



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

“Efecto del transmisor gaseoso sulfuro de hidrógeno (H₂S) en el tratamiento fotodinámico del cáncer”

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área de Química Biológica

Gustavo Hernán Calvo

Director de tesis: Dr. Daniel A. Sáenz

Directora Adjunta: Dra. Gabriela Di Venosa

Consejera de Estudios: Dra. Elba Vázquez

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP), Hospital
de Clínicas “José de San Martín”. Universidad de Buenos Aires -
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Buenos Aires, 2022

Efecto del transmisor gaseoso sulfuro de hidrógeno (H₂S) en el tratamiento fotodinámico del cáncer

Resumen

La Terapia Fotodinámica (TFD) es un tratamiento utilizado en cáncer, infecciones bacterianas, enfermedades no malignas y otros usos no clínicos, que se basa en la activación de un fotosensibilizante (FS) con luz, y la consecuente generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) que desencadenan daños fotoquímicos.

El ácido 5-aminolevulínico (ALA) es un pro-FS, que al administrarse exógenamente aumenta la síntesis de porfirinas a través del camino biosintético del hemo. Las porfirinas son FSs y a esta terapia se la conoce como Terapia Fotodinámica basada en ALA (ALA-TFD).

El sulfuro de hidrógeno (H₂S) es un transmisor gaseoso, sintetizado endógenamente en los seres vivos, que en los mamíferos presenta diferencias tejido y contexto específicos. Se ha descubierto que interviene en una variedad de procesos fisiológicos como la regulación del estado redox celular, la función cardíaca, la presión arterial, la división celular, procesos cerebrales, etc. En especial, ha sido muy estudiado su efecto en la respuesta antioxidante.

El objetivo de esta tesis es estudiar el efecto del H₂S en el contexto de la TFD, utilizando como modelo principal dos líneas celulares de adenocarcinoma mamario murino, LM2 y LM3, y utilizando el dador inorgánico sulfuro ácido de sodio (NaHS), como fuente exógena de H₂S.

Se ha encontrado que el NaHS posee un efecto protector frente a la ALA-TFD en las células LM2. El NaHS tiene efecto sobre varios parámetros asociados a este resultado: aumento de niveles intracelulares de glutatión reducido (GSH), disminución de la

síntesis de porfirinas a partir de ALA por inhibición de enzimas del camino biosintético del hemo, disminución de las EROs generadas post TFD y disminución en la oxidación de proteínas post TFD.

El NaHS también mostró efecto protector frente a la TFD al utilizar otro FS (Clorina e6), y al ser evaluado en otras tres líneas celulares (SKOV3, IGROV1 y Raw 264.7) frente a la ALA-TFD.

La línea celular LM3, en cambio, no presenta el mismo comportamiento. Si bien el NaHS aumenta los niveles intracelulares de GSH, el mismo no protege a las células frente al daño fotodinámico producido por la ALA-TFD, observándose que éste no es capaz de reducir la síntesis de porfirinas, ni la acumulación de EROs post TFD.

Al analizar mediante RT-HPLC los intermediarios de porfirinas sintetizados, la línea LM2 produce exclusivamente protoporfirina IX (Pp IX) a partir de ALA, y en presencia de NaHS, no produce cantidades detectables de porfirinas. En cambio, la línea LM3 produce mayormente Pp IX, uroporfirina, y coproporfirina, y en presencia de NaHS, cambia el patrón de los intermediarios producidos.

A través del análisis bioinformático de bases de datos, no se pudo encontrar una correlación entre el número de copias o la actividad transcripcional de los genes de las enzimas que producen H₂S y el cáncer, debido principalmente a la alta dispersión de los datos evaluados.

Como conclusión, el NaHS tiene un efecto en la respuesta celular a la ALA-TFD en la mayoría de las líneas estudiadas, mediado por múltiples factores. Si bien estos resultados fueron observados en la mayoría de las líneas celulares estudiadas y con diferentes FS, una de las líneas celulares no presentó el mismo comportamiento. En la línea LM3 no se observó el efecto protector del NaHS, y esto podría deberse a que los niveles de porfirinas totales no se reducen, aunque el NaHS modifica los intermediarios sintetizados.

Por primera vez, se reporta un estudio completo sobre el efecto del NaHS en la ALA-TFD, así como en la síntesis de porfirinas, y en la reacción directa con el oxígeno singlete, que es el principal agente oxidante generado durante la TFD.

Estos resultados son de particular importancia en el tratamiento con ALA-TFD de tejidos que sinteticen altos niveles de H₂S, o que debido a una patología aumenten su síntesis, como se ha observado en tumores de ovario y de colon. Además, podría ser objeto de estudio de otras terapias contra el cáncer que actúen a través de EROs.

Palabras clave: Terapia Fotodinámica, sulfuro de hidrógeno, ácido 5-aminolevulínico, NaHS, líneas celulares, cáncer.

Effect of the gasotransmitter hydrogen sulfide (H₂S) in the photodynamic treatment of cancer

Abstract

Photodynamic therapy (PDT) is a treatment used in cancer, bacterial infections, non-malignant diseases, and other non-clinical uses, which is based on the activation of a photosensitizer (PS) with light, and the subsequent generation of reactive oxygen species (ROS). 5-aminolevulinic acid (ALA) is a pro-PS, which once administered leads to the synthesis of porphyrins through the heme biosynthetic pathway. Porphyrins are photosensitizers and this therapy is known as ALA-based Photodynamic Therapy (ALA-PDT).

Hydrogen sulfide (H₂S) is a gasotransmitter, synthesized endogenously in almost all living forms, which in mammals presents specific tissue and context differences in its production. It has been known to participate in a variety of physiological processes such as redox state cell regulation, heart function, blood pressure, cell division, brain processes, etc. In particular, its effect on the antioxidant response has been extensively studied.

The objective of this thesis is to study the effect of H₂S in the context of PDT, using the murine mammary adenocarcinoma cell lines LM2 and LM3, and the inorganic donor sodium acid sulfide (NaHS) as an exogenous source of H₂S.

It was found that NaHS has a protective effect against ALA-PDT in LM2 cells. NaHS affects several parameters associated with this finding: increases intracellular levels of GSH, decreases porphyrin synthesis from ALA by the inhibition of enzymes of the heme biosynthetic pathway, decreases ROS generated post-PDT and decreases protein oxidation post-PDT. NaHS also protects cells against PDT based on other PS, such as Chlorin e6, and the protective effect against ALA-PDT is also observed in three other cell lines (SKOV3, IGROV1, and Raw 264.7).

The LM3 line does not show the same behaviour. Although NaHS increases intracellular GSH levels, it does not protect cells against ALA-PDT, and it is not capable of reducing porphyrin synthesis or the accumulation of ROS after PDT.

When the synthesized porphyrin intermediates were analyzed by RT-HPLC, the LM2 line exclusively produces protoporphyrin IX (Pp IX) from ALA, and in the presence of NaHS, it does not produce detectable amounts of porphyrins. In contrast, the LM3 cell line produces mostly Pp IX, uroporphyrin, and coproporphyrin, but in the presence of NaHS, this pattern of porphyrins is changed.

Bioinformatics analysis from data bases showed no possible correlation between the number of copies and transcriptional activity of the genes that codify for the enzymes involved in H₂S synthesis and cancer, and this was mainly due to the high dispersion of the data available.

In conclusion, NaHS affects the effectiveness of ALA-PDT in most of the lines studied, given by several factors. Although these results were observed in most of the cell lines studied and with different PS. However, in the LM3 line, the protective effect of NaHS was not observed, and this may be ascribed to the lack of reduction of porphyrin levels, although NaHS indeed modifies the pattern of porphyrins.

For the first time, a complete study is reported on the effect of NaHS on ALA-PDT, as well as on the porphyrin synthesis and its direct reaction with singlet oxygen, which is the main oxidizing agent generated during PDT. These results are of particular importance in the treatment with ALA-PDT of tissues that synthesize high levels of H₂S, or that show an increase in its synthesis due to pathological reasons, as it has been verified for ovarian and colon tumours. In addition, it could be the object of study of other cancer therapies that act through ROS.

Keywords: Photodynamic therapy, hydrogen sulfide, 5-aminolevulinic acid, NaHS, cell lines, cancer.

Agradecimientos

Agradecer es muchas cosas. Es reconocer, es valorar, es devolver. Pero por sobre todo, es aceptar que las cosas no las hacemos solos, por lo que se convierten en proyectos colectivos. Por eso, esta tesis no me pertenece, sino que nos pertenece a todos quienes participamos en el proceso de realización.

Agradezco al CONICET, por la beca otorgada. Y por organizar los Juegos Deportivos. Al equipo de la Rosa, por los viajes, los partidos y los asados.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, por los subsidios para poder trabajar.

Agradezco a la Universidad de Buenos Aires, especialmente a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por aceptarme como doctorando. Por la excelente formación brindada, por la calidad y por la calidez. Como si eso fuera poco, me regaló 3 amistades eternas: Harry (el de las lechuzas), Nahue (el de los tiburones) y Gabo (el de los osos hormigueros). Harry: gracias por ser, por las horas de escritura, y por el aguante. Flor CT, Maru y las dos Danis, también del semillero de Exactas, tienen su lugar en mi corazón.

A Exactas Fútbol 11, por darme la posibilidad de jugar todos los fines de semana durante todo este tiempo. A todos con los que compartí cancha y vestuario. A los Lupis, son todo.

A lxs docentes del profesorado: me hicieron mirar el mundo de otra manera, y me abrieron las puertas a muchas cosas. A Ro y Nanu, por compartir ese camino conmigo, y quedarse. Y a Diego, por lo mismo.

Al CIPYP, por permitirme trabajar ahí. A las directoras, Dra. María Victoria Rossetti primero y Dra. Ana María Buzaleh, después. A todas las personas que ahí trabajan, por recibir a lxs nuevxs con cariño.

A Vanina y Victoria, por dejarnos siempre material para trabajar, y por ser tan amables todo el tiempo.

A Pablo, Vane, Marie, Lubna, Laurits, Seba, Gaby C. Por ser buenxs compañerxs de laburo, y buenxs amigxs. Creo que sin el apoyo mutuo, se hubiese hecho muy difícil. ¡Gracias miles!

Al Dr. Daniel Sáenz por la dirección de la tesis. Por estar siempre atento, por sus buenas intenciones, su paciencia infinita y por corregir la tesis al detalle. A la Dra. Gabriela Di Venosa, también por la dirección en la tesis, y por siempre saber que hacer para ayudarme.

A la Dra. Adriana Casas, por dirigir el grupo, por estar en todo, por ayudar siempre. A lxs tres, por enseñarme tanto. Les quiero agradecer especialmente y de corazón por haberme ayudado y alentado en un momento muy difícil. Eso, más que nada, habla de lo que son. Agradezco en el alma que me haya tocado trabajar con ustedes.

Además, han generado en el grupo un ambiente de trabajo muy colaborativo, cómodo y agradable, donde todxs tenemos lugar, y donde siempre prima la solidaridad. Saber que se puede generar un clima de trabajo así, me da esperanza. Y creo que es lo más valioso que me llevo de estos años.

A la Dra. María del Carmen Martínez por los análisis de HPLC.

A mi familia, que siempre está. Mi mamá, por su amor. Mi hermano, por sus consejos y su conocimiento. Anucha, porque con su magia cambia el mundo. Y Mime, por compartir conmigo más tiempo que nadie. Gracias a lxs 3 por la complicidad. En especial, le agradezco y le dedico este trabajo al hermoso de mi papá.

A mis compas del bachi, por el trabajo codo a codo, por la lucha.

A Uri, a quien tendría que ubicar en más de una categoría. ¡Gracias por todo!

A las personas que con sus abrazos, sus caricias, su amistad, sus besos, sus palabras y acciones, me enseñaron y me enseñan del amor y de la vida: Pelu, Agui, Pachi, Matito, Tari, Fredy, Turbo, Mime, Anucha, Gon, Lub, mis amigos y amigas de comodoro, Lu C, Marianne, Isabella, los dos Anders, Thaisy, Maru, Leo, Vale, Juanchi, Magda, Erci, Fede, Rama, Sari, Dani M, Eva, Nanu, Jessi, Juana, Caro, Pipi. A Magui, por todo y por tanto.

Abreviaturas

$(O_2^{\bullet-})^-$: Anión superóxido

$[OH]^{\bullet}$: Radical hidroxilo

1FS : Fotosensibilizante en estado singlete

1O_2 : Oxígeno singlete

3FS : Fotosensibilizante en estado triplete

3MST: 3-Mercaptopiruvato sulfotransferasa

3O_2 : Oxígeno triplete

AA: Acetilacetona

ADN: Ácido desoxiribonucleico

AE: Actividad específica

ALA: Ácido 5-aminolevúlico

ALA-D: Ácido 5-aminolevilúnico deshidratasa

ALA-TFD: Terapia fotodinámica basada en ALA

ANMAT: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica

AOA: Ácido aminooxoacético

ARN: Ácido ribonucleico

Asp: Ácido aspártico

AT: Azul de Toluidina

BSA: Seroalbúmina bovina

BSO: DL-Butionina-[S, R]- sulfoximina

CAT: Cisteína aminotransferasa

CBS: Cistationina β -sintasa

Ce6: Clorina e6

Ce6-TFD: Terapia fotodinámica basada en clorina e6

CO: Monóxido de carbono

CO₂: Dióxido de carbono

CSE: Cistationina γ -liasa

DADS: Dialil disulfato

DAO: D-Aminoácido oxidasa

DAS: Dialil sulfato

DATS: Dialil trisulfato

DCFH₂-DA: 2,7-Diclorodihidrofluorescein diacetato

DL₅₀: Dosis lumínica 50

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNHP: 2,4-Dinitrofenilhidrazina

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EMA: Agencia Europea de Medicina (*European Medicines Agency*)

EROs: Especies reactivas de oxígeno

FD: Fotodetección

FDA: Administración de Drogas y Alimentos (*Food and drug Administration*)

FeCl₃: Cloruro férrico

FS: Fotosensibilizante

FS*: Fotosensibilizante excitado

GGS: γ -Glutamilcisteína sintetasa

GMPc: Guanosina monofosfato cíclico

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

H₂S: Sulfuro de hidrógeno

HCl: Ácido clorhídrico

HO-2: Hemooxigenasa 2

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

KEAP-1: Proteína asociada a ECH tipo Kelch 1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*)

L-cis: L-Cisteína

LDL: Lipoproteína de baja densidad

L-NAME: N^ω-Nitro-L-arginina metil éster

MTT: 3-(4,5-Dimetil tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliobromuro

Na₂S: Sulfuro de sodio

NaHS: Sulfuro ácido de sodio

NaNO₂: Nitrito de sodio

NaOH: Hidróxido de sodio

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintasa

Nrf2: Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)

O₂: Oxígeno molecular

PAG: Propargilglicina

PBG: Porfobilinógeno

PBG-D: Porfobilinógeno deaminasa

PBS: Buffer fosfato de sodio

PDI: Fotoinactivación bacteriana (*Photodynamic Inactivation*)

PII: Photofrin®

PMDA: Agencia de Farmacología y Dispositivos Médicos (*Pharmaceutical and Medical Devices Agency*)

Pp IX: Protoporfirina IX

RSNO: Nitrosotiol

RSSH: Persulfuros

$S_2O_3^{2-}$: Tiosulfato

SAM: S-Adenosil metionina

SFB: Suero fetal bovino

TCA: Ácido tricloroacético

TFD: Terapia Fotodinámica

UE: Unidades enzimáticas

Índice

Resumen	ii
Abstract	v
Agradecimientos	vii
Abreviaturas	ix
Índice	xiii
I. Introducción	1
I.1. Terapia Fotodinámica.	1
I.1.1. Generalidades de la TFD.	1
I.1.2. Mecanismo de acción de la TFD.	2
I.1.3. Fotosensibilizantes.	3
I.1.3.1. Pro-fotosensibilizantes.	5
I.1.3.2. Síntesis endógena de porfirinas.	6
I.1.4. Acumulación preferencial del FS en tumores.	7
I.1.5. Terapia Fotodinámica basada en ALA (ALA-TFD).	8
I.1.6. Fotodiagnóstico, fotodetección y otros usos de los FS con capacidad fluorescente.	9
I.1.7. Otros usos de la TFD.	10
I.1.8. Ventajas de la TFD.	13
I.1.9. Penetración de la luz.	14
I.2. Sulfuro de hidrógeno.	16
I.2.1. Generalidades, propiedades químicas y toxicidad del sulfuro de hidrógeno.	16
I.2.2. Transmisores gaseosos.	18
I.2.2.1. Generalidades y características de los transmisores gaseosos.	18
I.2.2.2. Mecanismos de acción del H ₂ S y sus blancos moleculares.	20
I.2.2.2.1 Interacción con grupos hemo de hemoproteínas.	21
I.2.2.2.2. Persulfuración de tioles proteicos.	22
I.2.2.2.3. Efecto sobre canales iónicos.	23
I.2.2.2.4. Reacción directa con EROs y ERNs.	24
I.2.3. Interacciones entre los trasmisores gaseosos.	25
I.2.4. Fuentes de H ₂ S.	27
I.2.4.1. Fuentes ambientales.	27
I.2.4.2. Fuentes endógenas de H ₂ S en humanos.	29
I.2.5. Dadores de H ₂ S.	31
I.2.6. Efectos del H ₂ S sobre las defensas antioxidantes celulares.	32
	xiii

I.2.7. H ₂ S en cáncer.	37
I.2.8. H ₂ S en TFD.	41
II. Hipótesis y objetivos.	42
II.1. Hipótesis.	42
II.2. Objetivos.	42
II.2.1. Objetivo general.	42
II.2.2. Objetivos específicos.	42
III. Materiales y Métodos.	44
III.1. Fotosensibilizantes.	44
III.2. Líneas celulares.	45
III.2.1. LM2 y LM3.	45
III.2.2. SKOV-3 e IGROV-1.	45
III.2.3. Raw 264.7.	45
III.3. Fuente de luz.	45
III.4. Tratamiento fotodinámico.	46
III.5. Administración de NaHS.	47
III.6. Ensayo de viabilidad de MTT.	48
III.7. Dosis Lumínica 50 (DL ₅₀).	48
III.8. Determinación del número de células.	48
III.9. Toxicidad de NaHS.	49
III.10. Determinación de ALA y PBG utilizando el ensayo de Ehrlich.	49
III.11. Determinación de H ₂ S por conversión en azul de metileno.	49
III.12. Cuantificación de proteínas.	50
III.13. Determinación de glutatión reducido intracelular (GSH).	50
III.14. Determinación de porfirinas por microscopía de fluorescencia.	51
III.15. Cuantificación de porfirinas totales por extracción química.	52
III.15.1. Cuantificación de porfirinas totales a partir de cultivos celulares.	52
III.15.2. Cuantificación de porfirinas totales a partir de explantes de tumor.	52
III.16. Determinación de la síntesis endógena de H ₂ S.	52
III.17. Capacidad oxidante total.	54
III.18. Interacción del H ₂ S con ¹ O ₂ <i>in vitro</i> (sistema libre de células).	54
III.19. Determinación de EROs <i>in vivo</i> utilizando la sonda DCFH ₂ -DA.	56
III.20. Análisis de imágenes con FIJI®.	56
III.21. Cuantificación de proteínas oxidadas.	56

III.22. Síntesis de óxido nítrico en presencia de NaHS.	57
III.23. Generación de tumores de líneas celulares LM2 y LM3 en ratones BALB/c.	57
III.23.1. Obtención de homogenatos de tumor.	58
III.23.2. Obtención de explantes de tumor.	58
III.24. Determinación de la actividad de enzimas de la vía metabólica del grupo hemo.	58
III.24.1. Determinación de la actividad de ALA-D.	59
III.24.1.1. En hemolizado de glóbulos rojos.	59
III.24.1.2. En homogenato de tumor.	60
III.24.2. Determinación de la actividad de PBG-D.	61
III.24.2.1. En hemolizado de glóbulos rojos.	61
III.24.2.2. En homogenato de tumor.	62
III.25. Análisis por HPLC de fase reversa (RP-HPLC) de los intermediarios involucrados en la síntesis de porfirinas.	63
III.26. Análisis bioinformáticos.	64
III.27. Análisis estadísticos.	65
Resultados	66
IV. Efecto del H ₂ S en cultivos celulares de la línea de adenocarcinoma mamario murino LM2.	66
IV.1. Efecto del NaHS sobre la viabilidad de células LM2.	67
IV.2. Efecto del NaHS en la ALA-TFD en células LM2.	68
IV.2.1. Efectos del NaHS previos a la ALA-TFD.	75
IV.2.1.1. Síntesis endógena de GSH y su efecto en la ALA-TFD.	75
IV.2.1.2. Síntesis endógena de H ₂ S y su efecto en la ALA-TFD.	78
IV.2.1.3. Efecto del NaHS en la síntesis de porfirinas.	84
IV.2.1.4. Efecto directo del NaHS sobre algunas EROs.	88
IV.2.1.5. Efecto del NaHS post ALA-TFD.	95
IV.3. Efecto del H ₂ S sobre la ALA-TFD en otras líneas celulares.	101
IV.4. Discusión.	106
V. Efecto del H ₂ S en cultivos celulares de la línea de adenocarcinoma mamario murino LM3.	111
V.1. Efecto del NaHS sobre la viabilidad de las células LM3.	111
V.2. Efecto del NaHS en la ALA-TFD en las células LM3.	112
V.2.1. Efectos del NaHS previos a la ALA-TFD.	113
V.2.1.1. Síntesis endógena de GSH.	113
V.2.1.2. Síntesis endógena de H ₂ S y del NO y su efecto en la ALA-TFD.	114

V.2.1.3. Efecto del NaHS en la síntesis de porfirinas.	119
V.2.1.4. Efecto del NaHS post ALA-TFD.	121
V.3 Discusión.	124
VI. Estudio de las enzimas de la vía metabólica del hemo y síntesis de H ₂ S.	128
VI.1. Efecto del NaHS en el camino metabólico del hemo.	129
VI.1.1. Síntesis de porfirinas: análisis de intermediarios por HPLC de fase reversa en células LM2 y LM3.	130
VI.1.2. Determinación de porfirinas totales sintetizadas en explantes de tumores LM2 y LM3.	136
VI.1.3. Determinación de diferentes actividades enzimáticas involucradas en la síntesis de porfirinas.	139
VI.1.3.1. Actividad enzimática específica ALA-D y PBG-D en homogenatos de tumores de ambas líneas celulares.	140
VI.1.3.1.1. Actividad enzimática específica de ALA-D.	140
VI.1.3.1.2. Actividad enzimática específica de PBG-D.	144
VI.2. Análisis bioinformático de las enzimas que generan H ₂ S.	148
VI.2.1. Análisis genómicos.	148
VI.2.2. Análisis de expresión génica.	152
VI.3. Discusión.	159
VII. Discusión general.	167
VIII. Conclusiones.	171
IX. Resumen gráfico de resultados.	173
X. Referencias.	174

I. Introducción

I.1. Terapia Fotodinámica.

