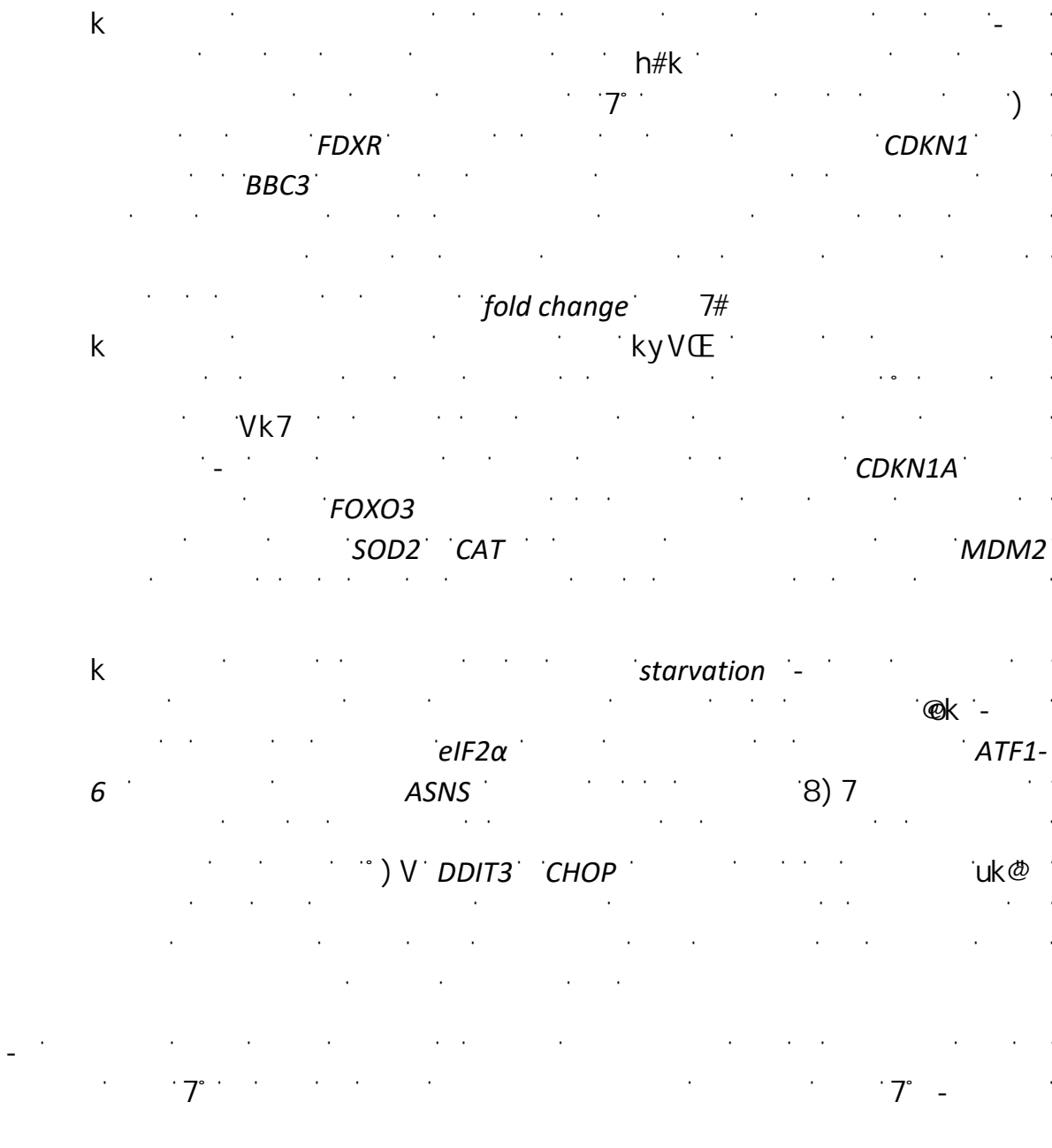
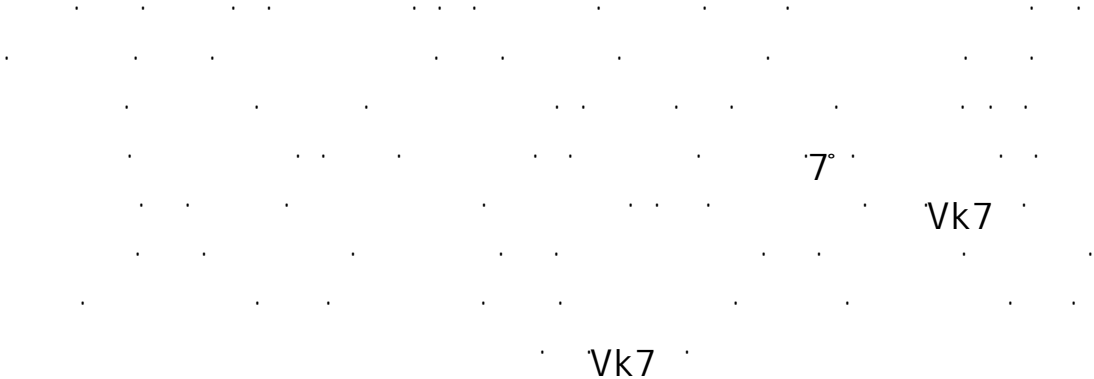


Figura 44 – Análisis de transcriptómica por RNAseq en células A549. Se muestran un paneo general de los valores de log2FC (donde FC es el *fold change* o relación de cambio) para las cuatro condiciones evaluadas (A); y un diagrama de volcán evaluando la relación de cambio (log2FC) y significancia estadística (-log10 p-adj) de los cambios observados al comparar las condiciones sin tratar (UT) y tratada con FA+Era (B). Luego, se muestran los conjuntos de genes identificados en un análisis de enriquecimiento diferencial (GSEA) al comparar nuevamente las condiciones UT y FA+Era, indicando en cada caso la significancia estadística como p-adj y las dimensiones del conjunto de genes (conteo) como el tamaño de los círculos correspondientes (C). Se muestra un diagrama de cuerdas resultante de una análisis ontológico (D), en él se enfrentan los genes (izquierda) y conjuntos de genes (derecha) más diferencialmente expresados entre las condicones comparadas, indicándose la correspondencia funcional de los primeros en los segundos. Finalmente, se muestra un diagrama de volcán en el que se destacan (con colores más intensos) algunos de los genes asociados a la respuesta ISR (D).