I.1.1. Generalidades de la TFD.

La Terapia Fotodinámica (TFD) es un tratamiento cuyo objetivo es provocar la muerte celular. Para ello se deben combinar tres elementos: un fotosensibilizante (FS), oxígeno molecular (O_2) y luz de una longitud de onda adecuada. Su efecto está dado por una gran generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y radicales libres en el tejido o célula tratada, principalmente por la producción de oxígeno singlete (1O_2). La TFD es una terapia binaria (consta de dos pasos): primero, la administración y acumulación selectiva del FS en el tejido o células a tratar; y segundo, la irradiación con luz en la zona blanco, como se esquematiza en la Figura I.1.1.

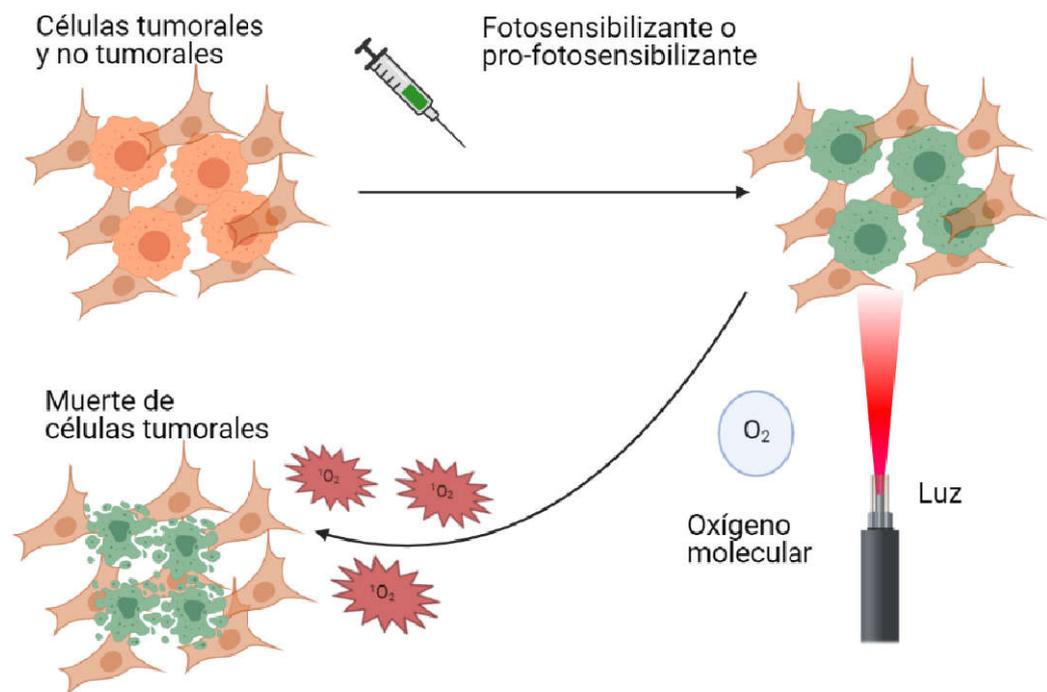


Figura I.1.1. Esquema que representa las bases de la TFD.

Las EROs generadas durante la TFD son muy reactivas, y oxidan rápidamente a otras moléculas, como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Casas et al., 2001; Allegra 2020). La alta reactividad de las EROs se notan en sus cortos tiempos de vida media. Por

ejemplo, la vida media del $^1\text{O}_2$ es de 10^{-5} segundos (Sies, 1993). En cuanto a otras EROs, la vida media del anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) es de 10^{-9} segundos (se reduce a 10^{-15} segundos en presencia de la enzima superóxido dismutasa); la del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es de 10^{-3} segundos (pero desciende a 10^{-8} en presencia de la enzima catalasa); y la del radical hidroxilo ($[\text{OH}]^{\bullet}$) es de 10^{-9} segundos (Dickinson y Chang, 2011; Taverne et al., 2013).

I.1.2. Mecanismo de acción de la TFD.

La Figura I.1.2 describe un diagrama de Jablonski, que relaciona los estados energéticos de un FS y como se generan las diferentes EROs.

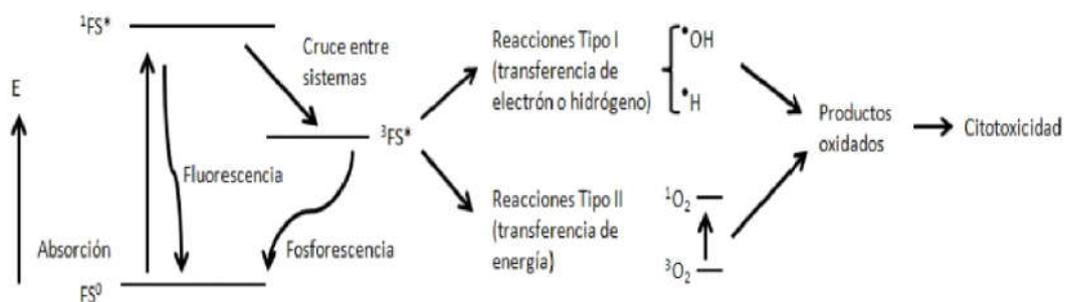


Figura I.1.2. Diagrama de Jablonski para las reacciones de fotosensibilización (Chiarante, 2019).

Cuando se irradia una molécula de FS con un haz de luz de longitud de onda adecuada, la energía absorbida por la molécula de FS en su estado basal (FS^0) provoca un salto electrónico, dejando al FS, cuya naturaleza es en estado singlete, excitado ($^1\text{FS}^*$). El $^1\text{FS}^*$ tiene varias posibilidades para liberar esa energía. Por un lado, puede hacerlo en forma de luz, como fluorescencia si está en $^1\text{FS}^*$ o como fosforescencia si está en estado triplete ($^3\text{FS}^*$), o en forma de calor (vibrando). Pero, para que se generen EROs, es importante que ocurra un cruce intersistema, y que el $^1\text{FS}^*$ pase a un estado $^3\text{FS}^*$, con pérdida de energía. El $^3\text{FS}^*$ es más estable, y puede acoplar con el O_2 , que está naturalmente en estado triplete ($^3\text{O}_2$), transfiriéndole energía. Así, el O_2 pasa del estado $^3\text{O}_2$ al estado $^1\text{O}_2$, que como fue mencionado previamente, es una especie muy oxidante. La reacción a través de la cuales se genera $^1\text{O}_2$ a partir de $^3\text{FS}^*$ y luz se llama

reacción fotoquímica tipo II. Las demás EROs se forman a través de la reacción fotoquímica tipo I, que involucra la interacción del $^3\text{FS}^*$ con biomoléculas. En dicha interacción, se da la transferencia de un hidrógeno o de un electrón, formando radicales libres de ambos compuestos. Estas especies pueden reaccionar con el oxígeno molecular y dar lugar a la formación de $(\text{O}_2^\bullet)^-$, $[\text{OH}]^\bullet$, H_2O_2 , entre otras especies (van Steveninck et al., 1986; Athar et al., 1989; Abrahamse y Hamblin, 2016).

La disponibilidad de O_2 en el tejido a tratar es fundamental para que la TFD tenga efecto. Inmediatamente antes de la fotosensibilización debe haber una cantidad suficiente de O_2 en el tejido, la cual irá disminuyendo a medida que este es utilizado para generar las EROs. Una posible consecuencia de la TFD es la formación de edemas en la zona tratada, lo que limita la llegada de sangre, y consecuentemente la reposición de O_2 . Es por ello que, para permitir una adecuada re-oxigenación del tejido, se suelen utilizar dosis bajas de luz a tiempo largos de irradiación, o se administra la luz de manera fraccionada (Middelburg et al., 2010).

I.1.3. Fotosensibilizantes.

Dentro del universo de compuestos con actividad FS existen una diversidad de sustancias de distinta naturaleza química. Principalmente se trata de moléculas de estructuras grandes que contienen dobles enlaces conjugados, como anillos tetrapirrólicos. Un ejemplo de este tipo de moléculas son las derivadas de las porfirinas, clorinas, texafirinas, y ftalocianinas. Sin embargo, otros compuestos como carotenos, ficobilinas, colorantes, porfíricos y antraquinonas son también utilizados como FS (Ormond y Freeman, 2013; Abrahamse y Hamblin, 2016; Baskaran et al., 2018).

Para ser considerada un FS, la molécula debe poder acumularse preferencialmente en el tejido blanco, absorber luz y en consecuencia generar especies oxidantes. Además, dicha molécula no debe ser tóxica *per se*, y solo debe activarse al ser irradiada con la luz de longitud de onda adecuada. En la Figura I.1.3 se muestran las estructuras químicas de algunos FS.

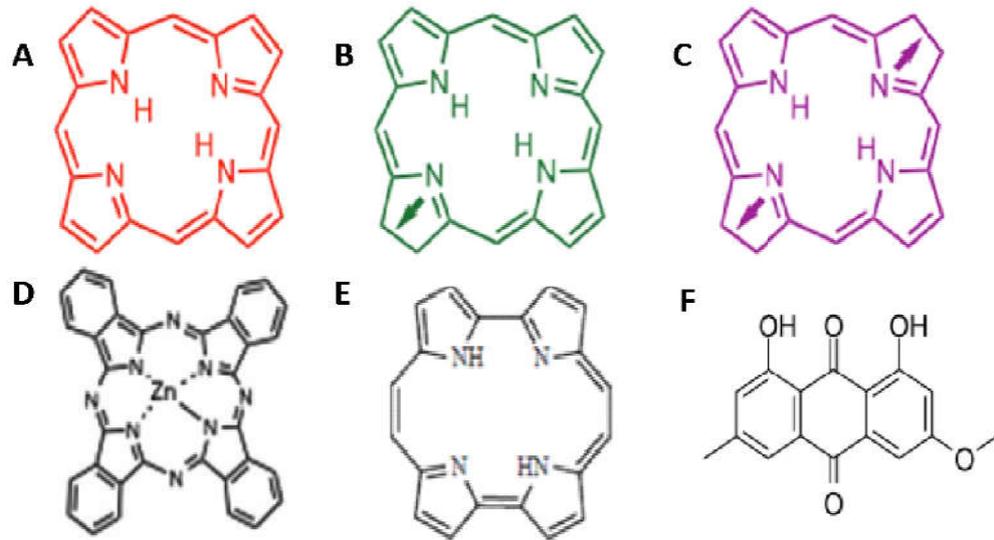


Figura I.1.3. Principales familias de compuestos con actividad FS: (A) porfirina, (B) clorina, (C) bacterioclorina, (D) ftalocianina (en este caso de Zn, pero el metal puede variar), (E) porficeno y (F) antraquinona (en este caso parietina, presente en el líquen *Teoloschistes nodulifer*, nativo de Argentina (Comini et al., 2017)). Tomado y ampliado de Abrahamse & Hamblin (2016).

El primer FS aprobado en 1999 por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (*FDA*, por su sigla en inglés) fue el Photofrin® (Figura I.1.4), una hematoporfirina derivada que consta de una mezcla de oligómeros formados por uniones éter o éster sumando hasta 8 porfirinas.

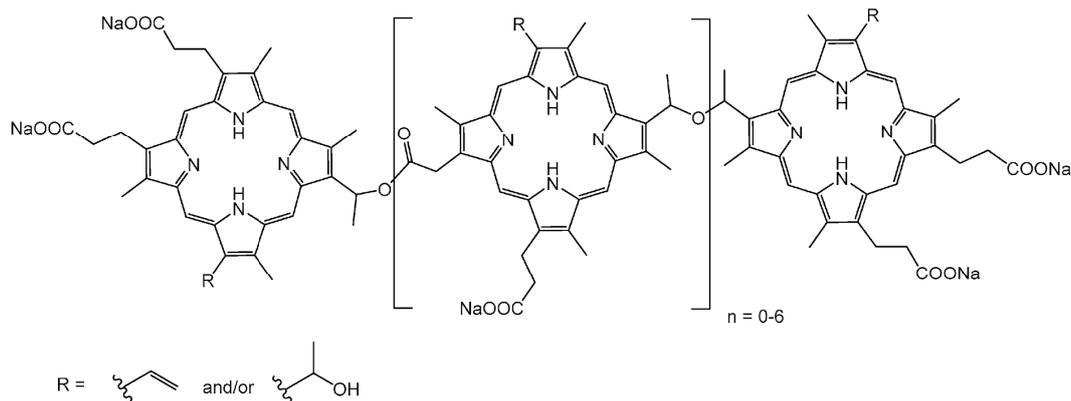


Figura I.1.4. Estructura del Photofrin® (Gallardo-Villagrán et al., 2019).

Si la gran cantidad de especies oxidantes que se generan durante la TFD superan las defensas antioxidantes de las células, se provoca su muerte, que puede ser por diferentes mecanismos como apoptosis, autofagia o necrosis (Casas et al., 2001). La localización subcelular del FS influye en el mecanismo de muerte celular, aunque no es el único factor, ya que también es determinante la cantidad de FS y la dosis y tipo de luz con que se irradia el tejido (Abrahamse y Hamblin, 2016).

I.1.3.1. Pro-fotosensibilizantes.

Existen también sustancias que son pro-FS, es decir que no son FS *per se*, sino que al ingresar organismo se metabolizan, dando lugar al verdadero FS. Nuestro grupo se ha especializado en el uso del pro-FS ácido 5-aminolevulínico (ALA), que es un metabolito endógeno que da lugar a la formación del grupo hemo. La protoporfirina IX (Pp IX), y otras porfirinas, son intermediarias en este camino biosintético, y poseen diferentes grados de actividad fotosensibilizante. De todos los intermediarios porfirínicos, la Pp IX es el que posee mayor actividad fotosensibilizante (Redmond y Gamlin, 1999).

I.1.3.2. Síntesis endógena de porfirinas.

En la Figura I.1.5 se muestra un esquema de dicha síntesis endógena en una célula. La síntesis consta de 8 pasos enzimáticos, que se distribuyen entre 4 pasos mitocondriales y 4 pasos citoplasmáticos (Batlle, 1993). El ALA se forma a partir de succinil-CoA y glicina por acción de la enzima ALA sintasa. El ALA se produce en la mitocondria, y luego es transportado al citoplasma, donde a través de la acción de la enzima ALA-dehidratasa forma porfobilinógeno (PBG), que es un monopirrol. En el tercer paso, la PBG-deaminasa condensa 4 moléculas de PBG y forma el tetrapirrol hidroximetilbilano, y este último se convierte en Uroporfirinógeno III por acción de la Uroporfirinógeno III sintasa. La enzima Uroporfirinógeno decarboxilasa cataliza una serie de decarboxilaciones, y forma el Coproporfirinógeno III. Este último ingresa a la mitocondria y es sustrato de la enzima Coproporfirinógeno oxidasa, el sexto paso de la vía, que da como producto el Protoporfirinógeno IX. La Protoporfirinógeno IX oxidasa forma la Pp IX. El último paso de la síntesis es la inserción de un átomo de hierro en estado ferroso, reacción catalizada por la enzima Ferroquelatasa, dando como resultado el producto final de la síntesis, el grupo hemo.

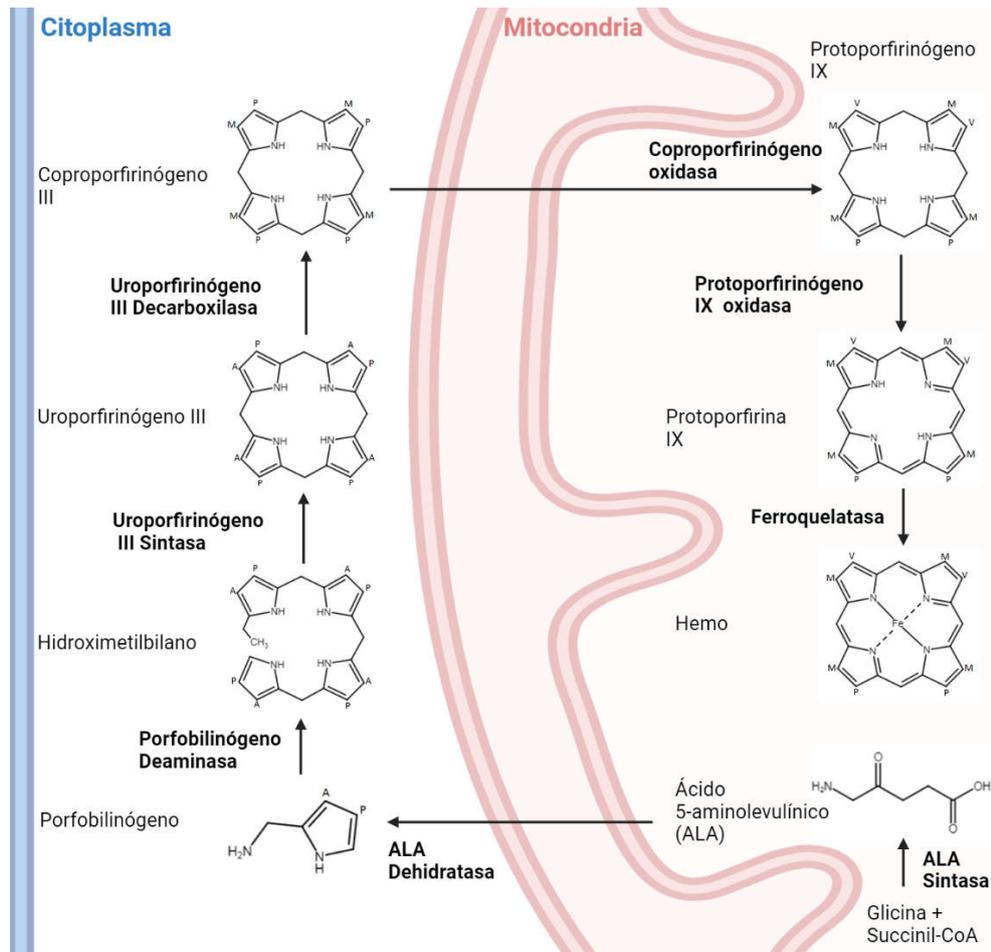


Figura I.1.5. Esquema de la síntesis metabólica del grupo hemo, cuatro de las reacciones ocurren en la mitocondria de las células, y las otras cuatro en el citoplasma.

I.1.4. Acumulación preferencial del FS en tumores.

No está aún esclarecido el mecanismo a través del cual los FS se acumulan preferencialmente en los tumores, pero existen varias hipótesis (Hamblin y Newman, 1994). Una de ellas es la alta densidad de receptores para lipoproteínas de baja densidad (LDL) que tienen los tejidos en crecimiento, a través de los que adquieren los lípidos necesarios para la síntesis de membranas. Se ha visto que algunos de los FS más efectivos, incluidas las porfirinas, viajan por el plasma asociados a LDL. De esta manera, los FS entrarían a las células tumorales asociadas a LDL (Kessel, 1992). Otra posibilidad sería debido a la debilidad de la vasculatura y al pobre drenaje linfático

tumorales, lo que produce un efecto llamado “permeabilidad y retención mejoradas” (EPR, del inglés “*enhanced permeability and retention*”), lo que favorecería la acumulación de agregados de porfirinas y otros FS en el espacio intersticial (Iyer et al., 2006).

I.1.5. Terapia Fotodinámica basada en ALA (ALA-TFD).

La ALA-TFD se sustenta en dos hechos. El primero, es que todas las células son capaces de sintetizar porfirinas a partir del ALA, ya que el grupo hemo es una molécula esencial en el metabolismo general de las células (Ponka, 1999; Sun et al., 2015). El grupo hemo está presente en una variedad de proteínas esenciales como la hemoglobina, la mioglobina, la catalasa, neuroglobina, los citocromos (encargados de detoxificar y de la respiración celular), las peroxidasas, las óxido nítrico sintasas, y más. Como se abordará más adelante, la enzima cistationina β -sintasa, que sintetiza H_2S , también posee al grupo hemo como cofactor, lo cual la convierte en una hemoproteína.

El segundo, es que en varios tipos de tejidos tumorales y proliferativos, se han hallado alteraciones en esta vía metabólica que conduce a la acumulación de Pp IX en el tejido. Se ha encontrado que la actividad de la ferroquelatasa está disminuida, y que la de ALA-D y PBG-D están aumentadas (Casas, 2020), por lo que la presencia de ALA provoca la acumulación de porfirinas, principalmente Pp IX.

Una ventaja adicional de la utilización de pro-FS como el ALA, es que el compuesto que se administra no tiene actividad fototóxica *per se*, y que los efectos adversos generados por la Pp IX, como la fotosensibilidad, son de menor duración comparado con otros FS (Casas, 2020).

I.1.6. Fotodiagnóstico, fotodetección y otros usos de los FS con capacidad fluorescente.

Como resultado de la fluorescencia producida por algunos FS al ser iluminados con una luz de longitud de onda adecuada, surge la fotodetección (FD) como una herramienta tanto para la detección diagnóstica como para seguimiento de tumores (Ackroyd et al., 2001). Duska y colaboradores (2002) lograron con esta técnica detectar lesiones en el tracto vaginal que habían sido “invisibles” a las técnicas de detección de rutina. Otro uso de la FD es la cirugía guiada por fluorescencia, que aprovecha esta selectividad para demarcar en forma más definida los límites de la resección, su aplicación está más utilizada en la cirugía tumoral cerebral, donde dicho procedimiento debe ser muy preciso (Stummer et al., 2006; Kaneko y Kaneko, 2016; Akimoto et al., 2019; Hadjipanayis y Stummer, 2019).

La Figura I.1.6 muestra la administración sistémica de un FS o pro-FS, su acumulación en el tejido blanco y su uso terapéutico (TFD) o el diagnóstico (FD).

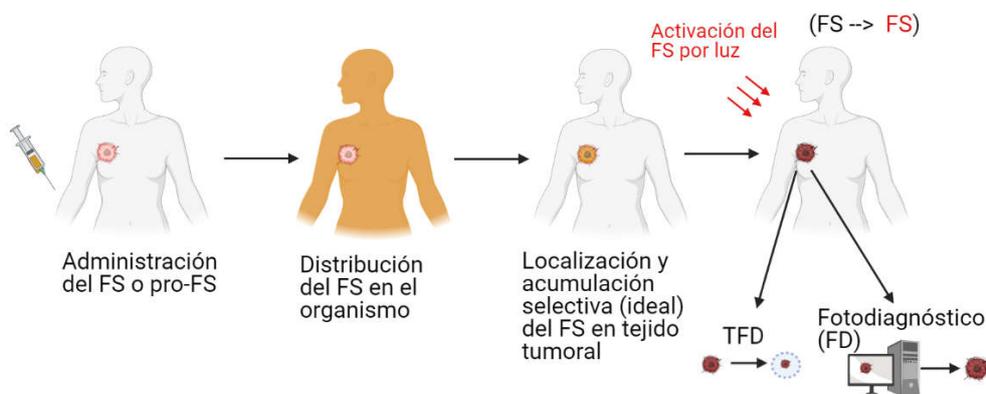


Figura I.1.6. La administración sistémica de un FS o un pro-FS y su acumulación en el tejido blanco puede seguir el camino terapéutico (TFD) o el diagnóstico (FD).

Teniendo en cuenta que el ALA es una molécula polar, es necesario que utilice un transportador o *carrier* en la membrana citoplasmática, para facilitar su ingreso a las células, por lo cual se han elaborado diferentes derivados más lipofílicos que permiten

que ingresen al interior de las células más rápidamente por difusión simple (Casas y Batlle, 2006).

De estos derivados lipofílicos, se destacan el hexil-ALA, que fue aprobado en 2010 por la FDA para FD de un tipo de cáncer de vejiga (Stenzl et al., 2010; Daneshmand et al., 2014), y el metil-ALA en forma farmacéutica de crema tópica cutánea, aprobado en Argentina por la ANMAT para el tratamiento de queratosis actínica, carcinoma basocelular y enfermedad de Bowen (ANMAT, Disposición 0157-17).

Las cremas, los geles, los sprays y soluciones de FS o pro-FS se pueden administrar directamente de manera tópica cuando el acceso a la lesión es directo, como en la boca o la piel (Dirschka et al., 2012).

I.1.7. Otros usos de la TFD.

Usos no oncológicos de la TFD incluyen el tratamiento para eliminación de bacterias, hongos y virus, lo que es denominado Terapia Fotodinámica Antimicrobiana o Fotoinactivación bacteriana (PDI por sus siglas en inglés, *Photodynamic Inactivation*). Dado su mecanismo de acción, esencialmente cualquier célula o estructura en la cual interactúen el FS, la luz adecuada y el O₂, sufrirá los efectos oxidantes de la terapia y es susceptible de tratarse con TFD/PDI. Este abordaje se ha propuesto para el tratamiento de infecciones bacterianas superficiales orales o cutáneas, o para infecciones periodónticas y endodónticas, y para la esterilización de prótesis, insumos y dispositivos de uso médico (Baugh y Clark, 1959; Jori et al., 2006; Amos-Tautua et al., 2019), a los que se pueda acceder fácilmente con una fuente de luz. La PDI no genera resistencia, ni presenta resistencia cruzada con otros antibióticos, (Cieplik et al., 2018). Por esta razón, y a raíz de la aparición de microorganismos que presentan resistencias múltiples a antibióticos (O'Neill, 2016), la investigación en esta área ha ido creciendo notablemente en los últimos años.

La TFD ha sido propuesta e investigada con éxito para su uso en el tratamiento de la aterosclerosis, que se conoce como fotoangioplastia (Rockson et al., 2000; Céspedes et al., 2021). Las placas de ateroma están compuestas por depósitos de lípidos y varios componentes celulares como los macrófagos, con receptores secuestrantes (*scavengers*) para la captación de LDL, los cuales no sufren regulación en baja (*down regulation*). Al captar grandes cantidades de LDL, estos macrófagos se convierten en células espumosas, con grandes depósitos de lípidos y colesterol esterificado, iniciando así la estría grasa, que es el comienzo de la placa aterosclerótica.

Las porfirinas asociadas a lipoproteínas del plasma se acumulan en estas células, y la luz es administrada a través de una fibra óptica por la luz de una arteria estenótica (estrecha).

Algunos desórdenes inmunológicos/inflamatorios como la psoriasis, acné, liquen plano, escleroderma, alopecia y degeneración macular de la retina, han sido exitosamente tratados con TFD (Taub, 2007).

Otros usos de la TFD por fuera del organismo incluyen el tratamiento de médula ósea antes del auto-transplante (Casas, 2020), y la eliminación de patógenos de sangre para transfusión (Wainwright y Baptista, 2011). La empresa Japonesa Terumo BCT (Hatagaya Shibuya-ku, Tokyo, Japan), con presencia en varios países, ha desarrollado una tecnología para esterilización de plasma utilizando riboflavina y luz UV (Mirasol® *Patogen Reduction Technology System*, Terumo BCT) (Cancelas et al., 2011; Allain et al., 2016).

Dada su baja toxicidad, pocos efectos adversos y su buena cicatrización, la TFD tiene un amplio y prometedor uso en el campo de la cosmética, por ejemplo como tratamiento fotorejuvenecedor (Rossi et al., 2011).

Finalmente, otros usos de la TFD que han sido propuestos y que se investigan en menor medida son su uso para el tratamiento de agua residuales (Coppellotti et al., 2012; Bartolomeu et al., 2017), en la desinfección de productos alimenticios (Amos-

Tautua et al., 2019), y en aplicaciones agropecuarias, como el control de hongos en cultivos de cítricos (Gonzales et al., 2017), o como alternativa al uso de antibióticos en piscicultura (Almeida et al., 2009).

A continuación, se listan algunos de los compuestos y usos aprobados para TFD y FD por las entidades regulatorias de Argentina (ANMAT), Europa (*European Medicines Agency*, EMA), Estados Unidos (FDA) y Japón (*Pharmaceutical and Medical Devices Agency*, PMDA) (Tabla I.1.1). En un artículo reciente, Casas (2020) hace una revisión todos los usos clínicos y preclínicos de ALA-TFD y los derivados de ALA, metil-ALA y hexil-ALA.

Tabla I.1.1. Fotosensibilizantes aprobados para su uso en TFD por distintas entidades regulatorias (Baskaran et al., 2018; Casas, 2020).

Nombre comercial	Otros nombres	Tipo de molécula	Usos aprobados
Photofrin® (FDA, ANMAT)	Porfímero de Sodio, derivado de hematoporfirina	Derivado de porfirina	Cáncer de esófago, cáncer de pulmón endobronquial, esófago de barret, cáncer papilar de vejiga (2da línea)
Ameluz®/Levulan® (FDA, ANMAT)	Ácido 5-aminolevulínico (ALA)	Precursor de porfirina	Queratosis actínicas en cara y cuero cabelludo, Fotodetección de tumores de cerebro.
Metvix®/Metvixia® (FDA, ANMAT)	Metil ALA	Precursor de porfirina	Queratosis actínicas en cara y cuero cabelludo, carcinoma de células basales
Hexil-ALA (FDA, ANMAT)		Precursor de porfirina	Fotodetección de tumores de vejiga y cirugía guiada por fluorescencia de gliomas
Foscan® (FDA, ANMAT)	Temoporfina, tetra hidroximetil clorina	Clorina	Tumores de cabeza y cuello avanzados
Laserphyrin® (PMDA)	Talaporfina de sodio	Derivado de clorina	Cáncer de pulmón
Visudyne® (EMA, FDA)	Verteporfina, Benzoporfirina derivado	Derivado de porfirina	Degeneración macular relacionada con la edad.
Redaporfin® (EMA, Portugal)		Bacterioclorina	Cáncer de las vías biliares (colangiocarcinoma)

I.1.8. Ventajas de la TFD.

La TFD presenta varias características ventajosas con respecto a los tratamientos tradicionales. En primer lugar, no presenta reacciones cruzadas con otros tratamientos (Casas et al., 2011), por lo cual puede usarse en combinación con otras terapias, a menudo mostrando efectos sinérgicos (Fahey y Girotti, 2019). Además, como el daño queda mayoritariamente restringido a la zona tumoral, disminuyen los efectos adversos sobre otros órganos. Por estas razones es que la TFD puede repetirse varias veces en la misma zona, y se puede usar en caso de recurrencia del tumor.

En segundo lugar, el riesgo de producir nuevas neoplasias es bajo, ya que el daño al ADN es limitado; así como lo es también el riesgo de perforar o reducir la fuerza mecánica de órganos internos (Dougherty, 1984; Kennedy, 2006).

Finalmente, la TFD puede realizarse de forma ambulatoria, a diferencia de la radio y la quimioterapia, que en muchos casos requieren hospitalización.

Debido a la selectividad del FS por el tejido a tratar, a su muy baja o nula toxicidad en oscuridad, y al hecho de que la luz es administrada mayoritariamente a la zona tratada, el tejido circundante no iluminado no sufre daño alguno. Esto hace que la TFD tenga asociados menos efectos secundarios y sea mucho más segura que los tratamientos convencionales. Sin embargo, en eso radica también su limitación: los sitios donde puede llegar la luz. Es por esta razón que los lugares más aptos para ser tratados con TFD son órganos superficiales (piel, ojos), u órganos huecos y cavidades de fácil acceso por vía endoscópica (boca, faringe, esófago, tracto vaginal, vejiga, etc.).

I.1.9. Penetración de la luz.

Uno de los componentes necesarios en la TFD es la luz, que cumple la función de brindar los fotones necesarios para la excitación del FS. Es por este motivo, que la luz tiene que ser de una longitud de onda adecuada, ya que debe coincidir con alguna zona del espectro de absorción del FS que se utiliza. Por ejemplo, las porfirinas muestran una intensa absorción alrededor de los 400 nm, en la región azul, llamada banda de Soret, y otros picos de menor absorción entre los 500 y los 650 nm, llamados bandas Q (Figura I.1.7).

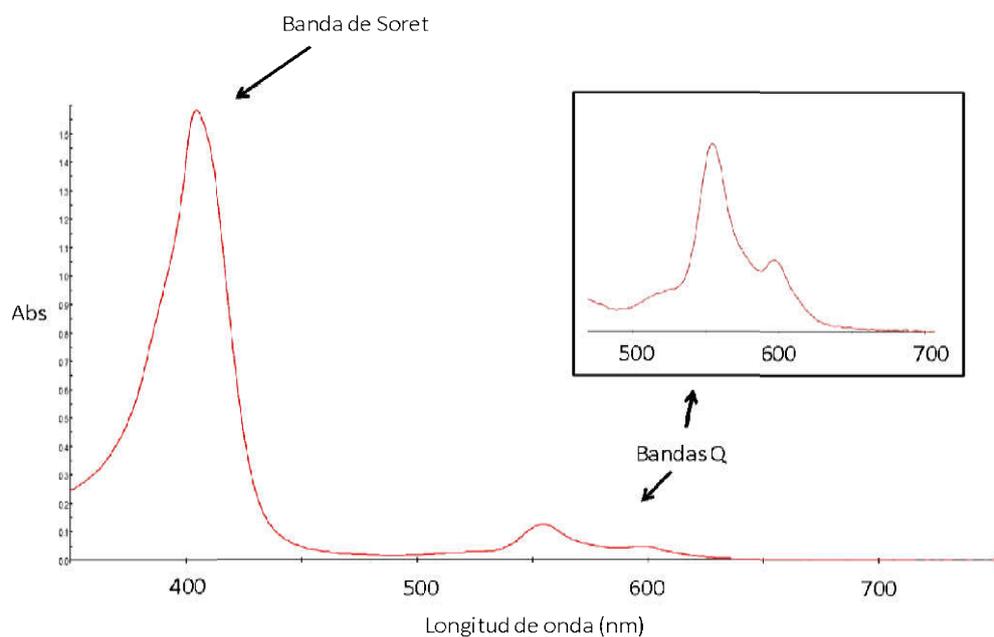


Figura I.1.7. Espectro de absorción típico de las porfirinas, en este caso corresponde a la Pp IX. El eje de las abscisas indica la longitud de onda en nm y el de las ordenadas la intensidad de la absorción.

Otra limitación técnica en el uso de TFD es la penetración de la luz en los tejidos. Cuanto menor es la longitud de onda, mayor es la dispersión en el tejido y la absorción de la luz por parte de biomoléculas, como la hemoglobina y la melanina. Existe entonces un compromiso para determinar la longitud de onda adecuada, entre la máxima absorción del FS y la penetración de la luz en el tejido. Retomando el ejemplo de las porfirinas, se suele utilizar la banda de absorción de 630 nm, que si bien es la

más débil, es la longitud de onda que más penetra en los tejidos (comparado con los otros picos de absorción de las porfirinas). La penetración de la luz aumenta a medida que aumenta la longitud de onda, como muestra el esquema de la Figura I.1.8 (van Gemert et al., 1985).

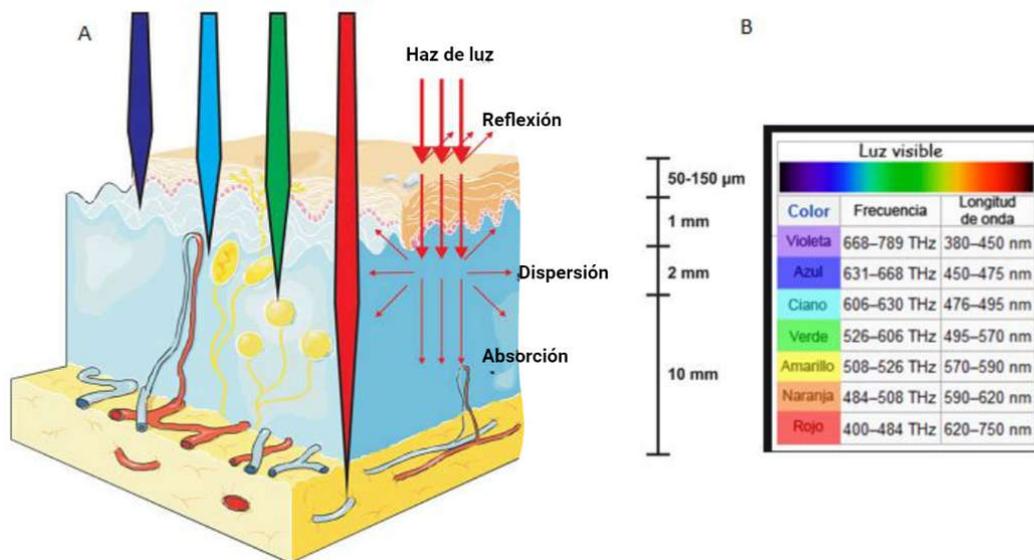


Figura I.1.8. A) Esquema de la penetración de la luz en la piel, según B) la longitud de onda de la luz incidente en el tejido. Traducido de Agostinis et al., (2011).

Las fuentes de luz utilizadas para TFD son variadas e incluyen láseres (sumamente útiles por emitir en una longitud de onda definida), lámparas halógenas, LEDs e inclusive la luz solar. Las lámparas de luz blanca y algunos LEDs son las más versátiles, ya que al emitir en un espectro amplio de longitudes de onda, pueden aplicarse a una mayor variedad de FS. Otros tipos de LEDs emiten longitudes de onda acotadas, similares a los láseres, por lo que son útiles para una única longitud de onda. Sin embargo, los láseres emiten luz de mayor potencia.

Si bien lo más usual es el que los tumores a ser tratados con TFD sean superficiales o en órganos huecos de fácil acceso, también se han tratado tumores sólidos por medio de TFD intra operatoria y se han desarrollado fibras ópticas intersticiales de manera tal

de poder irradiar de forma homogénea diferentes cavidades u órganos macizos desde su interior (Casas, 2020), tal como lo muestra la Figura I.1.9.

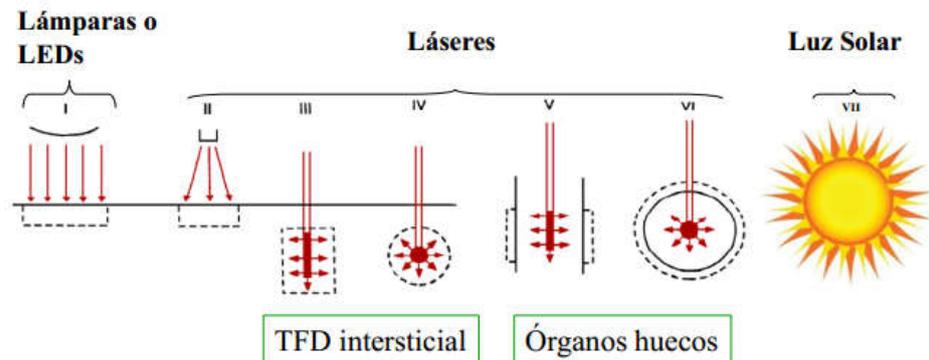


Figura I.1.9. Sistemas de aplicación de la luz en TFD. Sistemas de aplicación de luz en TFD. Iluminación superficial con lámpara convencional (I), láser acoplado a una fibra óptica (II). Iluminación intersticial con un difusor cilíndrico (III) o esférico (IV). Iluminación intraluminal e intracavitaria con difusor cilíndrico (V) o esférico e isotrópico (VI). Las flechas representan la luz emitida, y la línea punteada representa la distribución de la luz en un tejido altamente refringente. (VII) Luz Solar. Tomado de Vallecorsa (2019).

I.2. Sulfuro de hidrógeno.

I.2.1. Generalidades, propiedades químicas y toxicidad del sulfuro de hidrógeno.

El sulfuro de hidrógeno (H_2S) es un gas a temperatura ambiente. Es muy volátil, inflamable, incoloro, posee un olor característico a huevo podrido, y es sumamente tóxico (Beauchamp et al., 1984; Reiffenstein et al., 1992; Marshall et al., 2009; Haouzi, 2012). Sin embargo, al ser su detección muy sensible a través del olfato, su peligrosidad suele ser evitada. El umbral de detección en las personas es de entre 0,008 y 0,2 ppm (Amoore, 1983), siendo del orden del umbral de detección para el olor a “gas natural o de cocina”, que es de 0,0016 – 0,1 ppm (los odorantes que se le agregan al gas son compuestos organosulfurados o mezcla de ellos, como metilmercaptano, metil etil sulfuro, 2-tiol 2-metilpropano, tertiobutil metilmercaptano, entre otros).

Químicamente, el H₂S es un ácido débil, con un primer pKa = 6,9-7,1 y el segundo pKa > 12 (Hughes et al., 2009). Esto significa que a pH fisiológico, la especie predominante es el sulfuro ácido. La proporción aproximada de las 3 especies a dicho pH es HS⁻ en un 80% y H₂S en un 20% (Giuffrè y Vicente, 2018), mientras que la del anión disulfuro S²⁻ se considera despreciable. La Figura I.2.1 muestra los equilibrios del H₂S.

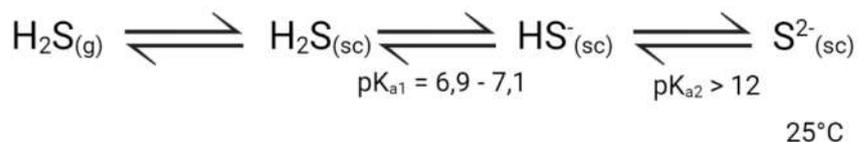


Figura I.2.1. Equilibrios de disociación del H₂S. Los valores de pKa₁ = 6,9-7,1 y del pKa₂ > 12.

Los efectos adversos del H₂S en seres humanos están ampliamente estudiados, y describen desde irritación ocular a dosis bajas, lesiones pulmonares, hasta pérdida de la conciencia, asfixia y paro cardiopulmonar a dosis altas (Szabo y Papapetropoulos, 2017). La Tabla I.2.1 muestra la toxicidad y los síntomas de intoxicación con H₂S.

Tabla I.2.1. Efectos tóxicos del H₂S en seres humanos. Concentraciones tóxicas y efectos sobre la salud del H₂S. Tomado de *International Volcanic Health Hazard Network (IVHHN)*.

Límite de exposición (ppm)	Efectos sobre la salud
0,008 – 0,2	Umbral respiratorio, se detecta olor a huevo podrido
20	Olor a fuga de gas. Tolerancia durante algunas horas sin daño
20 – 50	Irritación ocular
60	Exposición prolongada puede causar faringitis o bronquitis
> 150	Exposición prolongada puede causar conjuntivitis y dolor de ojos
250	Edema pulmonar con riesgo de muerte
500	Muy peligroso, se debe evacuar mucho antes de llegar a este nivel
1000	Pérdida de conciencia
1000 – 2000	Intoxicación aguda: los síntomas incluyen respiración agitada, angustia, náusea y vómito. Puede ser rápidamente seguido de pérdida de conciencia, coma y paro respiratorio
> 2000	Pérdida inmediata de conciencia y alta probabilidad de muerte

A pesar del bajo umbral de detección, la exposición a concentraciones bajas pueden pasar desapercibidas en una mezcla de olores, y la exposición a dosis pequeñas pero prolongada en el tiempo puede traer consecuencias a nivel neurológico, cardiovascular y respiratorio (Legator et al., 2001; Bates et al., 2002).

El H₂S fue históricamente conocido por sus efectos tóxicos, y a pesar de que fue identificado en el año 1777 por Carl Wilhelm Scheele, y bautizado como gas sulfuroso (Scheele, 1782), ya era conocido desde hacía siglos como “gas de los pantanos”, o “gas de las alcantarillas”.