“Múltiples bloqueos del metabolismo del glutatión podrían ser más eficientes como potencial estrategia terapéutica”

- o 

El bloqueo simultáneo de la importación de cistina y la síntesis de glutatión produce un fuerte fenotipo de sensibilidad

h

o U O" o\ U - U **Figura 45a**
U **Figura 45b**

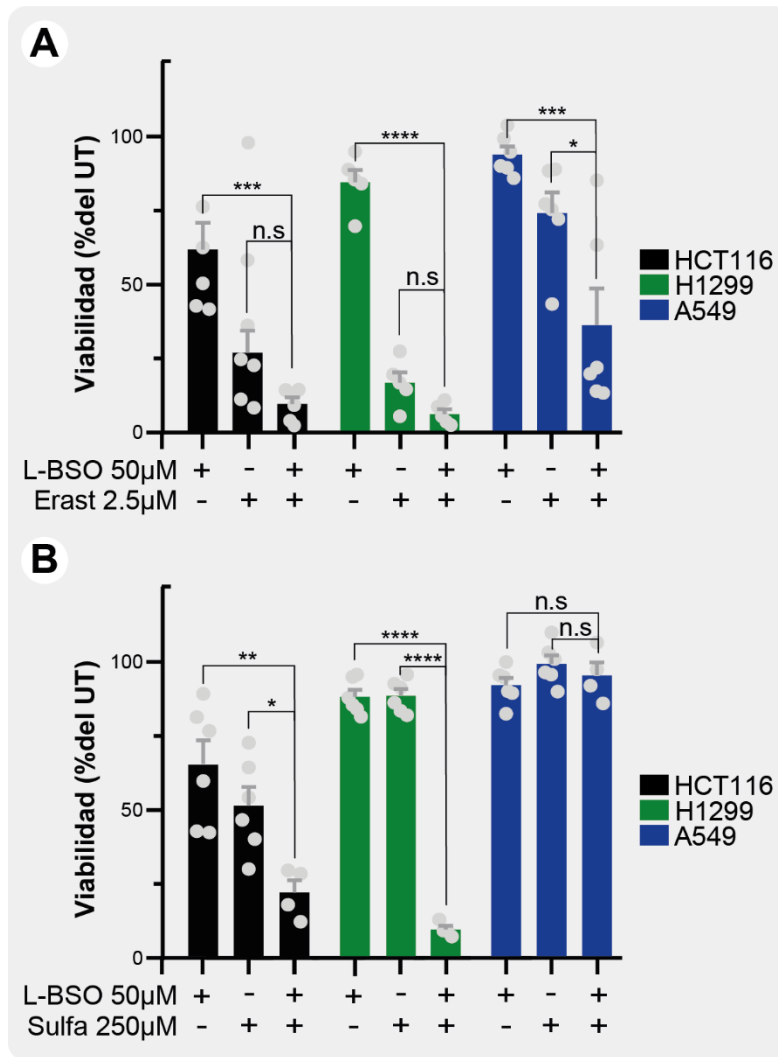


Figura 45 – Viabilidad ante múltiples bloqueos del metabolismo del glutatión. Se muestran los resultados de exponer células HCT116, H1299 y A549 a la combinación de los inhibidores L-BSO/Erastina (A) y L-BSO/Sulfazalazina (B). Los asteriscos derivan de una comparación estadística por 1way-ANOVA (método Dunnett).

o' O" o\ -

=#u =
- h =#u O" o\ o
= O" o\ o

off targets

O
7
- U O" o\ U
o
=#u =

Figura 46a-c

O" o\ -
7
h 7

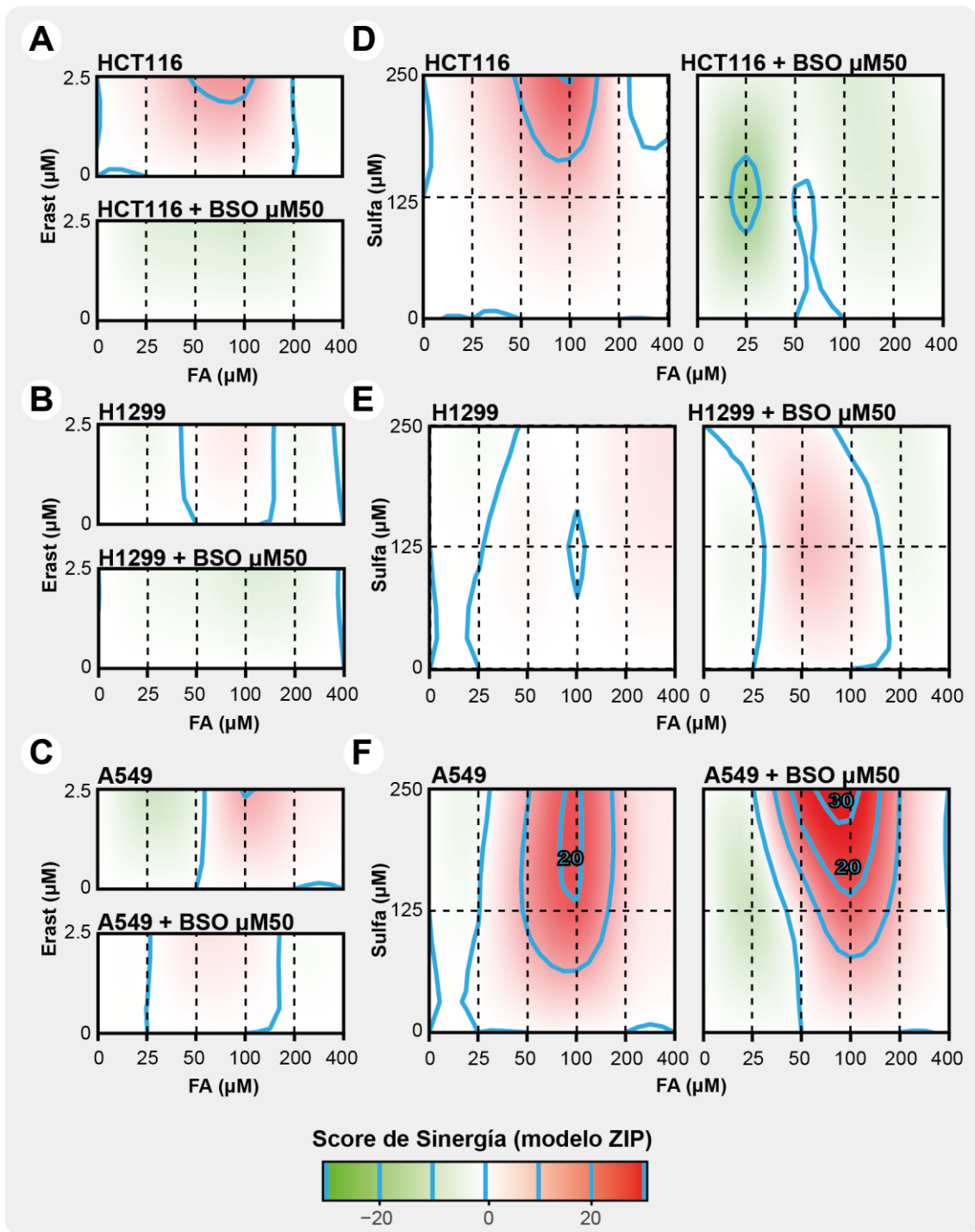


Figura 46 – Sensibilidad a FA ante múltiples bloqueos del metabolismo del glutatión. Se muestran los resultados de la búsqueda de efectos sinérgicos (<https://synergyfinder.org>) al evaluar la sensibilidad a concentraciones crecientes de FA en presencia de los inhibidores Erastina o Sulfazalazina, ambos en ausencia y presencia del inhibidor L-BSO. Se muestran resultados para las líneas celulares HCT116 (A), H1299 (B) y A549 (C). Los datos derivan de un análisis por el modelo de referencia ZIP (del inglés, *Zero Interaction Potency*).

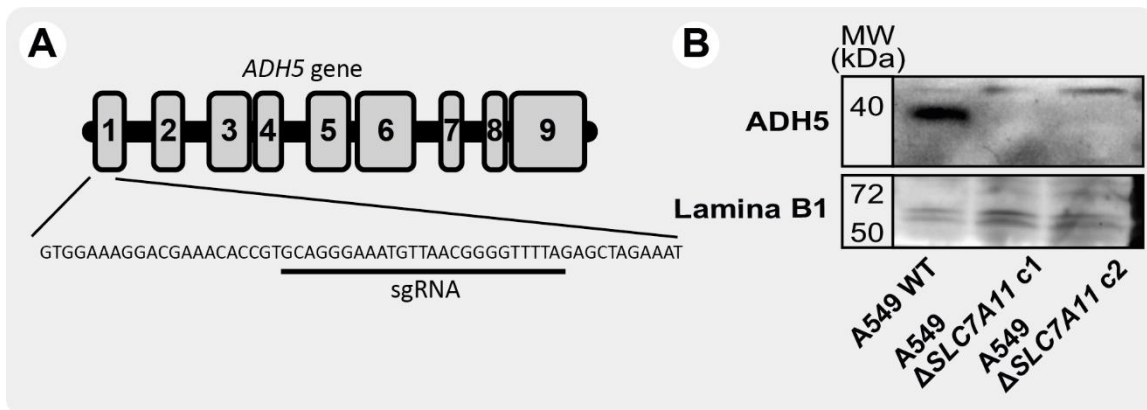


Figura 47 – Obtención de células A549 deficientes en ADH5. Se muestra la estructura del gen *ADH5*, el exón afectado, la secuencia diana y del sgRNA utilizado (A). Por otro lado, se muestra el chequeo por *western blot* realizado para corroborar su ausencia en los clones obtenidos (B).

ver Figura 41

Figura 47

ver Figura 48a/b/e

ver Figura 48c/d/f

ver Figura 18e y Figura 20d

ADH5 ver

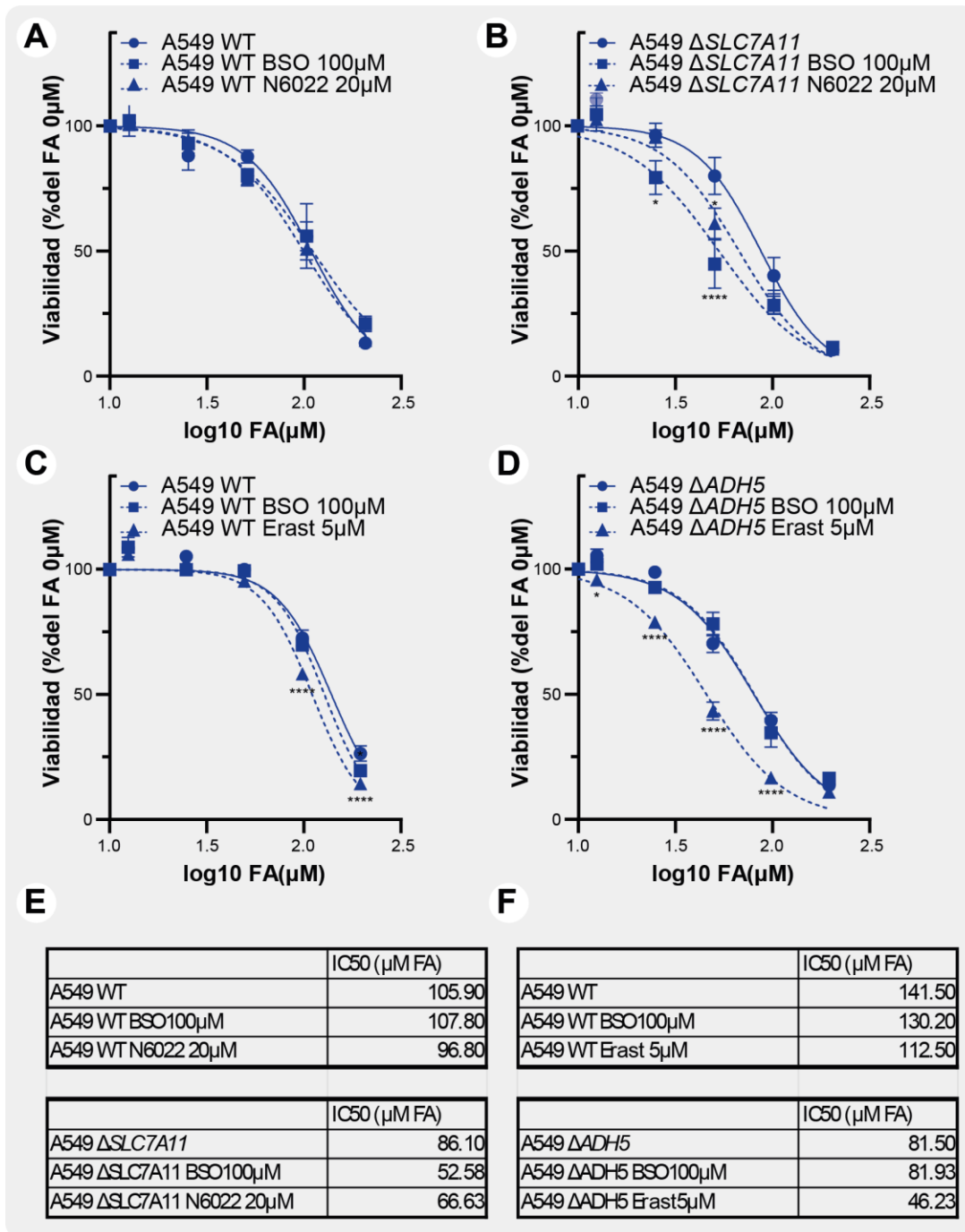


Figura 48 - Sensibilidad a FA ante múltiples bloqueos del metabolismo del glutatión. Se muestran los resultados obtenidos en ensayos de viabilidad con células A549 WT (A y C), A549 Δ SLC7A11 (B) y A549 Δ ADH5 (D) ante concentraciones crecientes de FA en combinación con L-Erastina, BSO o N6022; y los IC₅₀s calculados a partir de dichos resultados. Los asteriscos derivan de una comparación por 2way-ANOVA (método Tukey).