Desde hace varias décadas se sabe que el H₂S puede ser sintetizado en los tejidos de mamífero y se conocen las enzimas responsables de ello (Stipanuk y Beck, 1982). No obstante, la atención por su rol en procesos fisiológicos comenzó con posterioridad, y los primeros reportes del efecto del H₂S en los tejidos de mamífero comenzaron alrededor del año 2000.

I.2.2. Transmisores gaseosos.

I.2.2.1. Generalidades y características de los transmisores gaseosos.

El descubrimiento a finales del siglo XX de que el H₂S se genera enzimáticamente en tejidos de mamíferos derivó finalmente a la inclusión de este gas dentro de la familia de los transmisores gaseosos, en los primeros años de la década del 2000 (Wang, 2002; Wang, 2003). Esta familia ya se encontraba conformada por el óxido nítrico (NO) y el monóxido de carbono (CO), y la incorporación del H₂S amplió su campo de investigación, y dio origen su propia rama de estudio en cuanto a sus roles en biomedicina, farmacología, fisiología, etc. Tal es así, y tan nuevo es este campo, que recién en el año 2009 se realizó la primera conferencia internacional de H₂S, en Shangai, República Popular China.

Los transmisores gaseosos constituyen una familia de moléculas porque todas tienen una serie de características en común (Tabla I.2.2), más allá de compartir el derrotero de haber sido primero consideradas sustancias tóxicas, luego establecerse su síntesis

endógena a través de enzimas específicas y posteriormente atribuírseles roles fisiológicos específicos (Guiffre y Vicente, 2018).

Tabla I.2.2. Características generales de los transmisores gaseosos (Mustafa et al., 2009a; Pae et al., 2009; Kajimura et al., 2010).

Características generales de los transmisores gaseosos
Difunden libremente a través de las membranas biológicas
Se producen en el organismo, a partir de enzimas y sustratos específicos
No actúan a través las vías convencionales de transducción de señales, con receptores y segundos mensajeros clásicos
Tienen una señalización específica y blancos moleculares propios
Modulan una variedad de procesos fisiológicos/patológicos que tienen un rol relevante en una variedad de funciones biológicas

Cada uno de los tres mediadores gaseosos puede actuar como un agente vasodilatador, citoprotector y antiinflamatorio a concentraciones bajas, pero también pueden desencadenar efectos citotóxicos y nocivos en concentraciones altas (di Masi y Ascenzi, 2013; Szabo, 2016). Estos compuestos están involucrados en la regulación de la vasodilatación, el metabolismo energético, el equilibrio redox, la apoptosis, el ciclo celular, la reproducción, la función neuronal, el sistema inmune, y más (Szabo y Papapetropoulos, 2017; Guiffre y Vicente, 2018). Por este motivo, desregulaciones en el metabolismo y/o los niveles de H₂S, NO y CO están asociado con condiciones patológicas (di Masi y Ascenzi, 2013; Hua et al., 2013; Guiffre y Vicente, 2018).

Entre la variedad de efectos que se le atribuyen al H₂S, se pueden mencionar su participación en procesos a nivel cardiovascular (en la vasodilatación, uno de sus primeros efectos descriptos), en el sistema nervioso central, gastrointestinal, endócrino, de citoprotección, y otros (Kimura et al., 2005; Kimura et al., 2006; Szabo y Papapetropoulos, 2011; Yan et al., 2011; di Masi y Ascenzi, 2013; Parsanathan y Jain, 2019).

La Figura I.2.2 muestra esquemáticamente las “dos caras” del H₂S, con sus correspondientes efectos fisiológicos y patológicos.

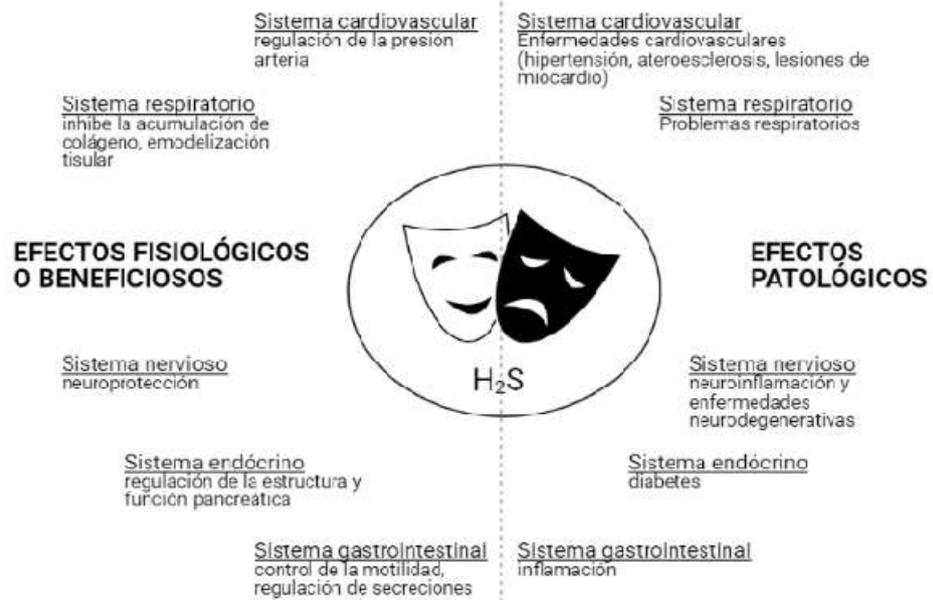


Figura I.2.2. Efectos duales del H₂S, traducida de di Masi y Ascenzi (2013).

I.2.2.2. Mecanismos de acción del H₂S y sus blancos moleculares.

Los mecanismos a través de los cuales el H₂S ejerce su efecto no son completamente conocidos aún. Sin embargo, existe suficiente consenso con respecto a 4 mecanismos de acción o blancos moleculares:

- Interacción con grupos hemo de hemoproteínas
- Persulfuración de tioles proteicos
- Efecto sobre canales iónicos
- Reacción directa con EROs y especies reactivas de nitrógeno.

I.2.2.2.1 Interacción con grupos hemo de hemoproteínas.

Mediante la interacción con grupos hemo (Figura I.2.3), el H₂S influye a nivel de regulación de las proteínas, modificando la actividad, su conformación, la interacción entre proteínas, su afinidad por sustratos en el caso de que sean enzimas, etc.

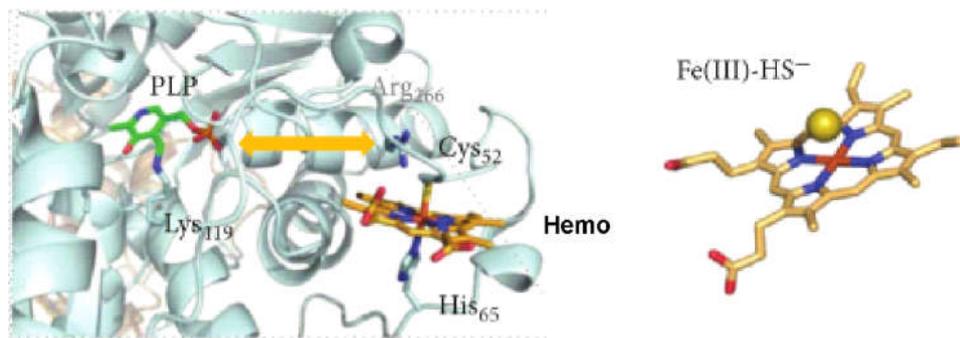


Figura I.2.3. Interacción de H₂S con un grupo hemo, formando, en este caso, un complejo sulfuro-hierro III. Tomado de Giufreè y Vicente (2018).

La probabilidad de que el H₂S reaccione con el hemo depende básicamente de las características particulares del grupo hemo en la molécula y del entorno aminoacídico en el cual se encuentra. Todo esto condiciona la química de la reacción, así como también la concentración de H₂S necesaria para que se produzca la misma (Mishanina et al., 2015).

Un ejemplo es la interacción entre H₂S y el grupo hemo de la citocromo C oxidasa, presente en la cadena de transporte de electrones mitocondrial. A bajas concentraciones de H₂S, el citocromo es reducido por el gas, lo que resulta en una donación de electrones a la cadena de transporte de electrones mitocondrial y la subsecuente generación de energía. Pero a concentraciones mayores, el H₂S se une covalentemente al cobre-hierro del hemo de la enzima, inhibiendo la respiración celular, lo que produce un efecto tóxico en la célula (Mishanina et al., 2015; Murphy et al., 2019).

I.2.2.2. Persulfuración de tioles proteicos.

La persulfuración, también llamada sulfhidratación (Figura I.2.4) es una modificación postraduccional o cotraduccional, en la que el H₂S reduce los tioles oxidados de las cisteínas (Mustafa et al., 2009b; Paul y Snyder 2015). De esa manera, puede modular la actividad de proteínas blanco. Según Mustafa (2009b), entre el 10 y el 25% de las proteínas hepáticas sufren persulfuración.

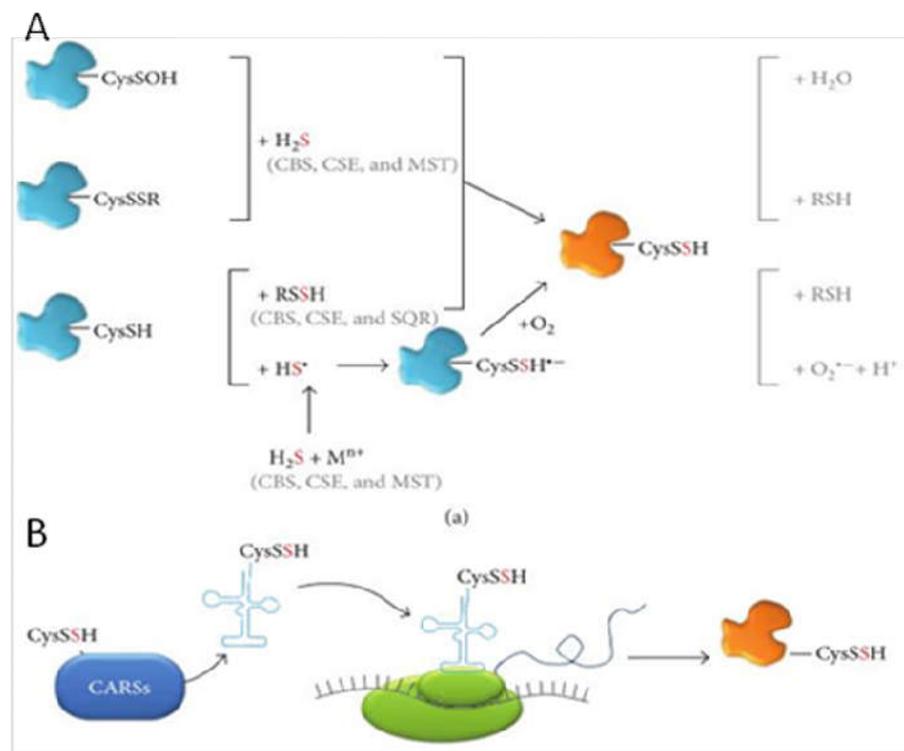


Figura I.2.4. Persulfuración de proteínas. Puede darse tanto en A) la proteína conformada (postraduccionalmente) como en B) la proteína a medida que se traduce (cotraduccionalmente). Tomado de Giufreè y Vicente (2018).

En este sentido, existen al menos dos publicaciones que postulan que el H₂S puede reaccionar con las proteínas, ocasionando modificaciones en puentes disulfuro dentro de la proteína blanco, alterando así su función. (Zhu, 2013; Hourihan et al., 2013). A pesar de que se propone como un mecanismo alternativo a la persulfuración, ya que el énfasis está puesto en la presencia o ausencia de los puentes disulfuro, también

involucra la actividad del H₂S sobre los residuos cisteínicos y la formación de persulfuros en las proteínas blanco.

I.2.2.2.3. Efecto sobre canales iónicos.

Existen abundantes reportes acerca del efecto del H₂S sobre canales iónicos. Por ejemplo, el H₂S abre canales de potasio dependientes de ATP (Zhao et al., 2001; Streeter et al., 2012), modula varios tipos de canales de calcio (Sun et al., 2008; Pan et al., 2008; Tian et al., 2012) y de cloro (Shefa et al., 2018).

Los canales iónicos son proteínas que forman poros en las membranas de las células y organelas, teniendo la función de regular el flujo de iones a través de ellas. El H₂S puede actuar directamente sobre los canales, o indirectamente. Los canales de potasio dependientes de ATP (K⁺_{ATP}) son los más estudiados en cuanto a su interacción con el H₂S.

Los K⁺_{ATP} son un hétero octámero formado por 4 subunidades que dan lugar al poro, las Kir6.x, y cuatro subunidades regulatorias, las SURx, y su actividad es inhibida por la unión a ATP (Tang et al., 2010). Según Mustafa et al. (2011), la cisteína 43 de la subunidad Kir6.1 es el blanco de persulfuración del H₂S. Describen los autores que la interacción del gas con la proteína se vio acompañada de una menor unión de ATP y una mayor unión de fosfatidil inositol difosfato, por lo que sugieren que el efecto de la interacción con H₂S disminuye la afinidad de la proteína por el ATP, activando en consecuencia al canal. Otros autores (Tang et al., 2010), mostraron con experimentos de mutagénesis dirigida que el efecto del H₂S solo se observaba cuando estaban presentes las 2 subunidades, Kir6.1 y rvSUR₁, pero no con Kir6.1 sola. También identificaron residuos de cisteína en la subunidad regulatoria, la cisteína 6 y la cisteína 26, necesarios para el efecto.

No está identificado si dichas cisteínas forman puentes disulfuros dentro de la misma subunidad o entre las subunidades rvSUR₁ y la Kir6.1, pero lo cierto es que el H₂S es

capaz de regular el funcionamiento de los canales K^+_{ATP} de manera directa (Tang et al., 2010; Mustafa et al., 2011).

Se ha observado que los efectos cardio-protectores del H_2S desaparecen parcialmente cuando los canales K^+_{ATP} se bloquean químicamente (Sivarajah et al., 2006).

I.2.2.2.4. Reacción directa con EROs y ERNs.

El H_2S y en particular el HS^- pueden actuar directamente sobre especies oxidantes como EROs y especies reactivas de nitrógeno (ERNs) o radicales libres, y neutralizarlos. Esto es teóricamente posible y está de hecho demostrado en laboratorio para diferentes especies. Es así que Murphy et al. (2019), presentan al H_2S como un potente antioxidante contra EROs y ERNs, que resulta contra el $(O_2^{\bullet-})^-$, por ejemplo, más efectivo que el GSH, aunque también remarcan la abismal diferencia de concentraciones intracelulares entre ambas moléculas (1-10 mM el GSH (Uhlig y Wendel 1992; Ballatori et al., 2009); del orden de μM en H_2S , dependiendo del tejido y del contexto metabólico (Giufreè y Vicente, 2018)). De todas maneras, algunas propiedades del H_2S como su pequeño tamaño o su capacidad de difundir a través de membranas biológicas podrían compensar, aunque sea en parte, esa diferencia de concentraciones y hacer que su efecto sí sea relevante a nivel fisiológico.

Por otro lado, Carballal et al. (2011) estudiaron la cinética de reacción de H_2S frente a algunas moléculas oxidantes de interés biológico como peroxinitrito ($ONOO^-$), dióxido de nitrógeno (NO_2), H_2O_2 e hipoclorito (ClO^-). A pesar de haber encontrado que el H_2S es en efecto capaz de reaccionar con dichas moléculas, los autores sostienen que la relevancia de estos procesos en el ambiente fisiológico sería baja teniendo en cuenta las concentraciones relativas y las constantes químicas de reacción del H_2S con los oxidantes que evaluaron en su trabajo.

No obstante, los efectos antioxidantes evocados por el H₂S están relacionados no sólo a la reacción directa de H₂S con especies oxidantes, sino también con una amplia regulación del estado redox celular, como se describirá más adelante.

I.2.3. Interacciones entre los trasmisores gaseosos.

Como se mencionó anteriormente, los tres trasmisores gaseosos, H₂S, NO y CO, tienen múltiples efectos sobre el organismo, muchos de ellos en forma solapada. Sin embargo, no se puede decir que actúan solos, como entidades independientes, dado que tienen efecto pleiotrópicos y muchos blancos moleculares en común. Pueden actuar de manera cooperativa o contraria en el efecto que evocan. Además, cada uno es capaz de modular la síntesis de los otros, lo que le otorga una complejidad adicional al estudio e interpretación de sus efectos (Giuffrè y Vicente, 2018). La Figura I.2.5 muestra esquemáticamente algunos de los efectos que podrían tener estos gases sobre la síntesis de los otros.

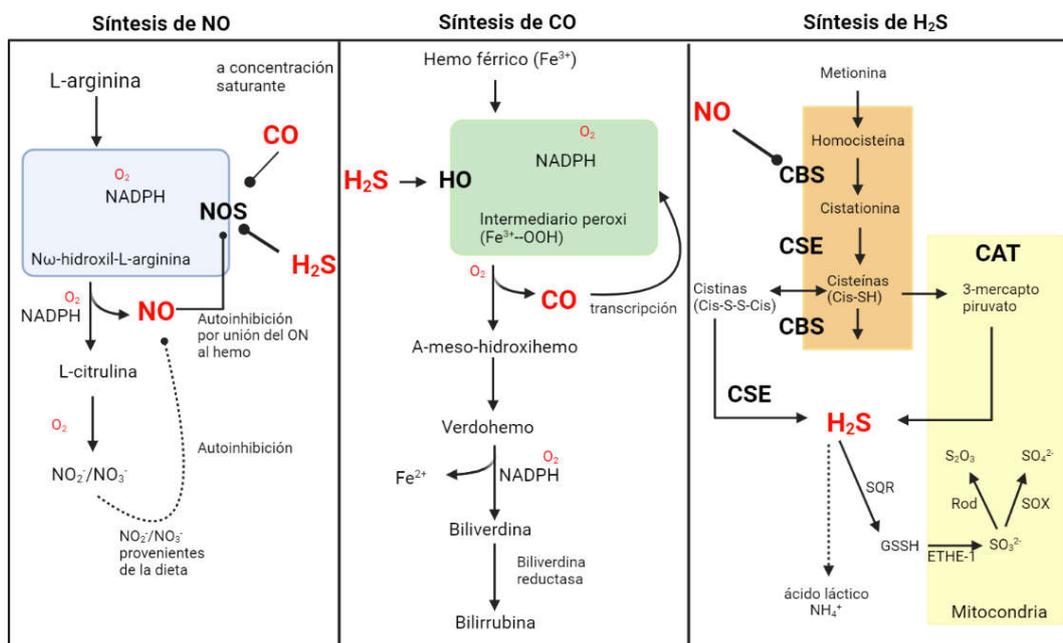


Figura I.2.5. Síntesis de H₂S, NO y CO y las posibles interacciones de cada gas con la síntesis de los otros. SQR: sulfuro quinona oxidoreductasa; ETHE-1: persulfuro dioxigenasa; Rod: rodanasa; SOX: sulfito oxidasa. Traducido de Lee et al. (2018).

Estos gases interactúan, por ejemplo de los siguientes modos:

- Con efectos que complementen el efecto del otro (Cirino et al., 2017).
- Compitiendo por los mismos sitios blanco, como en el caso de algunos de los tioles de las cisteínas presente en las proteínas que pueden modificarse por acción del NO a S-nitrosotioles (RSNO) por S-nitrosilación y por acción del H₂S a persulfuros (RSSH) por S-persulfuración (Hara et al., 2005).
- Compitiendo con sitios de unión, como por ejemplo con el grupo hemo de la hemoglobina, lo que genera que baje su biodisponibilidad (Giuffrè y Vicente, 2018).
- Reaccionando directamente, por ejemplo la combinación de H₂S y RSNO para formar nitroxilo. Está probado que este compuesto puede mediar ciertos efectos atribuidos al NO (Sáenz et al., 2007; Fukuto et al., 2012; Olson, 2012; Nagpure y Bian, 2016).

Un ejemplo de estas interacciones se da en el cerebro. En este órgano, la principal enzima que produce H₂S es la cistationina β-sintasa (CBS), presente en los astrocitos de la glía. El CO, que es producido de manera constitutiva por la enzima hemooxigenasa 2 (HO-2) a partir de oxígeno molecular, se une reversiblemente al grupo hemo de la CBS, inhibiéndola. En condiciones de hipoxia, disminuye la actividad de HO-2, y consecuentemente la producción de CO. El grupo hemo de la CBS no une CO, y la enzima se vuelve activa, aumentando la producción de H₂S y la consecuente vasodilatación arterial (Morikawa et al., 2012).

Otro ejemplo es el efecto cooperativo en el endotelio vascular. En este tejido, el NO y el H₂S interactúan para generar el efecto de la vasorelajación. El NO actúa sobre la enzima guanilato ciclasa soluble, activándola y aumentando así la producción de GMPc, que señala el proceso. A su vez, el H₂S inhibe la enzima fosfodiesterasa, cuya función es la de inactivar los nucleótidos cíclicos. De esta manera, el NO aumenta la producción de GMPc, y el H₂S inhibe su hidrólisis, provocando así que sus niveles se mantengan altos (Cirino et al., 2017).

I.2.4. Fuentes de H₂S.

I.2.4.1. Fuentes ambientales.

La presencia del H₂S puede deberse a su generación ambiental, o a su producción metabólica en seres vivos. Las fuentes ambientales no antrópicas de H₂S son los pantanos, las erupciones y emisiones volcánicas, la actividad geotérmica, los afloramientos termales (Figura I.2.6) y las bacterias metabolizadoras de sulfuros. Además, las emisiones industriales (papeleras, curtiembres, minería, refinerías de petróleo) y las combustiones, los vertederos cloacales y alcantarillas, constituyen fuentes ambientales antrópicas de H₂S.

En la mayoría de los países del mundo, la presencia de H₂S en el aire no es percibida como un problema. Sin embargo, en algunas regiones existen regulaciones sobre la calidad del aire en relación a la cantidad de H₂S permitido, y sus niveles están legislados, como por ejemplo en Nueva Zelanda, y en algunos estados de EEUU como Hawaii y California (IVHHN).