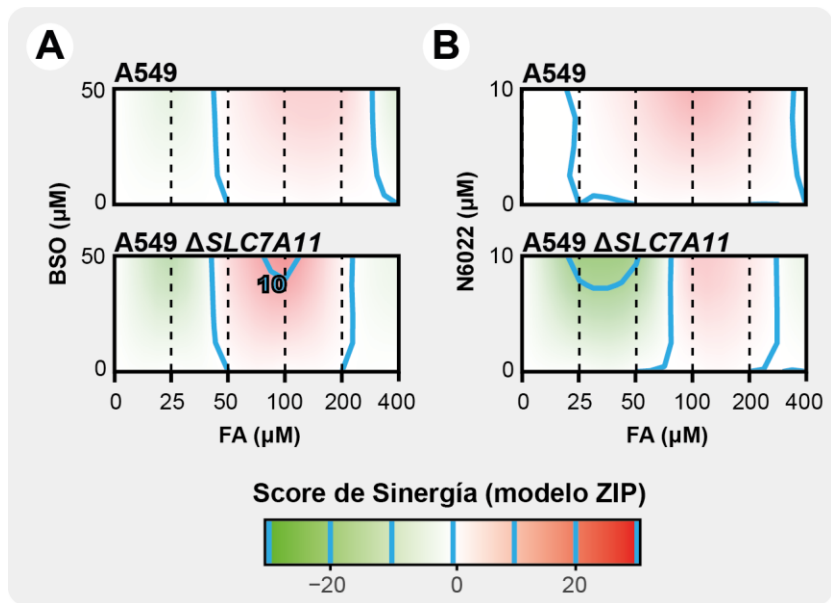


Figura 49 - Sensibilidad a FA ante múltiples bloqueos del metabolismo del glutatión. Se muestran los resultados de la búsqueda de efectos sinérgicos (<https://synergyfinder.org>) al evaluar la sensibilidad a concentraciones crecientes de FA en presencia de los inhibidores L-BSO (A) o N6022 (B), ambos en células A549 WT y A549 Δ SLC7A11. Los datos derivan de un análisis por el modelo de referencia ZIP (del inglés, *Zero Interaction Potency*).

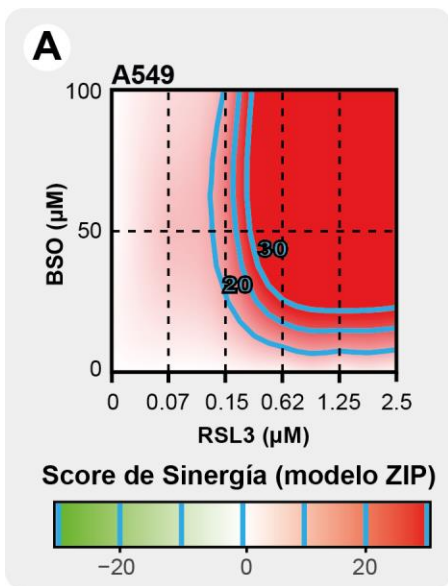


Figura 50 - Sensibilidad a FA ante múltiples bloqueos del metabolismo del glutatión. Se muestran los resultados de la búsqueda de efectos sinérgicos (<https://synergyfinder.org>) al evaluar la sensibilidad a concentraciones crecientes de RSL3 y L-BSO combinadas. Los datos derivan de un análisis por el modelo de referencia ZIP (del inglés, *Zero Interaction Potency*).

o#

V

Figura 49 h

O" o\ koO

ver Figura 36

ver Figura 50

Vk7

ver Figura 45a

Figura 50

Figura 46f

Figura 48c

Vk7

in vivo

El bloqueo simultáneo de la importación de cistina y la síntesis de glutatión reduce la formación de tumores en un modelo CAM

#

#) (E cell-line derived xenograft

) 8 k @ @ O K # -

U # ° # ° U Chick Chorioallantoic Membrane y

U 7

u

Figura 51b

Figura 51c

O" o\ -

#

Figura 51a

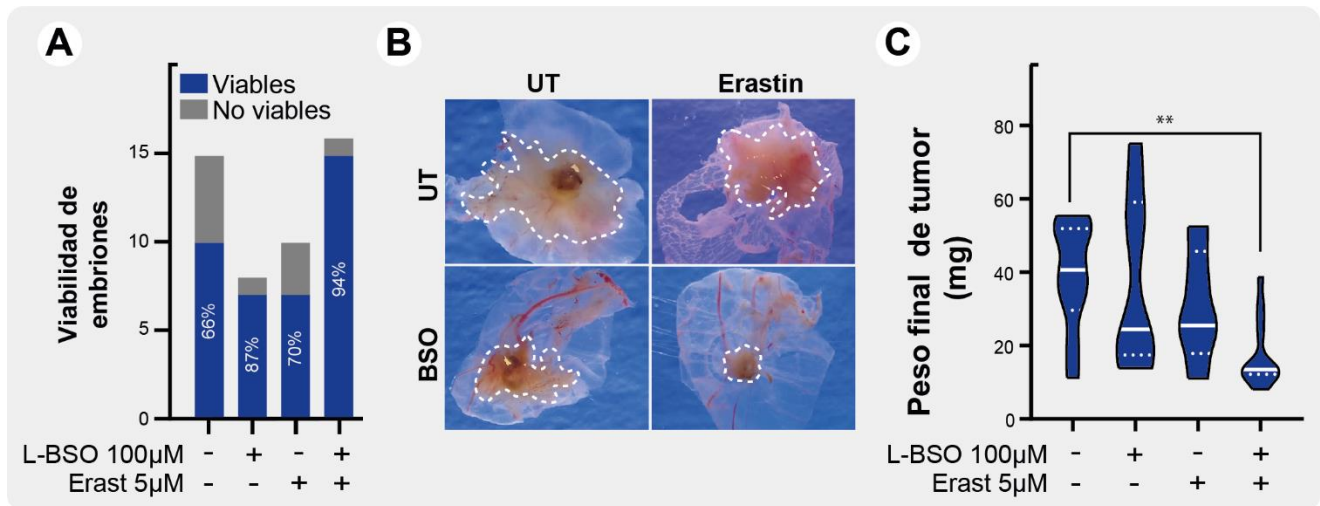


Figura 51 – Ensayos de formación de tumores sobre membrana corioalantoidea de pollo (CAM). Se muestra la viabilidad de los embriones ante los distintos tratamientos (A), fotos representativas de los tumores formados todavía insertados en la porción de membrana más inmediata (B) y los resultados de comparar los pesos tumorales finales (C). La comparación estadística se realizó por medio de un test no paramétrico Kruskal-Wallis (comparación múltiple por método de Dunn).

El glutatión cumple un rol múltiple en la prevención de la toxicidad causada por el formaldehído endógeno.

- 7°

7°

#

@

7°

) V

) V) h#

#0)

7°

) V

7°

80=

) = 0

7° 80= 0

=dU 80=

in vitro

=dU 80=

7°

=dU 80=

y hG# = kU o -

) =

7°

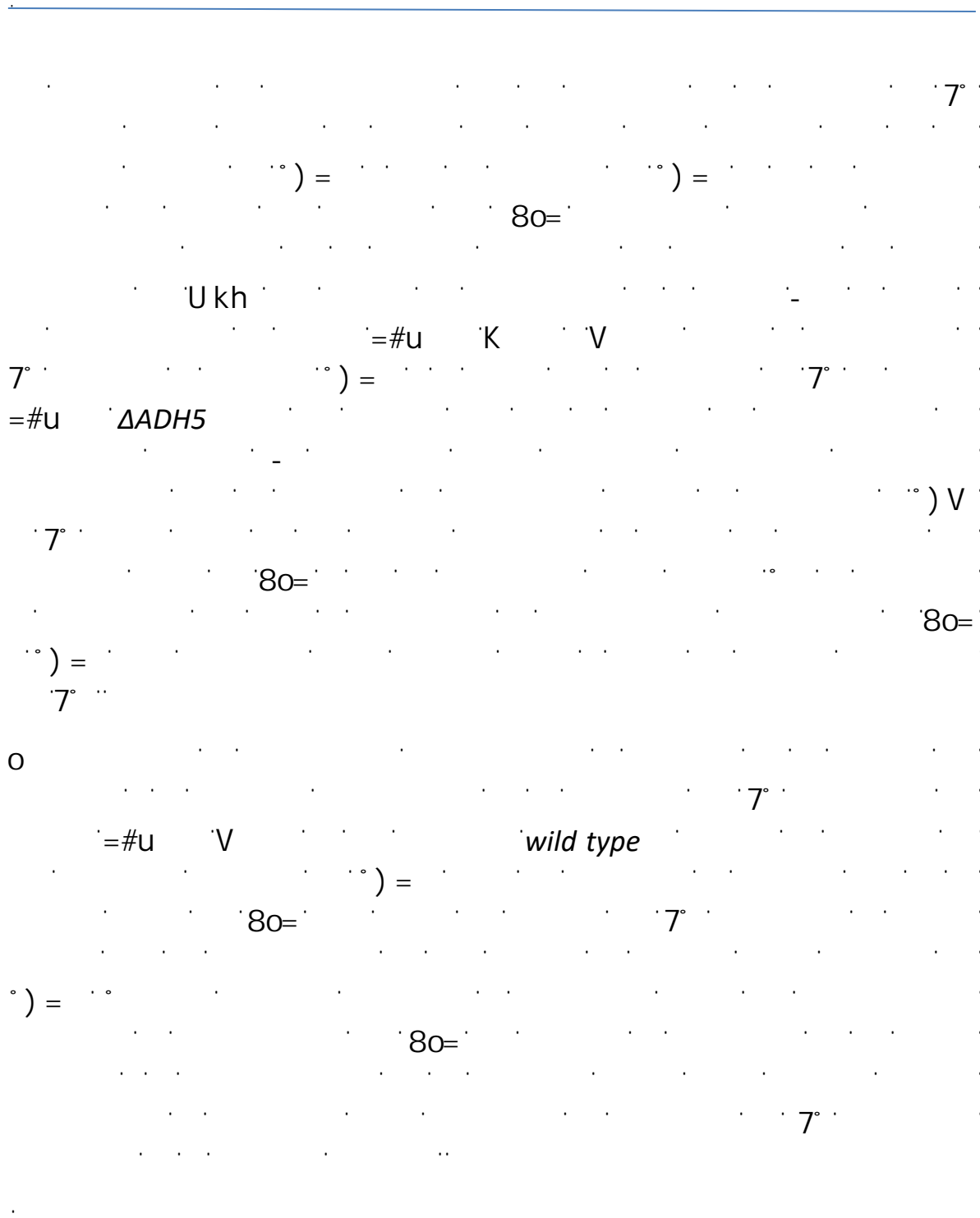
7°

=dU 80= U

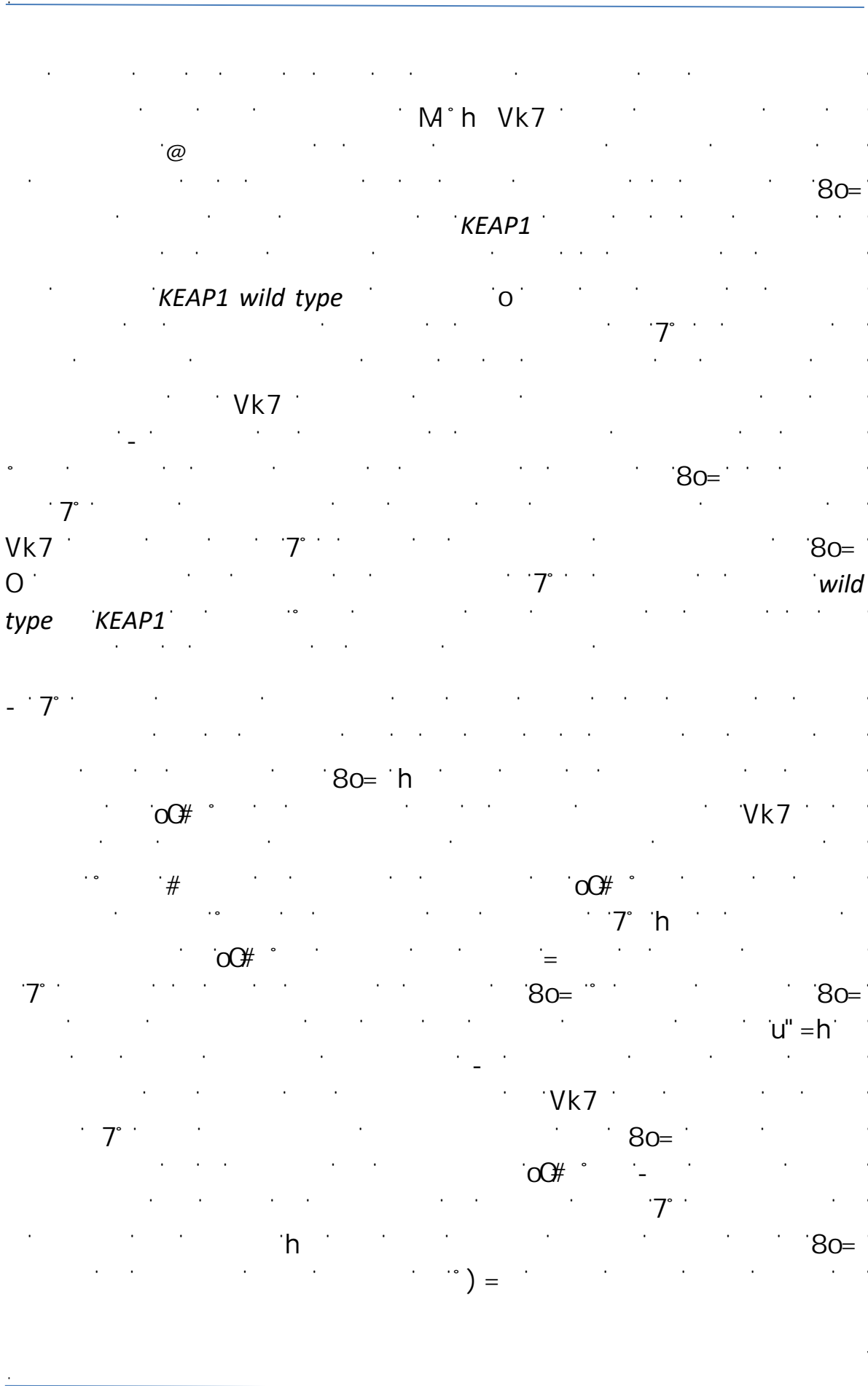
80= 8008

) =

7°



Tumores con hiperactividad del eje regulador KEAP1-NRF2 reconfiguran el metabolismo del formaldehído endógeno para preservar sus defensas antioxidantes.