Figura I.2.6. Foto del Río Agrío, en la Provincia de Neuquén, Argentina (en las proximidades de las termas y el Volcán Copahue). Las piedras del río están coloreadas de naranja debido a la alta concentración de minerales y óxidos, entre ellos azufre, presentes en el agua. Se llama Agrío porque el agua tiene un sabor agrío, como levemente alimonado.

En Japón y Nueva Zelanda, a lo largo del siglo XX, se registraron 46 muertes causadas por envenenamiento con H_2S , realizando actividades como mantenimiento de drenajes, baños en un spa, cavando un pozo de una letrina, esquiando, realizando caminatas (IVHHN).

En cuanto a la producción en organismos vivos, H_2S se encuentra en todos los “reinos clásicos” como arqueas, bacterias, hongos, plantas y animales, y sus roles son diversos. Está postulado que el metabolismo del H_2S estuvo asociado a la producción de energía durante el origen y gran parte del desarrollo de la vida, tiempos en que el oxígeno no era para nada abundante y ubicuo como lo es en la actualidad (Olson y Straub, 2015; Yamasaki y Cohen, 2016).

I.2.4.2. Fuentes endógenas de H₂S en humanos.

En las personas, hay al menos dos fuentes de generación de H₂S: la síntesis enzimática en los tejidos, y el metabolismo de las bacterias del tracto digestivo (Szabo, 2016). Está postulado también que los eritrocitos son capaces de reducir azufre elemental a HS⁻ de manera no enzimática (Searcy y Lee, 1998).

Con respecto a la producción enzimática del gas, se da principalmente a partir del aminoácido L-cisteína, por acción de al menos tres enzimas: la cistationina β-sintasa (CBS), la cistationina γ-liasa (CSE), y la acción combinada de las enzimas cisteína aminotransferasa y la 3-mercaptopiruvato sulfotransferasa (CAT/3MST) (Motl et al., 2013).

Algunas de estas enzimas son capaces de producir H₂S a partir de otros sustratos como la L-homocisteína. La Figura I.2.7 muestra la síntesis H₂S mediante un esquema. Recientemente se ha descrito una vía de síntesis a partir de la D-cisteína, que por acción de la enzima D-aminoácido oxidasa (DAO) produce 3-mercaptopiruvato, que sirve como sustrato a la 3MST. Esta vía, que se ha encontrado presente solo en riñón y cerebelo, es aproximadamente 80 veces más eficiente que la CAT/3MST en la producción de H₂S en estos tejidos (Motl et al., 2013).

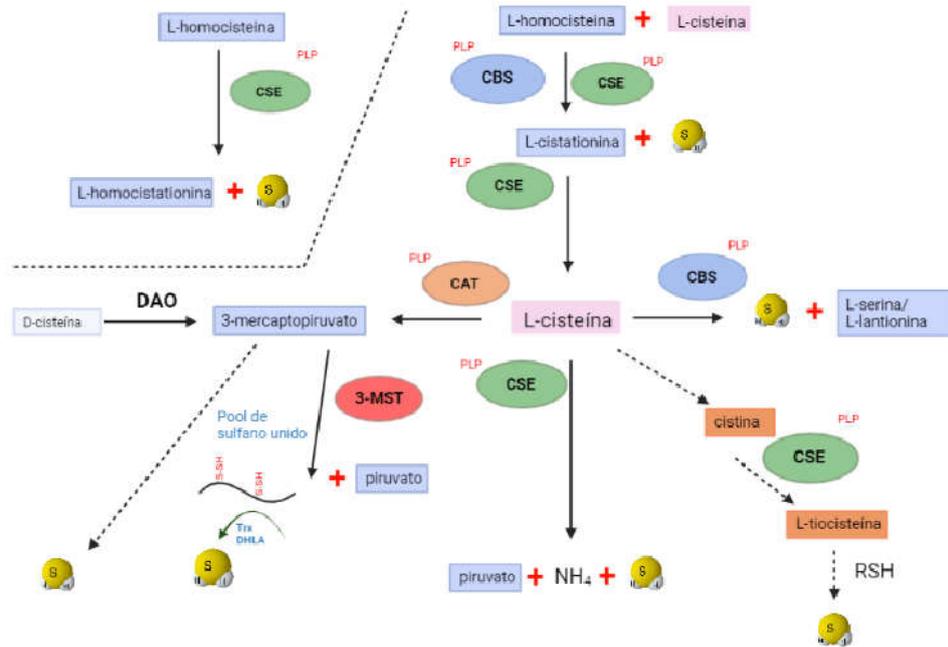


Figura I.2.7. Esquema de la síntesis enzimática de H₂S en humanos. Las enzimas CBS y CSE pueden producir H₂S a partir de L-homocisteína, L-cisteína y L-cistationina. La CSE puede además usar L-homocistationina y L-cistina como sustratos para generar H₂S. Por otro lado, las enzimas CAT/3MST producen H₂S a partir de L-cisteína. Finalmente, el 3-mercaptopiruvato puede producir H₂S de manera espontánea. Traducida de Szabo y Papapetropoulos (2017).

Con respecto a la síntesis microbiana de H₂S, se obtiene de la metabolización de compuestos azufrados por las bacterias de la microbiota intestinal (Szabo, 2016). Esto tiene como consecuencia que los órganos del tracto digestivo, principalmente el epitelio intestinal, esté expuesto a altas concentraciones del gas (Magee et al., 2000; Levitt et al., 2002). Sin embargo, la cantidad de H₂S producida por la microbiota es variable y puede estar relacionada con la dieta y la clase de microbiota presente en el intestino (Yao et al., 2018).

I.2.5. Dadores de H₂S.

Para el estudio del efecto del H₂S existen varios tipos de dadores, que son compuestos capaces de liberar H₂S con diferentes cinéticas. Los primeros compuestos, y aún los más utilizados, son las sales inorgánicas, como el sulfuro ácido de sodio (NaHS) y el sulfuro de sodio (Na₂S). Estas sales son muy solubles en agua y al disolverse liberan una gran cantidad de H₂S rápidamente, y por eso es que se denominan dadores rápidos (*fast releasing donors*). Más recientemente se han desarrollado dadores lentos (*slow releasing donors*), que van liberando paulatinamente cantidades pequeñas de H₂S. Estos suelen ser compuestos orgánicos, y su efecto se parecería más a una situación fisiológica, en la que se libera el gas a una tasa baja pero constante (Fox et al., 2012). Uno de los dadores lentos más utilizados es el GYY4137 (Li et al., 2008). Además, se están explorando dadores basados en estructuras peptídicas capaces de liberar H₂S de manera más controlada (Ali et al., 2019). La principal desventaja de los dadores lentos es su alto costo, razón por la cual la mayoría de los estudios se realizan utilizando sales inorgánicas como dadores de H₂S.

En la actualidad se ha informado el efecto de varios dadores capaces de liberar H₂S en diversas condiciones (dadores dependientes de hidrólisis, dependientes de pH, de la luz, etc.) y dirigidos a compartimientos específicos de la célula (Powell et al., 2018, Levinn et al., 2020). Pero lamentablemente estos compuestos están en etapa de desarrollo, y no están disponibles comercialmente aún.

Existen muchos medicamentos aprobados y utilizados que contienen grupos/residuos azufrados. Por ejemplo, varios antihipertensivos (captopril, zofenopril, remikiren), sildenafil, disulfiram (usado para tratamiento de alcoholismo), cimetidina (usado para tratamiento de úlcera gástrica), antineoplásicos como enzalutamida y apalatumida (utilizados para tratamiento de cáncer de próstata). Se ha planteado que parte del efecto de estos compuestos tiene que ver con su capacidad para liberar H₂S (Zaorska et al., 2020).

Esto abrió la posibilidad de sintetizar derivados de medicamentos que además sean capaces de liberar H₂S, como una estrategia para mejorar sus efectos o para reducir los efectos adversos de los tratamientos (aprovechando la citoprotección generada por el H₂S). Por ejemplo, un derivado de la aspirina que libera H₂S fue efectivo para proteger la mucosa del estómago contra los daños gástricos de la aspirina común en ratas (Sparatore et al., 2009). Un derivado de diclofenac mostró mayor efecto antiinflamatorio que diclofenac en varios modelos (Sulaieva y Wallace 2015). Otro ejemplo fue la síntesis de derivados de Levodopa, utilizado para el tratamiento de Parkinson (Lee et al., 2010).

En varios alimentos que forman parte de nuestra dieta existen compuestos sulfurados que poseen capacidad de liberar o generar H₂S, lo que podría asociar el efecto de este gas con los conocidos beneficios para la salud que poseen. Los ejemplos más conocidos son los derivados del ajo dialil sulfuro, dialil disulfuro y dialil trisulfuro (DAS, DADS y DATS), capaces de liberar H₂S en presencia de GSH. Se ha propuesto que la acción benéfica del ajo sobre el sistema cardiovascular es causado por la liberación de H₂S a partir de estos compuestos (Benavides et al., 2007). En el ajo, además, están presentes la S-alil-L-cisteína, S-propil-L-cisteína, S-propargil-L-cisteína, y más, todos compuestos azufrados.

Otros compuestos naturales azufrados son los isotiocianatos (o sulforafanos), presentes en los coles como brócoli y coliflor, y la erucina, presente en semillas y hojas de rúcula.

I.2.6. Efectos del H₂S sobre las defensas antioxidantes celulares.

Un conocido camino por el cual el H₂S regula el estado redox celular es a través de la liberación del factor de transcripción Nrf2. Dicho factor se encuentra típicamente unido a la proteína citosólica KEAP-1, que lo reprime y la señala para ubiquitinación y proteólisis en el citoplasma. Cuando el H₂S interactúa con KEAP-1, Nrf2 es liberado y puede traslocar al núcleo, donde promueve la transcripción de genes relacionados con

la acción antioxidante, como el que codifica para la unidad catalítica de la γ -glutamilcisteína sintetasa, glutatión S-transferasa, transportadores de cisteína X_{A,G}- y tioredoxinas (Kaspar et al., 2009; Xie et al., 2016).

Otros genes activados por el H₂S vía Nrf2 son el de hemooxigenasa-1, glutatión peroxidasa 2, NAD(P)H: quinona oxidoreductasa 1, CBS y CSE (al menos en ratón) y la sulfuro:quinona reductasa (Calvert et al., 2009; Hourihan et al., 2013; Xie et al., 2016). Notablemente, entre los genes que controlan Nrf2 están algunos de los relacionados con la producción y el catabolismo de H₂S.

Se ha reportado incremento en la actividad de enzimas antioxidantes tales como catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa (Sun et al., 2012; Deng et al., 2014), y el aumento de la actividad o expresión de dichas enzimas está publicado en modelos *in vitro* (Gross-Amat et al., 2020) e *in vivo* (Liu et al., 2012; Du et al., 2013), producto de la administración de H₂S, como se muestra en el esquema de la Figura 1.2.8.

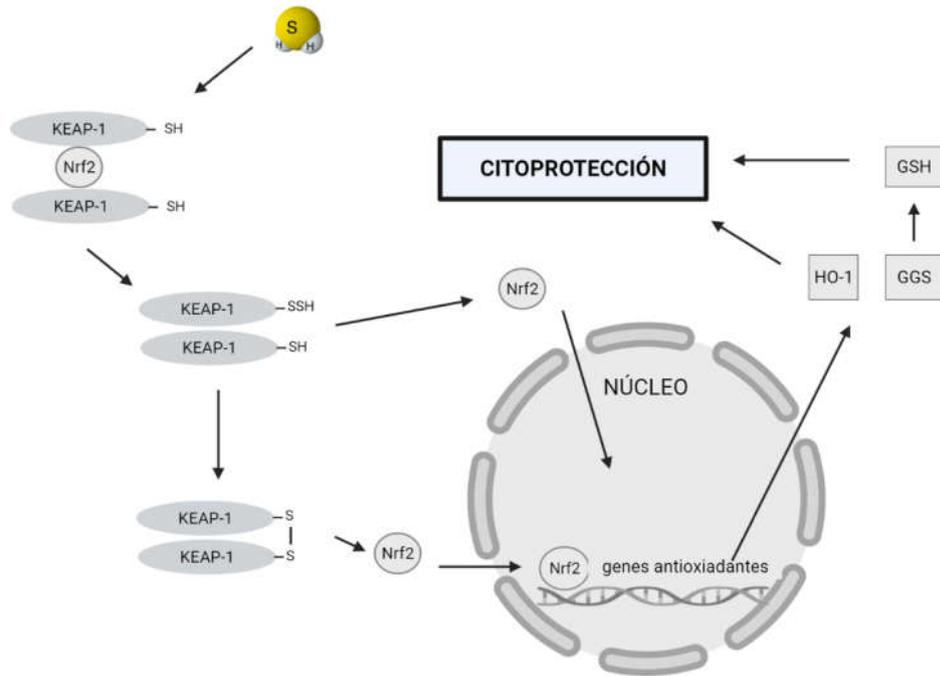


Figura I.2.8. Mecanismo a través del cual el H₂S estimula la síntesis de una variedad de genes antioxidantes. HO-1: Hemo-oxigenasa 1; GGS: γ - glutamilcisteína sintetasa; GSH: glutati3n. Adaptada y traducida de Kimura (2015).

Se ha demostrado que el H₂S estimula la conversi3n de metionina a cisteína, necesaria para la síntesis de GSH (el cual se sintetiza a partir de L-cisteína, glicina y ácido glutámico, Figura I.2.9). Esta conversi3n se da a través del camino de transulfuraci3n, del cual participan las enzimas que generan H₂S, CSE y CBS. La L-cisteína es utilizada por las enzimas γ -glutamylcisteína sintetasa y GSH sintetasa, para formar la molécula de GSH. Otra vía por la cual el H₂S estimula la síntesis de GSH es aumentando la concentraci3n intracelular de cisteína, elevando por un lado la actividad del transportador Xc⁻ que contransporta cistina/glutamato (la cistina ingresa y se reduce a dos cisteínas dentro de la célula), y por el otro la actividad del transportador uniportador de cisteína X_{A,G}⁻ (Kimura, 2015). Como ya se mencionó, el H₂S aumenta la expresi3n de la subunidad catalítica de la γ -glutamylcisteína sintetasa, que es la enzima limitante de velocidad de producci3n del GSH.

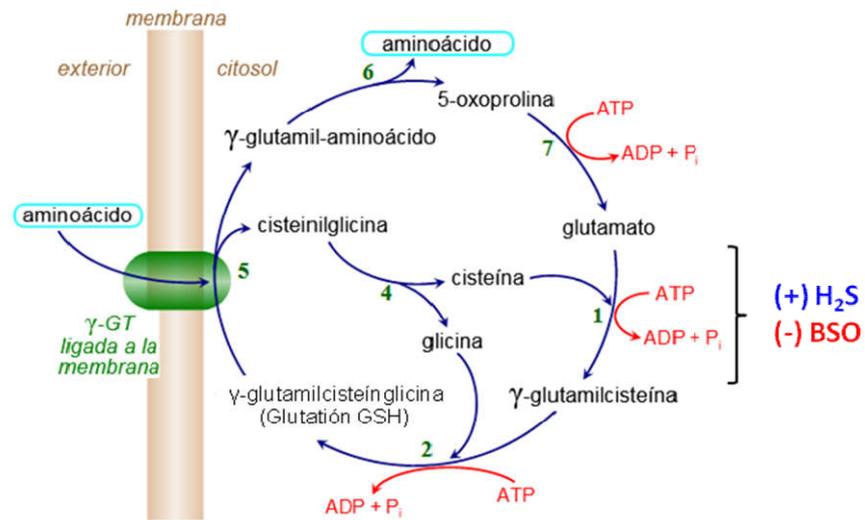


Figura I.2.9. Síntesis de GSH a partir de los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina por el ciclo del γ -glutamilo. Enzimas involucradas: 1) γ -glutamilcisteína sintetasa; 2) glutati6n sintetasa; 3) glutati6n hidrolasa; 4) cisteínglicina dipeptidasa; 5) γ -glutamiltranferasa o γ -glutamiltranseptidasa (γ -GT); 6) γ -glutamilciclotransferasa y 7) 5-oxoprolinasao piroglutamato hidrolasa. La imagen fue tomada de <http://biomodel.uah.es/metab/nitro/glutation.htm>.

Por otro lado, se ha demostrado en 6rganos como cerebro, ri6n, h6gado, intestino y coraz6n, que la exposici6n previa al H_2S tiene un efecto protector frente a modelos de da6o asociado a isquemia/reperfusi6n. La exposici6n previa de estos 6rganos a H_2S previene gran parte de los da6os funcionales y estructurales derivados de la intervenci6n, y favorece la recuperaci6n del tejido posterior a la reperfusi6n (Elrod et al., 2007; Florian et al., 2008; Henderson et al., 2010; Bos et al., 2012; Bos et al., 2013).

Est6 reportado que la exposici6n a H_2S provoca un aumento de los niveles de glutati6n (GSH) tanto en 6rganos como en cultivos celulares (Parsanathan y Jain, 2019). En estudios donde se produce un da6o oxidativo, el tratamiento previo con el dador r6pido de sulfuro de hidr6geno, NaHS, logr6 prevenir el da6o oxidativo y la apoptosis provocada por el H_2O_2 (Wen et al., 2013; Feng et al., 2018), el da6o oxidativo generado por la gentamicina en cultivos celulares (Dong et al., 2015); y la respuesta inflamatoria luego del est6mulo con LPS bacteriano utilizando el dador lento GYY4137 (Fox et al., 2012).

Se ha descrito el efecto protector y antioxidante del H₂S en plantas (Khan et al., 2017; Kaya et al., 2018; Li et al., 2020), y en bacterias, en las cuales se ha propuesto que su síntesis puede estar mediando la resistencia a antibióticos (Shatalin et al., 2011). La Figura I.2.10 muestra esquemáticamente algunos de los efectos antioxidantes evocados por el H₂S.

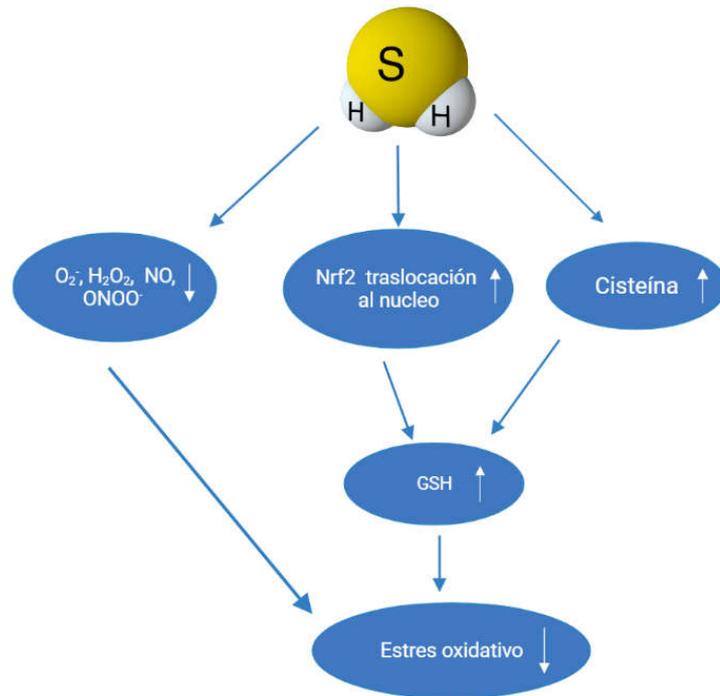


Figura I.2.10. Efectos antioxidantes provocados por el H₂S. Adaptado y traducido de Xiao et al. (2018).

El efecto del H₂S sobre la citoprotección ha sido uno de los más estudiados. Un trabajo que suscitó mucha atención y discrepancia fue el de Blackstone et al., (2005), quienes propusieron que el H₂S era capaz de inducir un estado similar al de la hibernación en animales que no hibernan, como el ratón común. En sus experimentos, expusieron a ratones a C57BL/6J a un pre-condicionamiento de 20 minutos con 150 ppm de H₂S, y luego a un ambiente de hipoxia con 5% de oxígeno. Sin el pre-condicionamiento, los ratones morían al cabo de 15 minutos, pero, tras recibirlo, lograban sobrevivir durante

todo el experimento, sin daños conductuales ni neurológicos aparentes. Los autores reportan que lo máximo que un ratón sobrevivió a las condiciones de hipoxia luego de haber sido expuesto al H₂S fue de 6,5 horas. Además, reportaron que luego de un precondicionamiento de 15 minutos con H₂S seguido de una exposición de 60 minutos a 5% de oxígeno, todos los ratones sobrevivieron durante 3,5 horas a un ambiente de 3% de oxígeno, sin secuelas posteriores.

Esos resultados no pudieron ser replicados en mamíferos más grandes como ovejas (Haouzi et al., 2008) o cerdos (Dirkes et al., 2015), y en una publicación reciente, Hemelrijk et al., (2018) sostienen que el efecto reportado por Blackstone et al. (2005) no es debido al H₂S sino a la hipoxia a la que se somete a los ratones.

No obstante esto, el trabajo de Blackstone et al. (2005) fue pionero en proponer el uso de H₂S en medicina, y despertó el interés por la investigación de los efectos de H₂S en ese sentido.

I.2.7. H₂S en cáncer.

Está reportado que varios tipos de cáncer como los de colon, mama, ovario y próstata tienen mayores niveles de las enzimas CBS, CSE o 3MST, o sintetizan mayor cantidad del H₂S comparado con el tejido no tumoral adyacente. (Hellmich y Szabo, 2015; Szabo, 2016).

Los efectos ya mencionados, evocados por el H₂S, ocurren también en el tejido tumoral, y algunos de los efectos benéficos del H₂S sirven de sustento para su manutención y supervivencia en condiciones que suelen ser adversas (Szabo, 2016).

Por citar un ejemplo, en palabras de Hellmich et al. (2015): “dado que el H₂S ejerce un efecto protector/antioxidante en las mitocondrias, especulamos que este efecto puede ser especialmente relevante en las células tumorales, que frecuentemente contienen mitocondrias parcialmente desacopladas”.

Sin embargo, también se ha descrito que en gliomas, la producción de H₂S está disminuida, y que en lugar de estimular la proliferación celular, el H₂S la inhibe en estos tumores (Hellmich y Szabo, 2015; Zhu et al., 2018).