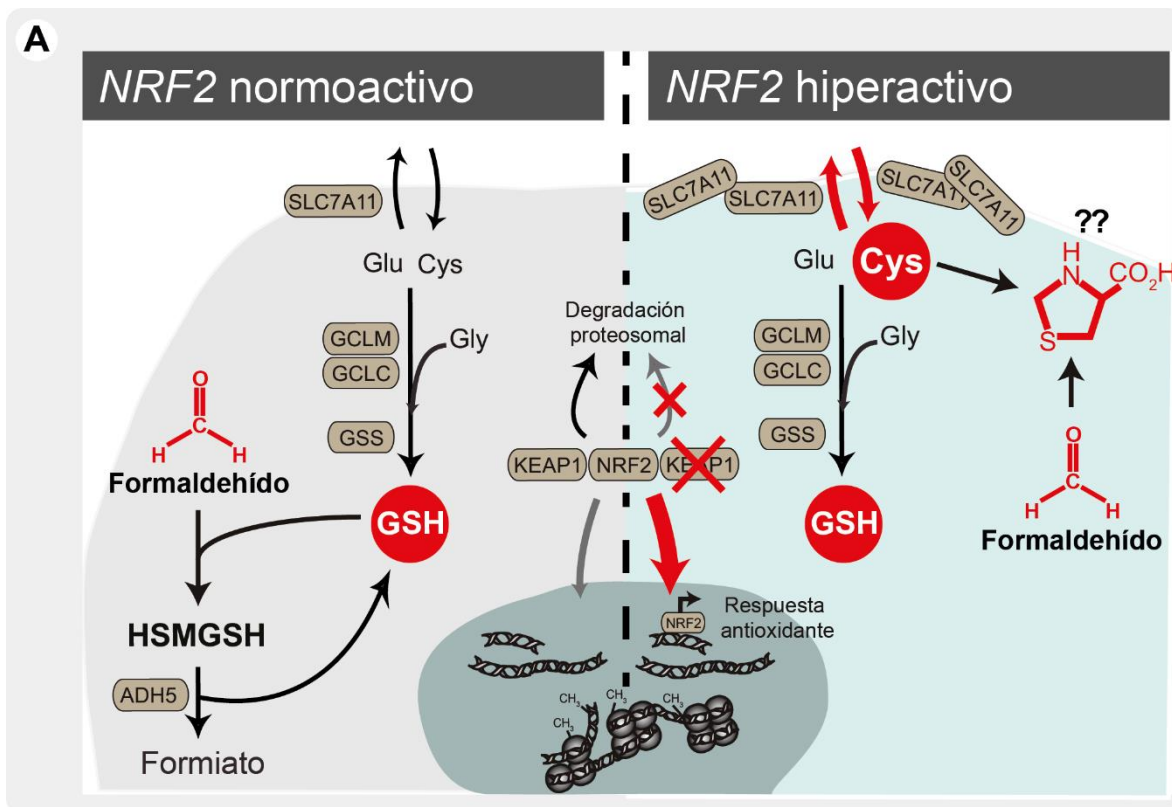


Figura 52 – Células con hiperactividad del eje regulador *KEAP-NRF2* lograrían preservar las reservas y funciones del GSH para lidiar con otros agentes estresores.

k

h#k kv°

7° 7° -

kyVCE

ok u

80=

oG# FDXR¹⁶³

7° †) = °

y

7°

0 @ @k

La utilización de múltiples inhibidores como principio de futuras estrategias terapéuticas.

0 80= 7°

Vk7

0" o\ xenograft

h

8hE 0" o\ kO 80=

o

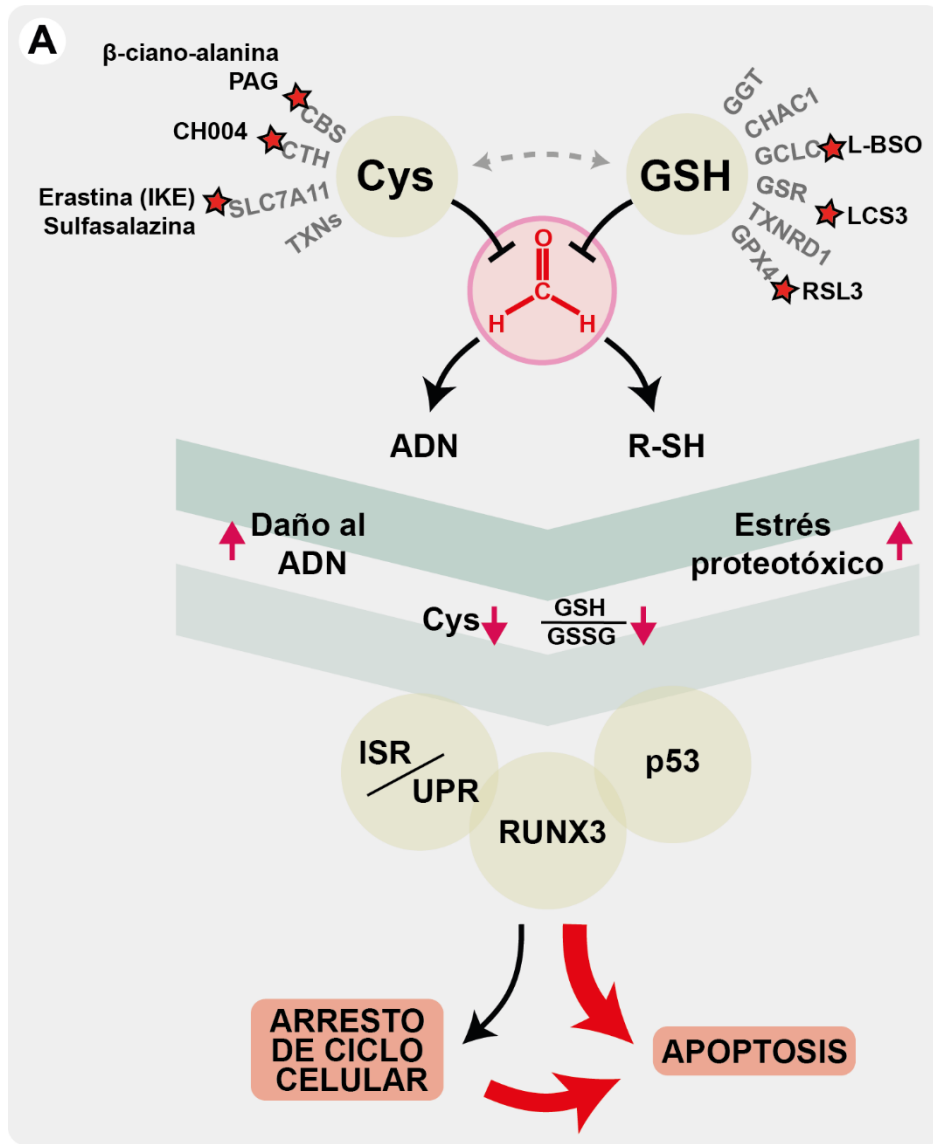


Figura 53 – Existe una gran variedad de inhibidores asociados al metabolismo del GSH y la cisteína cuyos efectos individuales o combinados podrán ser evaluados con la intención de incrementar la muerte celular.