Entre los efectos pro tumorales que se le asignan al H₂S, están reportados el de mantener el ciclo celular y la proliferación (Baskar et al., 2011); el de ser citoprotector y antioxidante (Bhattacharyya et al., 2013); el de regular la respuesta inmune del organismo (Sen et al., 2015); el de estimular enzimas glucolíticas (Mustafa et al., 2009b); la producción de energía en la cadena respiratoria (Szabo et al., 2013); y el de promover la angiogénesis (Hellmich et al., 2015).

Se han propuesto estrategias para tratar a los tumores a partir de la modulación de su producción endógena de H₂S. Por ejemplo, se ha visto que disminuyendo la producción de H₂S con inhibidores bioquímicos de la CBS o con ARN de interferencia para el mensajero de CBS, se inhibe el crecimiento de algunos tumores como los de ovario y colon, mientras que su sobreexpresión promueve la proliferación (Hellmich et al., 2015).

La estrategia inversa también fue ensayada. Por ejemplo, Módis et al. (2014) estudiaron el efecto del modulador alostérico positivo de la CBS, la S-adenosil metionina (SAM) en líneas celulares tumorales y no tumorales de colon. Encontraron que el uso de SAM estimula la proliferación tumoral hasta una cierta dosis, a partir de la cual empieza a inhibir el crecimiento del tumor. Al silenciar la enzima CBS por medio de ARN de interferencia, el efecto estimulador de SAM se perdía, pero no así el efecto tóxico de la exposición a altas concentraciones. Los autores concluyen entonces que la toxicidad ejercida por SAM no está relacionada con la sobreproducción de H₂S en la CBS, sino con un efecto independiente. Por esta razón, descartaron el uso de SAM como un posible agente que estimule el efecto tóxico de H₂S en tumores.

No obstante, el efecto tóxico del H₂S sobre el crecimiento tumoral efectivamente se observa *in vivo* al administrar dadores de H₂S directamente (Szabo, 2016). Además de los dadores sintéticos, algunos dadores naturales (presentes en alimentos como el ajo,

por ejemplo) mostraron efecto antitumoral *in vivo*. Es el caso de los DAS, DADS y DATS, que liberan H₂S en las células en presencia de GSH (Szabo, 2016).

Sumado a lo anterior, el crecimiento tumoral logró disminuirse aún más al combinar la inhibición de la CBS con tratamiento quimioterapéutico en tumores de ovario y de colon (Bhattacharyya et al., 2013; Chao et al., 2014).

Esta aparente contradicción en los efectos pro y anti tumorales ejercidos por el H₂S, se basan en el hecho de que la respuesta de los organismos a los transmisores gaseosos es una respuesta bifásica: generalmente a dosis bajas o “fisiológicas” se dan efectos beneficiosos, mientras que a dosis altas o “supra fisiológicas” se dan efectos tóxicos (di Masi y Ascenzi, 2013).

Entonces, inhibir la producción de H₂S en los tumores, los debilita y vuelve susceptibles al sistema inmune propio del organismo o a la toxicidad de otro tratamiento (por ejemplo, al daño oxidativo provocado por algunos fármacos antineoplásicos) (Chao et al., 2014, Hellmich et al., 2015). Por otro lado, aumentar los niveles tumorales de H₂S por sobre el umbral fisiológico resulta tóxico para las células, y también es efectivo a la hora de reducir el tamaño y la proliferación tumoral (Szabo, 2016).

Ambas estrategias han mostrado ser efectivas para disminuir el crecimiento tumoral en modelos *in vitro* e *in vivo*, (Hellmich et al., 2015; Szabo, 2016; Zhu et al., 2018).

Además de aumentar la defensa antioxidante, el H₂S está relacionado con la resistencia a drogas en los tumores, por promover la vía de señalización STAT3/Akt/Bcl-2 de supervivencia celular, y por aumentar la expresión de la proteína ABCB1 o glicoproteína P1, una proteína de membrana cuya función es la de expulsar xenobióticos de la célula (Wang et al., 2018). Este es otro de los efectos del H₂S que promueve la supervivencia tumoral.

Si se hiciera un recorrido histórico en la relación entre cáncer y metabolismo del H₂S, las primeras asociaciones las encontraríamos en los años 60, cuando se encontró que un gran número de personas con hepatoblastoma y neuroblastoma presentaban niveles altos de cistationuria (cistationina en orina), hecho que normalmente no ocurre (Gjessing, 1963; Geiser y Efron, 1968; Voûte y Wadman, 1968). Algunos de estos autores observaron que la cistationuria desaparecía cuando se controlaba el crecimiento tumoral, y reaparecía con las recurrencias, y este fenómeno lo relacionaron con una baja actividad de la cistationasa (actualmente denominada CSE) (Geiser y Efron, 1968; Geiser y Shih, 1980).

La principal explicación que estos artículos proponen es que en estos tumores hay una actividad normal o aumentada de la CBS (que produce cistationina), y una actividad disminuida o ausente de la CSE (que la cataboliza) (Figura I.2.7). Esto produciría la eliminación de cistationina a través de la orina por filtrado (*leakage*).

Metabolitos de metionina, entre ellos la cistationina, se han detectado en suero de pacientes con cáncer de próstata (Stabler et al., 2011). Si bien su presencia constituye un factor de riesgo de recurrencia y malignidad, no se puede establecer como biomarcador de la enfermedad, ya que no se ha podido asociar con el grado de avance del tumor.

Adicionalmente, como se indica en la Figura I.2.7, el primer paso en el metabolismo de L-homocisteína es la condensación con L-serina por la CBS, formando cistationina (Fowler, 2005). Una deficiencia en dicha enzima es la causa más común del aumento de homocistinemia y homocistinuria (Kim et al., 2018). Una deficiencia severa de vitamina B6 (fosfato de piridoxal) también puede llevar a una acumulación de homocisteína por mal funcionamiento de la CBS (Kim et al., 2018). Algunos tipos de cáncer pueden causar hiperhomocistinemia, pero esto no es necesariamente debido a una deficiencia en la CBS (Naushad et al., 2014).

Han habido intentos por encontrar biomarcadores de sobreproducción de H₂S que luego se puedan asociar con cáncer y otras enfermedades, como por ejemplo los

niveles en sangre y orina de H₂S o tiosulfato (S₂O₃²⁻), uno de los productos de su catabolismo (Toombs et al., 2010; Hellmich y Szabo, 2015), o los niveles de homocistinemia (Wu y Wu, 2002). Sin embargo, hasta el momento no se ha podido establecer una correlación contundente que posicione a esas moléculas como biomarcadores tumorales, ya sea porque no hay métodos del todo confiables y reproducibles para medirlas, tal como fue cuestionada la metodología para los niveles de H₂S (Zhu et al., 2018), o porque no logra discriminar la malignidad ni el grado de avance tumoral, y en ese sentido no aporta un beneficio superior a los métodos actuales, como ocurre con los niveles de S₂O₃²⁻ (Jung y Stephan, 2013).

I.2.8. H₂S en TFD.

Ferguson et al. (2014) presentaron una comunicación indicando que un dador de H₂S dirigido a la mitocondria hace más efectiva la TFD utilizando metil-ALA para el tratamiento de células cancerosas de piel.

Este es el único registro reportado hasta la fecha del efecto del H₂S en el contexto de la TFD aplicada a tumores. Por todo lo expuesto hasta aquí, resulta sumamente relevante conocer esos posibles efectos para diseñar estrategias de aplicación de la TFD o tratamientos combinados, a fin de mejorar la eficiencia de la misma.

II. Hipótesis y objetivos.

II.1. Hipótesis.

La TFD actúa generando especies altamente oxidantes en las células tratadas. Esto hace que el poder oxidante que se genera, compita con las defensas antioxidantes celulares. Está reportado que el sulfuro de hidrógeno promueve la defensa antioxidante en células y tejidos, pero no hay bibliografía respecto al efecto del H₂S en el contexto de la TFD.

La hipótesis principal que guía este trabajo es que el H₂S modula la respuesta de las células a la TFD basada en ALA.

La importancia de este trabajo radica en conocer dicho efecto, y poder utilizar esa información para mejorar la eficacia del tratamiento fotodinámico del cáncer.

II.2. Objetivos.

II.2.1. Objetivo general.

El objetivo de esta tesis fue estudiar el efecto del H₂S en el contexto de la TFD, utilizando como modelo principal dos líneas celulares de adenocarcinoma mamario murino, LM2 y LM3, y utilizando el dador inorgánico sulfuro ácido de sodio (NaHS) como fuente exógena de H₂S.

II.2.2. Objetivos específicos.

Los objetivos específicos fueron estudiar los siguientes aspectos:

- El efecto del H₂S sobre la respuesta a la ALA-TFD en cultivos celulares.
- El efecto del H₂S sobre diferentes parámetros asociados a daño oxidativo luego de la ALA-TFD, tales como:

- Niveles de GSH.
- Daño a macromoléculas.
- Producción de EROs.

- La síntesis endógena de H₂S en las líneas celulares, y el efecto de inhibidores de las diferentes enzimas que participan en la síntesis.

- El efecto del H₂S sintetizado endógenamente sobre la ALA-TFD.

- El efecto del H₂S sobre la síntesis y acumulación de porfirinas.

- El efecto del H₂S en enzimas que participan de la vía de biosíntesis del hemo.

- Analizar bases de datos genéticas de muestras de tejidos humanos tumorales y no tumorales en busca de correlaciones entre la actividad génica de las enzimas que sintetizan H₂S y el cáncer.

III. Materiales y Métodos.

III.1. Fotosensibilizantes.

En el desarrollo de esta tesis se utilizaron los siguientes compuestos como FS o pro-FS (Figura III.1): Photofrin® (PII) (QLT Therapeutics, USA), Clorina e6 (Ce6) (Frontier Scientific Inc, Logan, USA), ácido 5-aminolevulínico (ALA) (Sigma, UK).

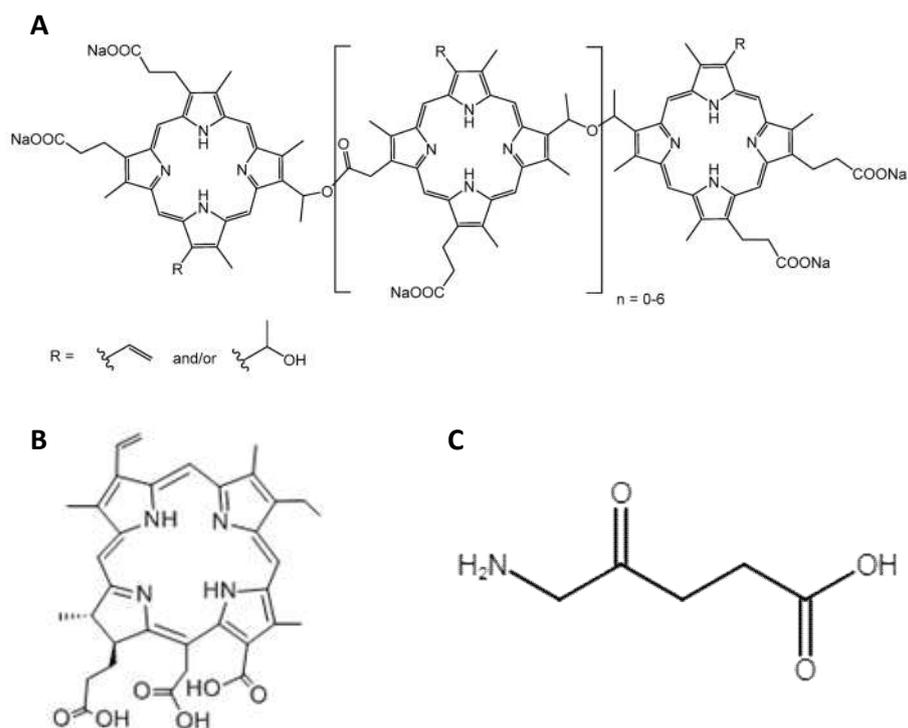


Figura III.1. Estructura química de los FS A) Photofrin® y B) Ce6, y C) el pro-Fs ALA.

III.2. Líneas celulares.

III.2.1. LM2 y LM3.

Son líneas celulares de adenocarcinoma mamario murino, aisladas a partir de tumores espontáneos de ratones hembra de la cepa BALB/c (Urtreger et al., 1997; Galli et al., 2000), generadas y cedidas por el Instituto Ángel H. Roffo (UBA).

III.2.2. SKOV-3 e IGROV-1.

Son líneas de adenocarcinoma ascítico de ovario humano. Ambas provenientes de la American Type Culture Collection, ATCC (Manassas, VA, USA).

Todas las células antes indicadas, se crecieron y mantuvieron en un ambiente humidificado a 37°C, 5% de dióxido de carbono y con medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) suplementado con gentamicina 80 µg/ml, glutamina 1%, y suero fetal bovino (SFB) (Natocor, Argentina) (5% para LM2 y LM3, y 10% para SKOV-3 e IGROV-1).

III.2.3. Raw 264.7.

Es una línea de macrófagos de ratón proveniente de la ATCC. Se cultivó en medio DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham MA, USA) con alta concentración de glucosa (4500 mg/ml) y piruvato (110 mg/ml) suplementado con gentamicina 80 µg/ml, glutamina 1 % y 5 % de SFB (Natocor, Argentina).

III.3. Fuente de luz.

Se emplearon dos tubos fluorescentes (L 18W/827, Osram, Argentina) que producen un espectro de luz entre 400 y 700 nm, con una radiación máxima a 600 nm (Figura III.2). La potencia de luz emitida se midió con un radiómetro Yellow Springs Kettering modelo 65 (Yellow Spring, HO, USA). Se utilizaron dosis de energía variables,

modificando los tiempos de exposición a la luz y la densidad de potencia fue de 2 mW/cm².

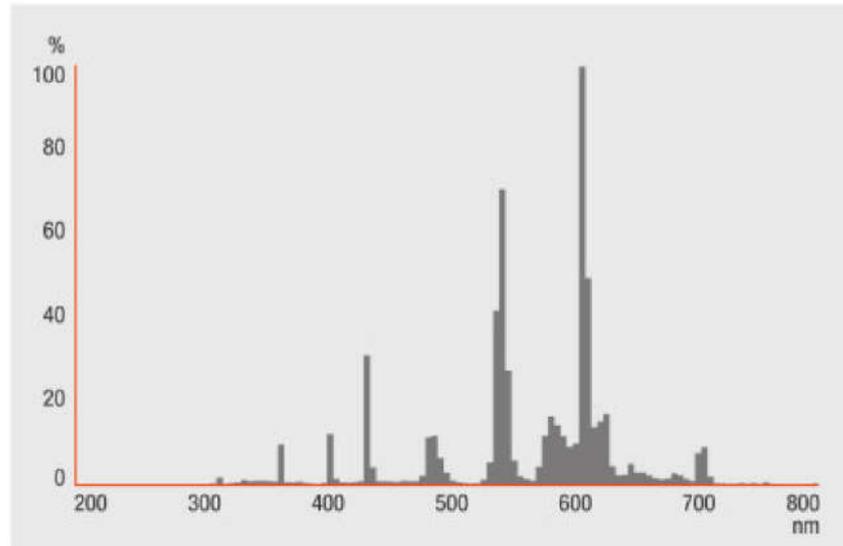


Figura III.2. Distribución espectral de los tubos L 18W/827. Información suministrada por Osram GmbH, Munich, Alemania (2020).

III.4. Tratamiento fotodinámico.

Para llevar a cabo los tratamientos fotodinámicos (Figura III.3), las células se sembraron en placas de 24 pocillos. Luego de 48 h se cambió el medio de cultivo por medio sin SFB y se incubaron durante 3 h con los FS ó el pro-FS, ALA. Seguidamente, las placas con las células se ubicaron sobre una lámina de vidrio a 14 cm de la fuente lumínica y se irradiaron durante distintos períodos de tiempo. Luego de la irradiación el medio se sustituyó nuevamente por medio con SFB. Las células se mantuvieron en estufa durante otras 19 h a 37° C para permitir que ocurra el fotodaño, y se determinó la viabilidad celular.

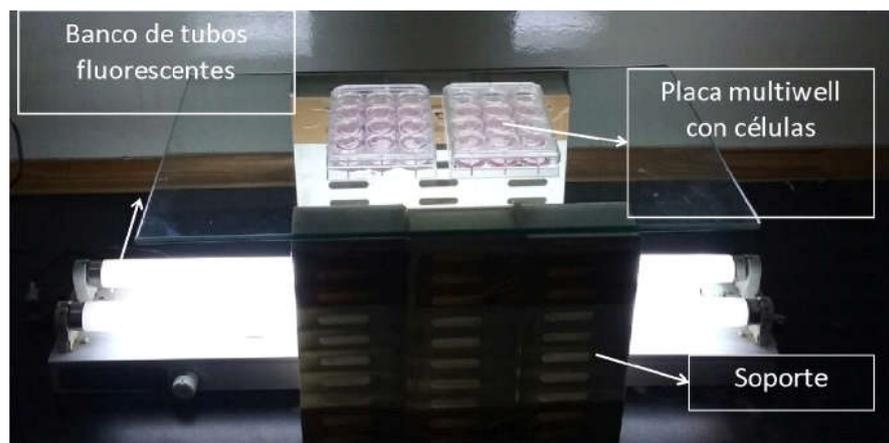


Figura III.3. Banco de iluminación para realizar la TFD.

III.5. Administración de NaHS.

Las soluciones de NaHS se prepararon en buffer fosfato salino (PBS) frío en tubos con tapa a rosca, inmediatamente antes de ser utilizadas y se mantuvieron en hielo durante su uso.

En la Figura III.4 se representa un esquema general de un experimento de TFD y se muestran los puntos de administración de NaHS que se utilizaron.

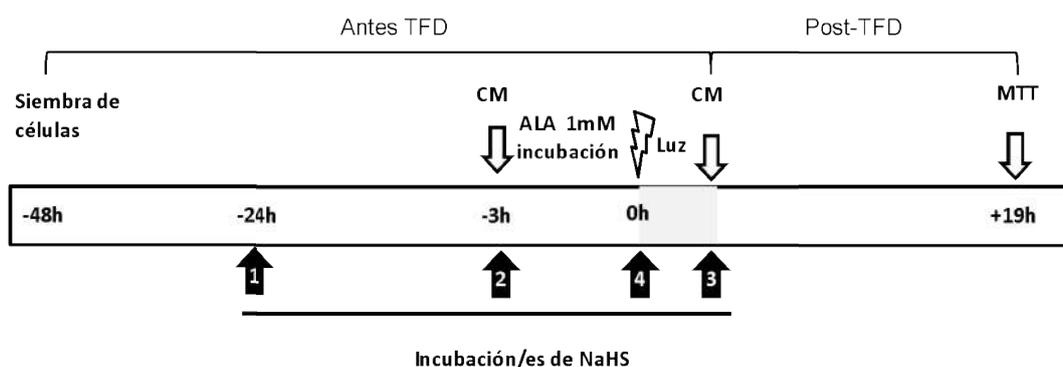


Figura III.4. Esquema general de un experimento de ALA-TFD. Flechas negras indican los diferentes tiempos de administración de NaHS utilizado durante los experimentos. CM = cambio de medio; MTT = ensayo de viabilidad celular (ver III.6).

III.6. Ensayo de viabilidad de MTT.

La fototoxicidad se determinó mediante el ensayo de viabilidad celular de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliobromuro (MTT) de Sigma Chem Co., USA (Denzinot y Lang, 1986). Este método se basa en la actividad de la dehidrogenasa mitocondrial, el cual se correlaciona bien con otros métodos de evaluación de toxicidad fotodinámica, tales como el ensayo de formación de colonias (Evans et al., 1997).

Brevemente, las células se incubaron a 37° C durante 1 h con MTT 0,5 mg/ml. Como resultado se obtuvieron cristales de formazán, que fueron disueltos en DMSO y la absorbancia de la solución obtenida se cuantificó a 560 nm en un lector de placas Epc (BioTek, USA) y es proporcional al número de células vivas.

III.7. Dosis Lumínica 50 (DL₅₀).

La dosis lumínica 50 se definió como la cantidad de energía administrada en forma de luz y expresada en mJ/cm², necesaria para matar al 50% de las células, y se calculó por ajuste y regresión de las curvas de supervivencia obtenidas en los experimentos de TFD.

III.8. Determinación del número de células.

El número de células por pocillo se determinó por conteo de células viables en cámara de NeuBauer en presencia del colorante vital de exclusión azul de Tripán. Al estar en presencia de azul de tripán, las células vivas no se tiñen, mientras que las muertas o no viables incorporan el compuesto, mostrándose de color azul.

III.9. Toxicidad de NaHS.

Se incubaron las células en placas de 48 o 96 pocillos con diferentes concentraciones de NaHS (hasta 100 mM). Al cabo de 24 h se registró la supervivencia celular mediante el ensayo de MTT.

III.10. Determinación de ALA y PBG utilizando el ensayo de Ehrlich.

Para el ensayo de Ehrlich (Mauzerall y Granick, 1956), se mezclaron 100 μ l de una solución de ALA con 450 μ l de buffer fosfato de sodio 0,2 M pH= 6,8 (buffer ALA) y 50 μ l de acetilacetona. Se agitó vigorosamente y se dejó 10 min en baño de agua a 100°C para que ocurra la condensación de las moléculas de ALA al monopirrol porfobilinógeno (PBG). Se detuvo la reacción poniendo las muestras en agua helada, luego se quitaron del baño y se dejó que alcancen la temperatura ambiente. Se mezclaron partes iguales de la muestra con reactivo de Ehrlich (2 g de p-dimetil aminobenzaldehído en 25 ml de HCl y 75 ml de ACOH glacial), y se cuantificó la absorbancia a 555 nm dentro de los 8 a 16 min, en un equipo PerkinElmer Lambda 265 (PerkinElmer Ltd. UK.). El PBG produce un color rosado o fucsia intenso al contacto con el reactivo.

El PBG fue cuantificado en homogenatos de tumores (III.24), se mezclaron partes iguales del homogenato y de reactivo de Ehrlich, se agitó vigorosamente, y se midió la absorbancia de 555 nm entre los 8 y los 16 min.