80k

7oh @U

80=

0

80=

= °



Lic. Agustín Ezequiel Morellato
Doctorando



Dr. Lucas Blas Pontel
Director

REFERENCIAS

k = h O" 7
Curr Opin Toxicol

M U U u" u'8 U
)V° *Frontiers in Environmental Science* h

@ k # ‡ A Review of Human Carcinogens: Chemical
Agents and Related Occupations

u ‡ u et al. U
Nat Commun

o O- ") - " h h U) @
7 *Phys Rev Lett*

o‡ K *Disinfection by the Vapour of Formaldehyde* *Medical Progress and
Hospital Clinics* hU #

7 u = 7

k h K ‡ O) = h = 7 - #
New England Journal of Medicine

\ " h K o " 8 o V " o U U u
U h - = = *Crit Rev Toxicol*

O M U ") - U U) K o K" U
V = 8)V° *Chem Res Toxicol*

o k K # KK " U U " # ‡ k 7 O U
Am J Clin Nutr

" " 8 et al. U
Nature

U " - y # h O" u
Redox Biology h

' h = O # u -) U *Formation of Formaldehyde from Adrenaline In Vivo; a
Potential Risk Factor for Stress-Related Angiopathy* *Neurochemical Research*

' h = O # u -) U *Formation of Formaldehyde from Adrenaline In Vivo; a
Potential Risk Factor for Stress-Related Angiopathy* *Neurochemical Research*

V et al. U

Circulation

) 7 et al. u
7

o - h O
U = *Mol Cell*

o) 8 O # 8 U - E
NeuroToxicology h

" o) " @O\ u o
Crit Rev Biochem Mol Biol

8oV\k

= KK et al. -) u # #
= \ U *Am J Pathol*

M U # o 7 † #
) V° *Nature*

8 h et al. u 7 " #
Clin Breast Cancer

h U 8 8 U k) V° h # k)
) V° k hkuV h *Front Mol Biosci*

O O7 et al. o
*Annals of Anatomy -
Anatomischer Anzeiger*

U et al. †
Am J Physiol Heart Circ Physiol

8 o E7 O o - † @
Asian Pacific Journal of Cancer Prevention

8 7 et al. 7 u
Toxics

@k#† @k#† 8 - # k =
7 *Gr. Eval. Carinog. Risks*
Hum. h

U - y # h O" u
Redox Biol

k @† O 7 # 8 h u U h MK7
7) V° *Nat Struct Mol
Biol*

h O" et al. - 7 @ = o # 8
U # Mol Cell

u o O† et al. # - u @ "k#°
= 8 @ Cell

Ⓔ K et al. - O -u - 7 =
° h o - 7 ‡ =\ o 8- # o J Am Heart Assoc

- " et al. u
J Cell Mol Med

) °) MM U " h ‡ OU
Metabolism

U M# h o V h o V k = o
° 8-
Biochem Biophys Res Commun

y U = 8 U o h o U ∞ \ † h #
) ° h u u o °) Int J Mol Sci

\ " et al.) ° Q = °) =
° U) Sci Adv

U U et al. # °) = ° Q =
Eur J Med Genet

V 8 j 8 U ° # o 7 # = 8 Arabidopsis
Book

U " et al. U
Nat Chem Biol

k ° # U) o 7 ‡ ° Kk
Nat Commun

o U = y @) K- o # k = O O #
Amino Acids

o # o et al. u #u
Nat Commun

" U et al. @ #u 7
Pflügers Archiv European Journal
of Physiology

\ U M V k O @ = 8
Semin Liver Dis

= K@ U o M 8 8 h
O 7 h M h
u u o 8 h @ Methods in
Enzymology h) O h

j # k et al. 8
Nat Commun

k o V et al. u)
Journal of Biological Chemistry

O8 et al. " 8#U
J Toxicol

' et al. -
Free Radic Biol Med

' et al. = 8
Hepatology

7 ' et al.) Archives de Pédiatrie

U - U u 8 = " #oT #
J Inherit Metab Dis

" O † et al. 8
J Inherit Metab Dis

V k 8 Cellular and Molecular Life Sciences

O U † et al. 8
Proceedings of the National Academy of Sciences

O O= k Toxicol Appl
Pharmacol

M k U " " u u M V 8o= u @
U " - # J Neurochem

" 7 k U U 8 Biochimica et Biophysica Acta
(BBA) - General Subjects

U 7 U et al.)

" 7 M 7 7) S-
)
BioFactors

o " V K 8 @k k 7 V
) " h - o h Journal of Biological
Chemistry

V k h h 7 h k U KU
Proceedings of the National Academy
of Sciences

o K # - " V KU
c-reticul -g EMBO Rep

h K et al. - k u 8 o @k
Mol Cell

7 U et al. 8
Proceedings of the National Academy of Sciences

o U U - o t M U 8
) V u
#) #) Proceedings of the National Academy of Sciences

) t h t u U K h 7 t 7 # =
Biochemical Journal

M U et al. 8 Biochem
Biophys Res Commun

- o o V o O) u 8 # k
7 k k J Nutr

O o # k Mol Aspects Med

' E O # #
Sci Rep

U @V h K M \ 8 h o O K # = # U 8 # @
V h # y h k)
° u 7 ° u 7 # = \ h # The Journal of Immunology

K'et al. V

Free Radic Biol Med

U KU'et al. \

Hepatology

= = KM'M u# u M7 k

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects

o et al. u

k VF-- -r r-2. *J Cell Physiol*

" V'et al. @

Vk7

@ o

CE *Nucleic Acids Res*

° K'et al. V

u

7 k

@

=

\ 8 *Journal of Biological Chemistry*

U 'et al. V k 8 8

h

U k *Cancer Cell*

@ Met al. M

V

Genes Dev

‡ V'et al. M

V *Nat Genet*

u M@et al. M k V " -u8-) @U

u o U k U *Mol Cell Biol*

V u o h K = = # ' # o h # " @ h

o U u - V u

° k - *Journal of Biological Chemistry*

‡ V'et al. h

7

M

Proceedings of the National Academy of Sciences

U = \ # u M 7 - K) " U @

U #V#

Gene

u # # @@# u) ° u k V *Antioxidants and Redox Signaling*
h

M Kim et al. *Cell Rep*

O Kim et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences*

K O et al. *Nature*

et al. *Mol Cell*

8 et al. *Journal of Experimental Medicine*

M U et al. *Nat Cell Biol*

= et al. *Trends Cell Biol*

7 et al. *Oncogene*

O et al. *Am J Pathol*

† M et al. *Toxicol Sci*

† J et al. *Oncotarget*

U et al. *Clinical and Translational Oncology*

o et al. *Journal of Clinical Investigation*

† O et al. *Cancer Med*

- K et al. *Journal of Biological Chemistry*

k k = k V *Pediatr Blood Cancer*

" = = et al. h @ O
Journal of Clinical Oncology

8 Et al. f-a
RADIOLOGY

k h et al. - @k#uV
o
BMC Cancer

U k # et al. V # h k o o †
h h) h k h k u
*International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics*