III.11. Determinación de H₂S por conversión en azul de metileno.

A 1 ml de una solución de NaHS se agregaron 133 μ l de N, N dimetil-p-fenilendiamina 20 mM en HCl 7,2 M, y 133 μ l de la solución ácida de FeCl₃ 30 mM en HCl 1,2 M. Se incubaron 20 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó 3 min a 15800 g. El azul de metileno generado por la reacción de ambos compuestos, se cuantificó por espectrofotometría a una absorbancia de 670 nm, en un equipo PerkinElmer Lambda 265 (PerkinElmer Ltd. UK.).

Se utilizó una curva de calibración realizada con NaHS en buffer fosfato de potasio 100 mM pH = 7,4 bajo las mismas condiciones experimentales (Karthan et al., 2012).

III.12. Cuantificación de proteínas.

Para realizar la cuantificación de proteínas en células, las mismas se lavaron 3 veces con PBS y se mantuvieron en presencia de NaOH 1N durante una hora. Luego se realizó el ensayo de Lowry (Lowry et al., 1951) y se cuantificó la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 265 (Perkin Elmer Ltd. UK).

Cuando la cuantificación fue de homogenatos de tejidos, se tomó una alícuota de los mismos y realizó el mismo ensayo de Lowry (Lowry et al., 1951).

La cantidad de proteínas se calculó a partir de una curva estándar realizada con seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma Chem Co., USA.).

III.13. Determinación de glutatión reducido intracelular (GSH).

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a razón de $2 \cdot 10^5$ células por pocillo. Se dejaron crecer durante 24 h. Luego se incubaron con NaHS y/o BSO (DL-butionina-[S, R]- sulfoximina) (Sigma Chem Co., USA.) durante 24 h. Se adicionó NaHS dos veces (puntos 1 y 2 de la Figura III.4), mientras que la adición de BSO fue una única vez (punto 1 de la Figura III.4).

Para la determinación de GSH, se utilizó el método descrito en Astort et al. (2014). Se retiró el medio de cultivo con SFB de la placa, se lavaron las células 3 veces con PBS a temperatura ambiente, se agregaron 120 μ l de H₂O destilada y posteriormente 120 μ l de buffer fosfato de potasio 100 mM pH = 7,4. Las células se levantaron mecánicamente utilizando un *scraper*. Se agregaron 60 μ l de TCA 10% + 1% EDTA. La

suspensión obtenida se centrifugó durante 7 min a 15800 g, en una centrífuga Eppendorf (Eppendorf® AG, Hamburgo, Alemania) y se recuperó el sobrenadante

Se mezclaron 100 µl del sobrenadante con 400 µl de buffer fosfato de potasio 0,5 M, pH = 7,4. Se agregaron 400 µl de DTNB (5,5'- Ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico)) 0,25 mg/ml en buffer fosfato de sodio 0,5 M, y se incubó 10 min a temperatura ambiente.

Se midió la absorbancia a 410 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 265, (Perkin Elmer Ltd. UK). La cantidad de GSH presente en las muestras se calculó a partir de una curva de calibración de GSH (Sigma Chem Co., USA.).

III.14. Determinación de porfirinas por microscopía de fluorescencia.

Para esta determinación, se utilizó la fluorescencia intrínseca que generan las porfirinas al ser irradiadas. Las células se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio estériles, y se dejaron crecer durante 48 h. Posteriormente, se incubaron durante 3 h con 1 mM de ALA y la concentración deseada de NaHS (0,1-10 mM) en medio de cultivo sin SFB. Luego se cambió el medio de incubación por PBS, y los cubreobjetos se montaron en fresco, utilizando una pequeña gota de Dabco antifade para su visualización.

El microscopio utilizado fue Olympus BX61, equipado con una lámpara de Mercurio HBO 100 W y el correspondiente filtro para microscopía de fluorescencia verde (545 nm filtro de excitación, BP 540). Las fotografías se tomaron con una cámara Olympus Q-color, y se analizaron con FIJI®.

III.15. Cuantificación de porfirinas totales por extracción química.

III.15.1. Cuantificación de porfirinas totales a partir de cultivos celulares.

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una razón de $5 \cdot 10^4$ células/ml, y se dejaron crecer durante 48 h. Luego se incubaron con el pro-FS ALA 1 mM en medio sin SFB durante 3 h. El agregado de NaHS se realizó según el protocolo descrito en III.5.

Al cabo de las 3 horas se realizaron 2 lavados con PBS. Finalmente, se extrajeron las porfirinas de las células, incubando 30 min con HCl 5% a 37°C. Se cuantificó la fluorescencia de las muestras ($\lambda_{\text{ex}}=406$ nm y $\lambda_{\text{em}}= 604$ nm) utilizando un espectrofluorómetro Perkin Elmer LS55 (Buckinghamshire, UK). Para la cuantificación se utilizó una solución patrón de Pp IX (Casas et al., 2001).

III.15.2. Cuantificación de porfirinas totales a partir de explantes de tumor.

Los explantes se obtuvieron según se describe en III.23.2 Se seccionaron en fracciones de aproximadamente 50 mg, se pesaron, y se incubaron en medio de cultivo sin SFB con ALA 1 mM, NaHS 10 mM, y la combinación de ambos. Al cabo de 3 horas, se homogenizaron en un *potter* Ultra-Turrax (Janke & Kunkel, IKA® -Labortechnik) con 2 ml de una mezcla de acetato de etilo y éter etílico (4:1). Se centrifugaron los homogenatos en centrifuga clínica a 3600 g, y los sobrenadantes se extrajeron con 2 ml de HCl 5%. Se agitaron vigorosamente para favorecer la extracción, se separaron las fases, y en la fase acuosa se determinó por fluorescencia la cantidad de porfirinas presentes en la muestra ($\lambda_{\text{ex}}=406$ nm y $\lambda_{\text{em}}= 604$ nm) en un espectrofluorómetro Perkin Elmer LS55 (Buckinghamshire, UK).

III.16. Determinación de la síntesis endógena de H₂S.

Se determinó la cantidad de H₂S, sintetizado por las células o liberado por el dador, adaptando el método descrito en Kartha et al. (2012). El método consistió en capturar el H₂S liberado durante todo el tiempo de incubación, en agar alcalino (1% p/v) conteniendo 1% de acetato de zinc. Al finalizar la incubación, se midió el H₂S

atrapado mediante la reacción de transformación a azul de metileno (III.11), agregando los reactivos directamente sobre el agar.

Se midió el H₂S en cultivos celulares, para lo cual se adaptó el método utilizando placas de 35 mm de diámetro (Figura III.5). Para ello, se sembraron las células, se dejaron crecer durante 48 h y posteriormente se cambió la tapa de la placa por otra que contenía 2 ml del agar alcalino sólido con acetato de zinc 1%; al mismo tiempo se agregó al medio de cultivo, cisteína 10 mM y diferentes inhibidores de la síntesis endógena de H₂S (PAG, AOA y Asp). Posteriormente, se incubaron las células con la placa tapada durante 24 h a 37°C.

Una vez finalizada la incubación, se agregó 1 ml de cloruro de N,N dimetil-p-fenilendiamina 20 mM en HCl 7,2 M al agar y se incubó en oscuridad y a temperatura ambiente por 10 min. Luego, se agregaron 100 µl de una solución ácida de cloruro férrico (FeCl₃ 30mM en HCl 1,2M) y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 20 min. Las muestras se pasaron a tubos Eppendorf y se centrifugaron en una centrífuga Eppendorf (Eppendorf® AG, Hamburgo, Alemania) a 15800 g por 5 min.

El azul de metileno formado se determinó por espectrofotometría a una absorbancia de 670 nm, en un equipo Perkin Elmer Lambda 265 (Perkin Elmer Ltd. UK.).

La cantidad de H₂S presente en las muestras se calculó a partir de una curva de calibración realizada con NaHS en las mismas condiciones del ensayo.



Figura III.5. Fotografía de la preparación de las placas para la captura del H₂S generado por las células o por liberación de NaHS presente en el medio de cultivo (curva de calibración). En la base llevan medio de cultivo (solución de color rosada), donde crecen las células y en las tapas, el agar alcalino sólido con acetato de zinc donde el H₂S endógeno generado es capturado.

III.17. Capacidad oxidante total.

Para la medición de la capacidad oxidante total, se utilizó un método colorimétrico basado en la oxidación de ión ferroso a férrico en medio ácido, en presencia de naranja de xilenol (Erel, 2005).

Las EROs se generaron utilizando H₂O₂, y los reactivos utilizados fueron: Reactivo 1, (naranja de xilenol 150 mM, NaCl 140 mM y glicerol 1,35 M en ácido sulfúrico 25 mM, pH = 1,74) y Reactivo 2, ((NH₄)₂Fe(SO₄)₂ 5 mM y O-dianisidina 10 mM en ácido sulfúrico 25 mM). Para la determinación, se mezclaron 10 µl de H₂O₂ 8,3 mM con 25 µl de NaHS a distintas concentraciones. Se agregaron 225 µl de Reactivo 1, y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 11 µl de Reactivo 2 y se mantuvo en oscuridad durante 5 min a temperatura ambiente.

Para la cuantificación, se midió la absorbancia a 560 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 265 (Perkin Elmer Ltd. UK).

III.18. Interacción del H₂S con ¹O₂ *in vitro* (sistema libre de células).

Para detectar la cantidad de $^1\text{O}_2$ presente en el sistema, se utilizó una sonda fluorescente específica para $^1\text{O}_2$, el *Singlet Oxygen Sensor Green Reagent*[®] (Molecular Probes™) a una concentración final de 0,5 μM .

El $^1\text{O}_2$ se generó a partir de los FS Ce6 (2 μM) ó PII (20 μM) ó AT (20 μM). El H_2S se generó a partir del dador inorgánico NaHS, y se utilizó en el rango de concentraciones finales de 50 μM a 1 mM.

Para realizar la determinación, se incubaron el FS, el NaHS y la sonda fluorescente en placas de 24 pocillos, y a cada pocillo se le asignó un tratamiento o una concentración de NaHS diferente.

La placa se irradió durante 30 min con dos reflectores de luz halógena de tungsteno ELH GE Quartzline (500 W, General Electric Co., Cleveland, OH, USA), lo que correspondió a 41 J/cm^2 , generando el $^1\text{O}_2$ a partir de los diferentes FS.

Luego, se midió la fluorescencia de la sonda en cada tratamiento ($\lambda_{\text{ex}}=504$ nm y $\lambda_{\text{em}}=531$ nm), en un espectrofluorómetro Perkin Elmer LS55 (Buckinghamshire, UK).

Se realizaron todos los controles necesarios para corroborar que la sonda no es afectada por la luz o por el NaHS en esas condiciones o por el FS sin luz; que el $^1\text{O}_2$ no se generó en oscuridad, y que la sonda y el NaHS no afectaron la capacidad del FS de generar $^1\text{O}_2$.

La cantidad de $^1\text{O}_2$ se calculó como el porcentaje de fluorescencia de la sonda en cada tratamiento con respecto al control positivo (la sonda con el FS irradiado sin NaHS), que representó la condición de máxima fluorescencia.

III.19. Determinación de EROs *in vivo* utilizando la sonda DCFH₂-DA.

Para la detección de EROs intracelulares luego del tratamiento fotodinámico, se utilizó la sonda 2,7 diclorodihidrofluorescein diacetato (DCFH₂-DA) (Sigma Chem Co., USA).

Las células, crecieron sobre cubreobjetos de vidrio estériles, posteriormente se expusieron a la ALA-TFD con o sin NaHS. Luego se incubaron en oscuridad durante 30 min con 10 μM final de la sonda. Finalmente, se montaron en fresco sobre portaobjetos, utilizando una pequeña gota de Dabco antifade. El microscopio utilizado fue Olympus BX61, equipado con una lámpara de Mercurio HBO 100 W y el correspondiente filtro para microscopía de fluorescencia azul (450-490 nm filtro de excitación, BP 490). Las fotografías se tomaron con una cámara Olympus Q-color, y se analizaron con el software FIJI®.

III.20. Análisis de imágenes con FIJI®.

Para cuantificar la fluorescencia de las imágenes se utilizó el *software* FIJI® (Schindelin et al., 2012). Los valores reportados fueron las intensidades de fluorescencia de las células presentes en cada fotografía, relativizadas al área celular (intensidad de fluorescencia/área celular).

III.21. Cuantificación de proteínas oxidadas.

Se sembraron las células en placas de 6 pocillos y se las sometió al tratamiento de ALA-TFD con diferentes concentraciones de NaHS (0– 10 mM) en tres dosis aplicadas en los tiempos 1, 2 y 3 de la Figura III.4. A las 4 h post TFD, se descartó el medio de cultivo y se lavaron las células 2 veces con PBS estéril. Se agregaron 150 μl de H₃PO₄ 0,5 M, se levantaron las células con un *scraper* y se homogenizaron. Los homogenatos se recuperaron en tubos Eppendorf y se llevaron a un volumen final de 500 μl con H₃PO₄ 0,5 M.

La cantidad de proteína oxidada se estimó cuantificando los grupos carbonilos presentes en cada muestra, utilizando una modificación del método espectrofotométrico de la 2,4-dinitrofenilhidrazina (*DNPH*, por sus siglas en inglés) (Mesquita et al., 2014).

Brevemente, se mezclaron 400 μl de *DNPH* 10 mM en H_3PO_4 0,5 M con 400 μl de homogenato y luego de 10 min de incubación en oscuridad a temperatura ambiente, se agregaron 200 μl de NaOH 6 M, incubando nuevamente 10 min en oscuridad a temperatura ambiente.

La determinación se realizó en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 265 (Perkin Elmer, UK Ltd.) a 450 nm. La concentración de carbonilos presentes en la muestra se calculó a partir del valor de coeficiente de extinción molar $\epsilon=22,308 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Mesquita et al., 2014).

III.22. Síntesis de óxido nítrico en presencia de NaHS.

Los niveles endógenos de NO se determinaron en los sobrenadantes de cultivos celulares. Se sembraron 5×10^4 células/ml en placas de 48 pocillos, y se dejaron crecer 48 h. Posteriormente, se tomó una alícuota del sobrenadante y se determinaron los niveles de NO por la reacción de Griess (Miranda et al., 2001). Se cuantificó espectrofotométricamente a 540 nm utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 265 (Perkin Elmer, UK Ltd.). Se utilizó NaNO_2 para realizar la curva de calibración.

III.23. Generación de tumores de líneas celulares LM2 y LM3 en ratones BALB/c.

Se emplearon ratones de la cepa BALB/c de 2 meses de edad y de 25 a 30 g de peso. Se les suministró agua y comida *ad libitum*. Los ratones tratados portaban un adenocarcinoma LM2 o LM3 originado por una inyección subcutánea de células LM2 o LM3 entre 10 y 15 días antes de la experiencia.

Los animales se sacrificaron en cámara de CO₂, de acuerdo con las normas de ética vigentes del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, y posteriormente se aislaron los tumores.

A partir de los tumores se utilizaron los explantes o prepararon homogenatos, para utilizar en los diferentes experimentos.

III.23.1. Obtención de homogenatos de tumor.

Para obtener los homogenatos de tumor se utilizó un *potter* Ultra-Turrax (Janke & Kunkel, IKA®-Labortechnik), en un volumen de 0,2 ml (5 ml de solución por cada gramo de tumor) de una solución de sacarosa 0,25% en agua. Se centrifugaron en centrífuga clínica por 30 min a 3500 g y se recuperaron los sobrenadantes. A esa fracción se la denominó homogenato.

III.23.2. Obtención de explantes de tumor.

Para obtener los explantes, se sacrificaron los ratones y se aislaron los tumores, cuidando de no dejarles adheridas ni grasa ni piel. Se enjuagaron en solución fisiológica. Se seccionaron los tumores en fracciones de igual tamaño y formato, y se pesaron.

III.24. Determinación de la actividad de enzimas de la vía metabólica del grupo hemo.

La actividad de las enzimas ALA-D y PBG-D se determinaron utilizando distintas fuentes enzimáticas y condiciones experimentales:

1. Lisado de glóbulos rojos, obtenidos a partir de sangre humana heparinizada. Los eritrocitos se obtuvieron a partir de sangre de donantes voluntarios sanos.

Se tuvo en cuenta la declaración de Helsinki (World Medical Association, 2018), y fue aprobado por el comité de ética del Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (UBA-CONICET).

2. Homogenatos de tumor LM2 y LM3 inducidos en ratones BALB/c.

III.24.1. Determinación de la actividad de ALA-D.

La actividad de la enzima ALA-D, se midió espectrofotométricamente por la formación del producto, porfobilinógeno (PGB) y su reacción con el reactivo de Ehrlich (III.10) (Mauzerall y Granick, 1965).

III.24.1.1. En hemolizado de glóbulos rojos.

Se hemolizaron los glóbulos rojos (500 µl) con 100 µl de solución de Tritón X-100 5% y se diluyeron 15 veces con buffer Tris-HCl 50 mM pH = 7,4 (6,9 ml). La mezcla de reacción se constituyó de la siguiente manera: a 250 µl del hemolizado se le agregaron 250 µl de una solución de NaHS 2x (el doble de la concentración final deseada), 200 µl de agua, incubando durante 30 min a 37° C. Luego, se añadieron 250 µl de buffer fosfato de sodio 0,2 M pH = 6,8, y 50 µl de ALA 0,05 M.

El blanco de la reacción se determinó incubando 250 µl de hemolizado, 500 µl de agua y 250 µl del buffer fosfato de sodio 0,2 M pH = 6,8. Las muestras fueron incubadas a 37° C durante 60 min y se desproteinizaron con 100 µl de TCA 50%, y se dejaron reposar los tubos 10 min en hielo. Se centrifugaron a 15800 g en una centrifuga Eppendorf (Eppendorf® AG, Hamburgo, Alemania). Se determinó la cantidad de PBG formado en el sobrenadante, mediante la reacción de Ehrlich (III.10.).

Las unidades enzimáticas por ml se calcularon según la siguiente expresión:

$$\text{Unidades / ml GR} = (A_M - A_B) \times 2,57$$

A_M : Absorbancia de la muestra

A_B : Absorbancia del blanco

2,57: factor de conversión

Se definieron las unidades enzimáticas como: la cantidad de enzima capaz de sintetizar 1 μmol de PBG/h en las condiciones experimentales de incubación.

III.24.1.2. En homogenato de tumor.

Se obtuvieron los homogenatos como se describe en III.23.1. El sistema de incubación contuvo un volumen final de 1 ml.

En tubos Eppendorf, se mezclaron 100 μl de homogenato con 100 μl de una solución NaHS en agua destilada 2x de la concentración deseada, durante 30 min a 37°C en baño de agua a 100°C, con agitación y el tubo tapado. Posteriormente, a cada tubo se le agregaron 500 μl de agua destilada, 250 μl de buffer fosfato de sodio 0,02 M pH = 6,8 y 50 μl de ALA 100 mM. Se realizó un blanco de reacción sin enzima. Se incubaron durante 60 min en baño de agua a 37° C, agitación y el tubo tapado. Para detener la reacción se añadieron 100 μl de TCA 50%, y se dejaron reposar los tubos 10 min en hielo. Finalmente, se centrifugaron durante 5 min a 15800 g en una centrifuga Eppendorf (Eppendorf® AG, Hamburgo, Alemania).

La cantidad de PBG presente en las muestras se determinó mediante la reacción de Ehrlich (III.10.).

Las unidades enzimáticas (UE) se definieron como nmoles de PBG formadas por hora por mililitro de homogenato en las condiciones estándar de incubación. La actividad específica (AE) se definió como UE por mg de proteína.

$$\text{UE (nmoles PBG/ml homogenato por hora)} = \frac{A_{555} \times \text{vol. inc.} \times 10000000 \times \text{dil.}}{E \times PM \times \text{vol. enz.}}$$

E= 113,6 (absorción de una solución de PBG de 1 mg/ml)

PM= 226 (peso molecular del PBG)

Vol. Enzimático = volumen de homogenato en el sistema de incubación

Vol. Incubación = volumen final del tubo de donde se toma la alícuota para la reacción de Ehrlich.

Dilución = 2 (se diluye al medio con el reactivo de Ehrlich)

III.24.2. Determinación de la actividad de PBG-D.

Para la determinación de la actividad enzimática de PBG-D, se cuantificó la formación de producto, que corresponde a las porfirinas totales en la muestra.

III.24.2.1. En hemolizado de glóbulos rojos.

Los glóbulos rojos se hemolizan según lo descrito en III.24.1.1. El sistema contenía 250 μ l de hemolizado, 50 μ l de una solución de NaHS 6x de la concentración deseada, 200 μ l de agua, y se incubaron durante 30 min a 37°C. Luego se agregaron 50 μ l de PBG 30 mg/ml, 75 μ l de buffer Tris-HCl 0,5 M pH = 8,2 y 125 μ l de solución salina de NaCl (1,7 M): MgCl₂ (0,12 M) en proporción 7:3 (v:v).. El blanco de la reacción, sin enzima, se determinó incubando 500 μ l de agua, 50 μ l de PBG 30 mg/ml, 75 μ l de buffer Tris-HCl 0,5 M pH = 8,2 y 125 μ l de solución salina de NaCl (1,7 M): MgCl₂ (0,12 M) en proporción 7:3 (v:v).

Se incubaron las muestras aeróbicamente, en oscuridad, con agitación durante 2 h a 45°C. La reacción se detuvo por agregado de 750 μ l de TCA 10%. El sistema se expuso a la luz blanca durante 20 min para oxidar los porfirinógenos a porfirinas y posteriormente, los tubos se mantuvieron 10 min en hielo. Se centrifugó a 15000 g en una centrífuga Eppendorf (Eppendorf® AG, Hamburgo, Alemania) durante 15 min y se midieron las absorbancias a 380, 406, 408 y 430 nm en el sobrenadante utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 265, (Perkin Elmer Ltd. UK.).

La cantidad de porfirinas presentes en las muestras se calculó mediante las siguientes expresiones:

$$U = 2A_{\max} (A_{430} + A_{380}) \frac{1,008 \times 1,5}{0,25}$$

$$UB = [2A_{\max} (A_{430} + A_{380})] \times 1,008 \times 1,5$$

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{ml GR}} = (UM - UB) \times 15$$

$2A_{\max}$ = 2 x la A máxima entre A_{406} y A_{408} nm.