u U et al. o
Cancer Metab

U K et al. h V †
=-k
@@@ *Breast Cancer Res Treat*

- et al. @ E *Free Radic Biol Med*

) - # 7 # U k u 8 U h
u *Nutrients*

k K O K = M - = o) u 8 u V
o = V # *Antioxid Redox Signal*

' Et al. @ u u k @ o O
O # # 8 = *Cancer Res*

= @o u - O # U u † 8 u
h o) # @ h

U U - U U k " U h O" y=hO# =kUo"
o= 8 8o= 8o8 = #

) KU et al. # #k@hk
Genome Biol

-
147. Green, L. S. *et al.* Mechanism of Inhibition for N6022, a First-in-Class Drug Targeting S-Nitrosoglutathione Reductase. *Biochemistry* 51, 2157–2168 (2012).
 148. Umansky, C. *et al.* Endogenous formaldehyde scavenges cellular glutathione resulting in redox disruption and cytotoxicity. *Nat Commun* 13, (2022).
 149. Nomura, Y., Adachi, N. & Koyama, H. Human Mus81 and FANCB independently contribute to repair of DNA damage during replication. *Genes to Cells* 12, 1111–1122 (2007).
 150. Staab, C. A. *et al.* Reduction of S-nitrosoglutathione by alcohol dehydrogenase 3 is facilitated by substrate alcohols via direct cofactor recycling and leads to GSH-controlled formation of glutathione transferase inhibitors. *Biochemical Journal* 413, 493–504 (2008).
 151. Tulpule, K., Hohnholt, M. C. & Dringen, R. Formaldehyde metabolism and formaldehyde-induced stimulation of lactate production and glutathione export in cultured neurons. *J Neurochem* 125, 260–272 (2013).
 152. Best, S. A. & Sutherland, K. D. “Keaping” a lid on lung cancer: the Keap1-Nrf2 pathway. *Cell Cycle* vol. 17 1696–1707 Preprint at <https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1496756> (2018).
 153. Dinkova-Kostova, A. T. & Abramov, A. Y. The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function. *Free Radic Biol Med* 88, 179–188 (2015).
 154. Yan, Y. *et al.* SLC7A11 expression level dictates differential responses to oxidative stress in cancer cells. *Nat Commun* 14, 3673 (2023).
 155. Zheng, P., Zhou, C., Ding, Y. & Duan, S. Disulfidptosis: a new target for metabolic cancer therapy. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* vol. 42 Preprint at <https://doi.org/10.1186/s13046-023-02675-4> (2023).
 156. Alía, M., Ramos, S., Mateos, R., Bravo, L. & Goya, L. Response of the antioxidant defense system to tert-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in a human hepatoma cell line (HepG2). *J Biochem Mol Toxicol* 19, 119–128 (2005).
 157. Doll, S. *et al.* FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor. *Nature* 575, 693–698 (2019).
 158. Chen, H. H. W. & Kuo, M. T. Role of Glutathione in the Regulation of Cisplatin Resistance in Cancer Chemotherapy. *Met Based Drugs* 2010, 1–7 (2010).
 159. Corinti, D. *et al.* Elusive intermediates in cisplatin reaction with target amino acids: Platinum(II)-cysteine complexes assayed by IR ion spectroscopy and DFT calculations. *J Inorg Biochem* 237, 112017 (2022).
 160. Xia, C. *et al.* Cysteine and homocysteine can be exploited by GPX4 in ferroptosis inhibition independent of GSH synthesis. *Redox Biol* 69, 102999 (2024).
 161. Pietzke, M. *et al.* Amino acid dependent formaldehyde metabolism in mammals. *Commun Chem* 3, (2020).

-
162. Zhou, Q. *et al.* Ferroptosis in cancer: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Signal Transduct Target Ther* 9, 55 (2024).
 163. Xu, R., Wang, W. & Zhang, W. Ferroptosis and the bidirectional regulatory factor p53. *Cell Death Discov* 9, 197 (2023).
 164. Umansky, C. *et al.* Endogenous formaldehyde scavenges cellular glutathione resulting in cytotoxic redox disruption. *bioRxiv* Preprint at <https://doi.org/10.1101/2020.05.14.090738> (2020).
 165. Jiang, Q. *et al.* Involvement of p38 in signal switching from autophagy to apoptosis via the PERK/eIF2 α /ATF4 axis in selenite-treated NB4 cells. *Cell Death Dis* 5, e1270–e1270 (2014).
 166. Bulavin, D. V. Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *EMBO J* 18, 6845–6854 (1999).
 167. Johnson, F. D. *et al.* Characterization of a small molecule inhibitor of disulfide reductases that induces oxidative stress and lethality in lung cancer cells. *Cell Rep* 38, 110343 (2022).
 168. Pontel, L. B. *et al.* Acute lymphoblastic leukemia necessitates GSH-dependent ferroptosis defenses to overcome FSP1-epigenetic silencing. *Redox Biol* 55, 102408 (2022).
 169. Mandal, P. K. *et al.* System xc- and thioredoxin reductase 1 cooperatively rescue glutathione deficiency. *Journal of Biological Chemistry* 285, 22244–22253 (2010).
 170. Zhang, H.-F., Klein Geltink, R. I., Parker, S. J. & Sorensen, P. H. Transsulfuration, minor player or crucial for cysteine homeostasis in cancer. *Trends Cell Biol* 32, 800–814 (2022).
 171. Chen, M.-S. *et al.* CHAC1 degradation of glutathione enhances cystine-starvation-induced necroptosis and ferroptosis in human triple negative breast cancer cells via the GCN2-eIF2 α -ATF4 pathway. *Oncotarget* 8, 114588–114602 (2017).
 172. LeBoeuf, S. E. *et al.* Activation of Oxidative Stress Response in Cancer Generates a Druggable Dependency on Exogenous Non-essential Amino Acids. *Cell Metab* 31, 339-350.e4 (2020).
 173. Martí-Andrés, P. *et al.* TRP14 is the rate-limiting enzyme for intracellular cystine reduction and regulates proteome cysteinylolation. *EMBO J* 43, 2789–2812 (2024).
 174. Montinaro, A. *et al.* Potent pro-apoptotic combination therapy is highly effective in a broad range of cancers. *Cell Death Differ* 29, 492–503 (2022).
 175. El-Fakharany, Z. S., Nissan, Y. M., Sedky, N. K., Arafa, R. K. & Abou-Seri, S. M. New proapoptotic chemotherapeutic agents based on the quinolone-3-carboxamide scaffold acting by VEGFR-2 inhibition. *Sci Rep* 13, 11346 (2023).
 176. Liu, M., Li, W., Xu, R., Jiang, X. & Liu, A. Hollow Gold Nanoparticles Loaded with L-Buthionine-Sulfoximine as a Novel Nanomedicine for In Vitro Cancer Cell Therapy. *J Nanomater* 2021, 1–9 (2021).