1,5: volumen de incubación

1,008: factor de conversión correspondiente para la uroporfirina en HCl 5%

UM: unidades formadas en el hemolizado

UB: unidades formadas en el blanco

U: cantidad de enzima capaz de sintetizar 1 nmol de Uroporfirina por hora en las condiciones experimentales de incubación.

III.24.2.2. En homogenato de tumor.

Se obtuvieron los homogenatos como se describe en III.23.1. El sistema de incubación contenía un volumen final de 750 μ l en un tubo Eppendorf. Se mezclaron 400 μ l de homogenato con 100 μ l de una solución de NaHS 5x de la concentración final, con los tubos tapados y en oscuridad a 37°C por 30 min con agitación. Posteriormente, se adicionaron a cada tubo, 200 μ l de buffer TRIS-HCl 0,5 M pH = 8,2 y 50 μ l de PBG 30 mg/ml en el mismo buffer TRIS-HCL. Se realizó un blanco de reacción sin enzima. El sistema se incubó durante 2 h a 45°C, en oscuridad y agitación. Para detener la reacción se agregaron 750 μ l de TCA 10%, se agitó vigorosamente y se expuso a luz blanca intensa durante 20 min para favorecer la oxidación de los porfirinógenos a porfirinas. Posteriormente, los tubos se mantuvieron 10 min en hielo y se centrifugaron 15 min 15800 g en una centrífuga Eppendorf (Eppendorf® AG,

Hamburgo, Alemania). Se determinó la absorbancia del sobrenadante a las siguientes longitudes de onda: 380, 406, 408 y 430 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 265 (Perkin Elmer Ltd. UK.).

Se define la UE como los nmoles de porfirinas formados por hora y por ml de homogenato en las condiciones estándar de incubación.

La actividad específica (AE) se expresó como la UE por mg de proteína.

$$UE = \frac{\text{Porf. totales muestra} - \text{Porf. totales blanco} \cdot F. \text{ conversión} \cdot \text{Vol. Inc.}}{\text{Vol. enz.} \cdot 2}$$

Porf. Totales = Porfirinas totales = $2A_{\text{max}} - (A_{380} + A_{430})$

F. conversión = Factor de conversión = 1.008

Vol. Inc. = Volumen de incubación = 0,75 ml

Vol. Enz. = Volumen enzimático = 0,4 ml

III.25. Análisis por HPLC de fase reversa (RP-HPLC) de los intermediarios involucrados en la síntesis de porfirinas.

Para obtener el extracto conteniendo las porfirinas sintetizadas y acumuladas durante el tiempo de incubación con el pro-FS, las células se mantuvieron en cultivo en las condiciones descritas en III.2. durante 72 h. Al cabo de ese tiempo, se descartó el medio de cultivo con SFB, y se incubó durante 3 h con medio de cultivo sin SFB conteniendo ALA 1 mM con o sin NaHS 10 mM, dependiendo del tratamiento. Luego se descartó el medio sin SFB, se lavó dos veces con PBS y se agregaron 500 µl de HCl 5%. Las células se dejaron en estufa a 37°C durante 30 min, para extraer las porfirinas totales. Se recuperó el extracto ácido y se centrifugó en una centrífuga (Eppendorf® AG, Hamburgo, Alemania) a 15800 g durante 5 min. Se recuperó el sobrenadante y se mantuvo en frío y oscuridad hasta su análisis por RP-HPLC.

Las condiciones de corrida del RP-HPLC fueron:

- Columna Merck Lichrospher 100-RP-18 de 125 mm de longitud y 4 mm de diámetro interno, con un diámetro de partícula de 5 μm .
- Solventes de desarrollo: buffer acetato de amonio 1 M, pH = 5,6 como solvente A, y metanol 100 % como solvente B.
- Gradiente de elución: un gradiente lineal de 10 % (v/v) a 90 % (v/v) de solvente B hasta los 30 min, 90 % de solvente B hasta los 40 min, un gradiente lineal de solvente B de 90 % (v/v) a 10 % (v/v) de solvente B hasta los 45 min, y 10 % de solvente B hasta los 60 min. La velocidad de flujo fue 1 ml/min.
- Detector fluorométrico: $\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 618 \text{ nm}$.
- Volumen de inyección: 20 μl de muestra o estándares.
- Como estándar se utilizó una mezcla de porfirinas ácidas libres (uroporfirina, heptaporfirina, hexaporfirina, pentaporfirina, coproporfirina y Mesocarboxilicoporfirina) (Frontier Scientific, USA) y Protoporfirina IX libre en HCl 5% (Porphyrin Products, Logan, Utah, USA).

Los resultados se expresaron como los porcentajes de las porfirinas totales detectadas para cada condición.

III.26. Análisis bioinformáticos.

Tanto los datos como las herramientas de análisis del número de copias y la cantidad de transcritos de los genes de las enzimas involucradas en la síntesis de H_2S se obtuvieron de dos bases de datos abiertas.

Los datos fueron obtenidos de los proyectos El Atlas Genómico del Cáncer (*TCGA, The Cancer Genome Atlas*, en inglés) y Expresión genotipo-tejido (GTEX, *Genotype-tissue expression*, en inglés); y las herramientas de análisis utilizadas fueron proporcionadas por el GDC (*Genome Data Commons*, <https://portal.gdc.cancer.gov>) y GEPIA (*Gene Expression Profiling Interactive Analysis*, <http://gepia.cancer-pku.cn/detail.php>).

III.27. Análisis estadísticos.

Los análisis estadísticos se realizaron con el software Graphpad®, y fueron ANOVA de una vía seguido de comparaciones múltiples (Tukey o Dunnet), y test de t múltiples para la comparación de actividad enzimática de ALA-D y PBG-D. Se consideraron significativas las diferencias con un $p < 0,05$.

Resultados

IV. Efecto del H₂S en cultivos celulares de la línea de adenocarcinoma mamario murino LM2.

Para dar comienzo a la exposición de resultados, se muestran los obtenidos a partir de evaluar la supervivencia de las células a la ALA-TFD y NaHS, dador inorgánico de H₂S; así como diferentes aspectos relacionados con el estado redox de las células LM2, en condiciones post-TFD y en presencia de diferentes concentraciones de NaHS.

Para evaluar el daño oxidativo producto de un estímulo y el efecto de un tratamiento en un modelo biológico, es necesario comprobar que el estímulo genera un daño y que el tratamiento modifica ese daño. Para eso, se deben tener en cuenta tres aspectos: detección de especies oxidantes generadas por el estímulo, detección del daño oxidativo producto del estímulo (típicamente oxidación de macromoléculas), y detección de un aumento de la respuesta antioxidante por parte de la célula (aumento de glutatión reducido, aumento de actividad o cantidad de enzimas antioxidantes, etc). Del mismo modo, para considerar que un compuesto posee actividad antioxidante, se debe mostrar por un lado, que ese compuesto es capaz de reducir la cantidad de EROs y disminuir el daño a macromoléculas luego de una noxa, y por otro lado, que aumenta la defensa antioxidante de la célula.

Por esta razón, este capítulo consta de una variedad de experimentos y ensayos que apuntan a estudiar el efecto del H₂S en la respuesta de las células a la TFD, y su relación con el estado redox celular.

IV.1. Efecto del NaHS sobre la viabilidad de células LM2.

El efecto del NaHS sobre la viabilidad de las células LM2 se evaluó con el ensayo del MTT. Se observó que la viabilidad celular no disminuyó cuando las células se exponían a concentraciones crecientes de NaHS (hasta 10 mM) 24 h antes del ensayo de viabilidad. Concentraciones superiores a NaHS 10 mM, resultaron tóxicas para las células LM2. Los experimentos posteriores se realizaron con algunas de las concentraciones no tóxicas probadas. Los resultados se muestran en la Figura IV.1.

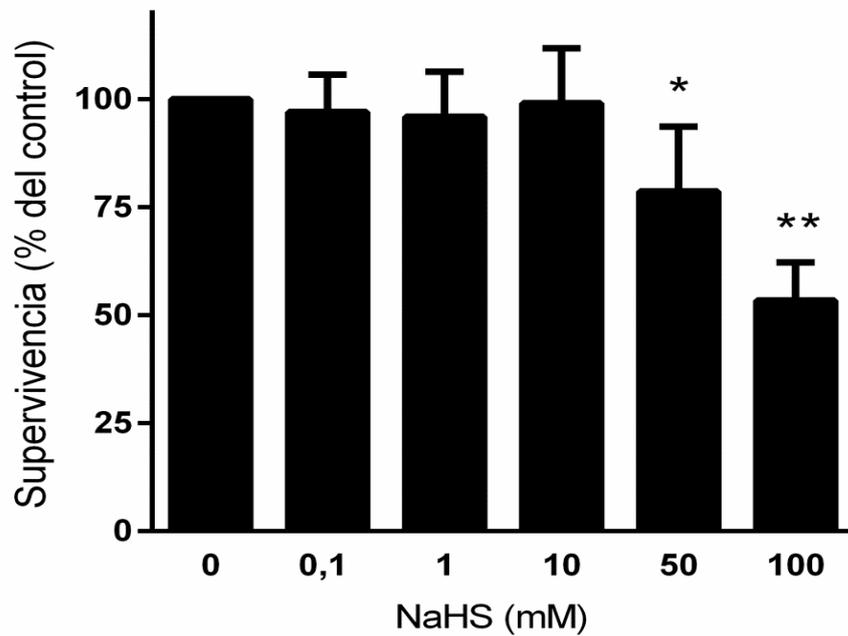


Figura IV.1. Toxicidad de una dosis de NaHS (hasta 100 mM) 24 h antes del ensayo de MTT, en las células LM2. Los datos son media \pm DS (4-6 réplicas), *p < 0,05 y **p < 0,01 frente al control sin NaHS, ANOVA seguido de test de Dunnet.

IV.2. Efecto del NaHS en la ALA-TFD en células LM2.

En primer lugar, se estudió el efecto de la administración exógena de NaHS sobre la supervivencia de las células LM2 sometidas a ALA-TFD (ver Materiales y Métodos, III.4 y III.5).

Se realizó la ALA-TFD en células LM2, utilizando diferentes concentraciones de NaHS (0,1 - 10 mM), y se evaluó la supervivencia celular con el método de MTT. Los resultados se muestran en la Figura IV.2 Para determinar el efecto del NaHS exógeno sobre la ALA-TFD en las células, teniendo en cuenta que el H₂S es un compuesto volátil, se estudió una curva dosis-respuesta con concentraciones variables de NaHS (0,1 - 10 mM) durante tres incubaciones sucesivas: 24 h antes de la irradiación, conjuntamente con ALA 1 mM y post-TFD (diseño experimental que se muestra en Materiales y Métodos, Figura III.4 en flechas negras, numeradas 1, 2 y 3).

La Figura IV.2 muestra una disminución en la eficiencia de ALA-TFD a partir de concentraciones de NaHS mayores a 0,5 mM. Observándose que a medida que aumenta la concentración de NaHS, la ALA-TFD se vuelve menos efectiva. A partir de NaHS 1 mM, las células sobrevivieron notablemente al tratamiento fotodinámico.

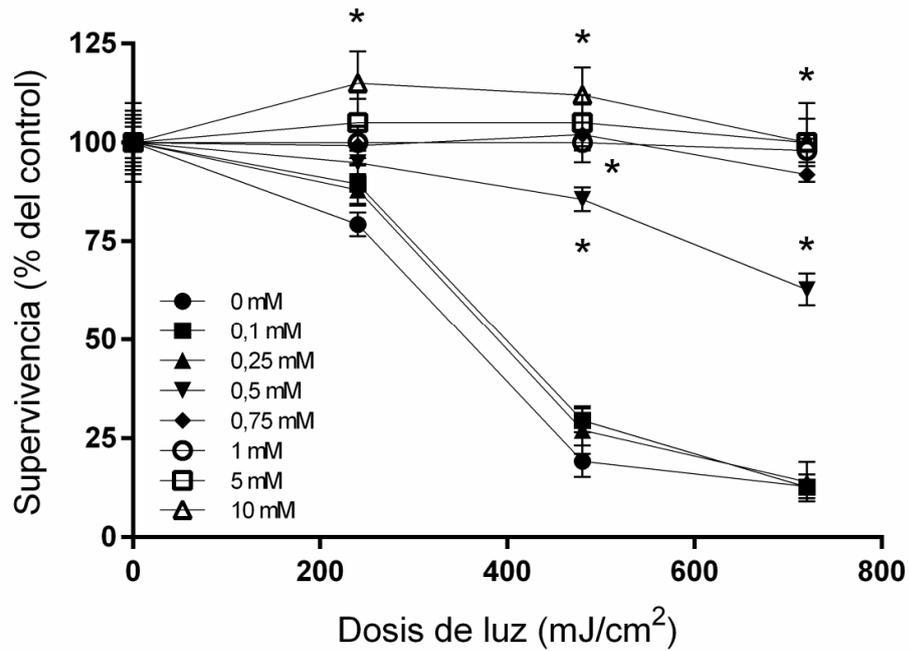


Figura IV.2. Efecto de diferentes concentraciones de NaHS en la supervivencia a la ALA-TFD de células de la línea LM2. NaHS fue administrado 24 h antes de la irradiación, conjuntamente con ALA 1 mM y post-TFD. Los datos son la media \pm DE (n =4-6 réplicas), realizadas por duplicado. *p <0,05; frente a 0 mM. Test de ANOVA seguido de comparaciones múltiples de Tukey.

Los valores de dosis lumínica 50 (DL₅₀) de la línea celular LM2 sometida a la ALA-TFD con o sin NaHS, fueron calculados a partir de las curvas de la Figura IV.2. Los resultados obtenidos se informan en la Tabla IV.1.

La DL₅₀ es una medida que se utiliza para comparar los diferentes tratamientos, y está definida como la dosis de luz necesaria para eliminar el 50 % de las células tratadas. Si aumenta la DL₅₀, significa que la terapia pierde efectividad, dado que se requiere una mayor dosis de luz para obtener el mismo efecto.

Tabla IV.1. DL₅₀ calculadas a partir de las curvas de la Figura IV.2.

Tratamiento	DL ₅₀ (mJ/cm ²)
0 mM NaHS (control)	357 ± 26
0,1 mM NaHS	398 ± 13
0,25 mM NaHS	392 ± 15
≥ 0,5 mM NaHS	> 720

Se observa una disminución de la eficiencia de la ALA-TFD a partir de concentraciones de NaHS igual o mayores a 0,5 mM. En particular, a concentraciones mayores a 1 mM se observa una supervivencia celular mayor al 80% con respecto al control. Este resultado muestra que el NaHS es capaz de influir en la respuesta de las células a la ALA-TFD, y concretamente hacer que la terapia resulte menos efectiva, protegiendo a las células del daño fotodinámico ejercido por la ALA-TFD. Esto se ve reflejado a su vez en las DL₅₀ de los tratamientos. A partir de una concentración de 0,5 mM de NaHS, la DL₅₀ aumenta más del doble con respecto a las células que no recibieron NaHS.

En los siguientes experimentos, para estudiar de manera particular dicho efecto de protección del NaHS sobre las células LM2, se las expuso a ALA-TFD, pero en lugar de las 3 aplicaciones consecutivas de NaHS, se administró una única dosis de NaHS 10 mM: 24h, 3h (durante la incubación con ALA 1 mM), durante la irradiación o post ALA-TFD (ver Figura III.4, flechas 1, 2, 4 y 3, respectivamente). Estos resultados se compararon con la respuesta de las células que recibieron ALA-TFD y las tres dosis de NaHS descritas anteriormente, y con el tratamiento que solo recibió ALA-TFD. Los resultados se muestran en la Figura IV.3.

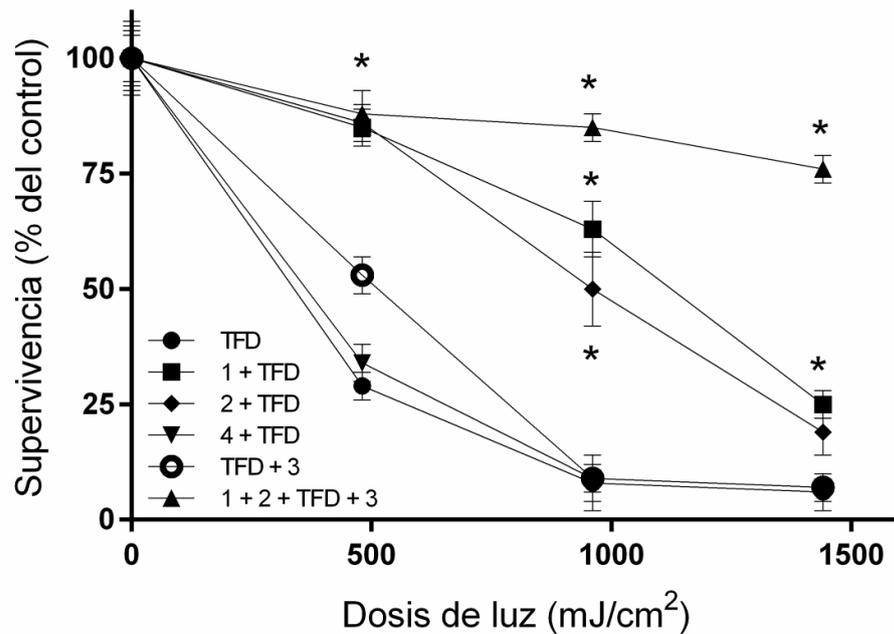


Figura IV.3. Efecto del NaHS 10 mM sobre la ALA-TFD cuando el dador NaHS es agregado en distintas etapas (ver flechas negras numeradas, Figura III.4, Materiales y Métodos). **TFD**: células sin NaHS; **1+TFD**: el NaHS es agregado 24 h antes del inicio de la TFD; **2+TFD**: NaHS agregado junto con ALA 1 mM; **4+TFD**: el NaHS es agregado solo durante la realización de la irradiación lumínica en la ALA-TFD; **TFD+3**: el NaHS es agregado inmediatamente después de realizar la irradiación de la ALA-TFD; **1+2+TFD+3**: mismas condiciones que la Figura IV.2. Los datos son la media \pm DE (n = 3 réplicas), realizadas por duplicado. *p < 0,05; frente al control. Test de ANOVA seguido de comparaciones múltiples de Tukey.

En la Figura IV.3 se observa que dependiendo del momento de adición del NaHS, se produjo una variación en el grado de sensibilidad de las células a la ALA-TFD, por lo que se evaluó cada contribución. Estas diferencias se observan también en los valores de DL₅₀ calculados a partir de las curvas de la Figura IV.3, como se detalla en la Tabla IV.2.

Tabla IV.2. DL₅₀ calculadas para las células LM2, a partir de los diferentes tratamientos de la Figura IV.3.

Tratamiento	DL ₅₀ (mJ/cm ²)
TFD	338 ± 21
1 + 2 + TFD + 3	> 1440 mJ/cm ²
1 + TFD	1124 ± 27
2 + TFD	960 ± 29
4 + TFD	364 ± 23
TFD + 3	513 ± 28

Los puntos 1 a 4 corresponden a los diferentes tiempos de administración de NaHS (ver Materiales y Métodos, Figura III.4).

Teniendo en cuenta las curvas y los valores de DL₅₀, la mayor protección se obtiene cuando se administran las 3 dosis de NaHS. Con respecto a las contribuciones individuales, la mayor protección se obtiene con el agregado de NaHS durante 24 h, periodo durante el cual la respuesta antioxidante puede modularse, por ejemplo sintetizando más cantidad de enzimas antioxidantes, o aumentando la cantidad de glutatión. En menor medida pero significativa, se produce protección a la terapia cuando NaHS es agregado junto con ALA, que es incubado 3 h previamente a la irradiación. Durante este tiempo el ALA ingresa al interior de la célula y se generan porfirinas que actuarán como FS durante la ALA-TFD. Una contribución menor está dada por la adición de NaHS post TFD, etapa en la cual se propagan las reacciones de fotooxidación con su consecuente daño celular. Sin embargo, no se observó un efecto sobre la ALA-TFD cuando el NaHS fue agregado inmediatamente antes de la irradiación lumínica, momento en el cual se desencadenan las reacciones de fotooxidación.

En la Figura IV.3 se observa que el agregado de NaHS 10 mM a distintos momentos de la ALA-TFD modifica la eficacia de la misma. Por ejemplo, tanto el agregado de NaHS 24 h antes de la terapia como durante las 3 h de co-incubación con ALA, tienen un efecto similar en la supervivencia de las células a la ALA-TFD (como se observa también en los valores de la DL₅₀ de la Tabla IV.2, que son entre 3 y 2 veces mayores que la DL₅₀ de las células que no recibieron NaHS). El efecto es mayor que si además se agrega

NaHS post ALA-TFD. Finalmente, el agregado del dador antes de comenzar a irradiar, no tiene impacto en la supervivencia de las células en comparación a la ALA-TFD sin NaHS.

Por otro lado, del mismo conjunto de experimentos se desprende que dichas contribuciones son acumulativas: administrar 3 dosis de NaHS tiene mayor efecto que administrar 1 sola dosis a cualquier tiempo estudiado.

En el caso de la co-incubación de ALA 1 mM y NaHS 10 mM, durante las 3 h previas a la irradiación de la ALA-TFD, surgió la necesidad de conocer si existía alguna interacción entre ambas moléculas, ya que no existe descripción en bibliografía, por lo cual se procedió la cuantificación de ambos compuestos y sus posibles interferencias en presencia del otro. Para ello, se realizaron dos determinaciones: cuantificación de ALA en presencia de NaHS 10 mM, y cuantificación de H₂S en presencia de ALA 1 mM (Figura IV.4).

Para la determinación de ALA con el reactivo de Ehrlich en presencia de NaHS, se incubaron por separado cada uno de los reactivos necesarios para la reacción (AA: acetil acetona; Eh: reactivo de Ehrlich; ALA: ácido 5-aminolevilínico), durante 3 horas, y luego se realizó la determinación como ya fue descrito (Materiales y Métodos, III.10).

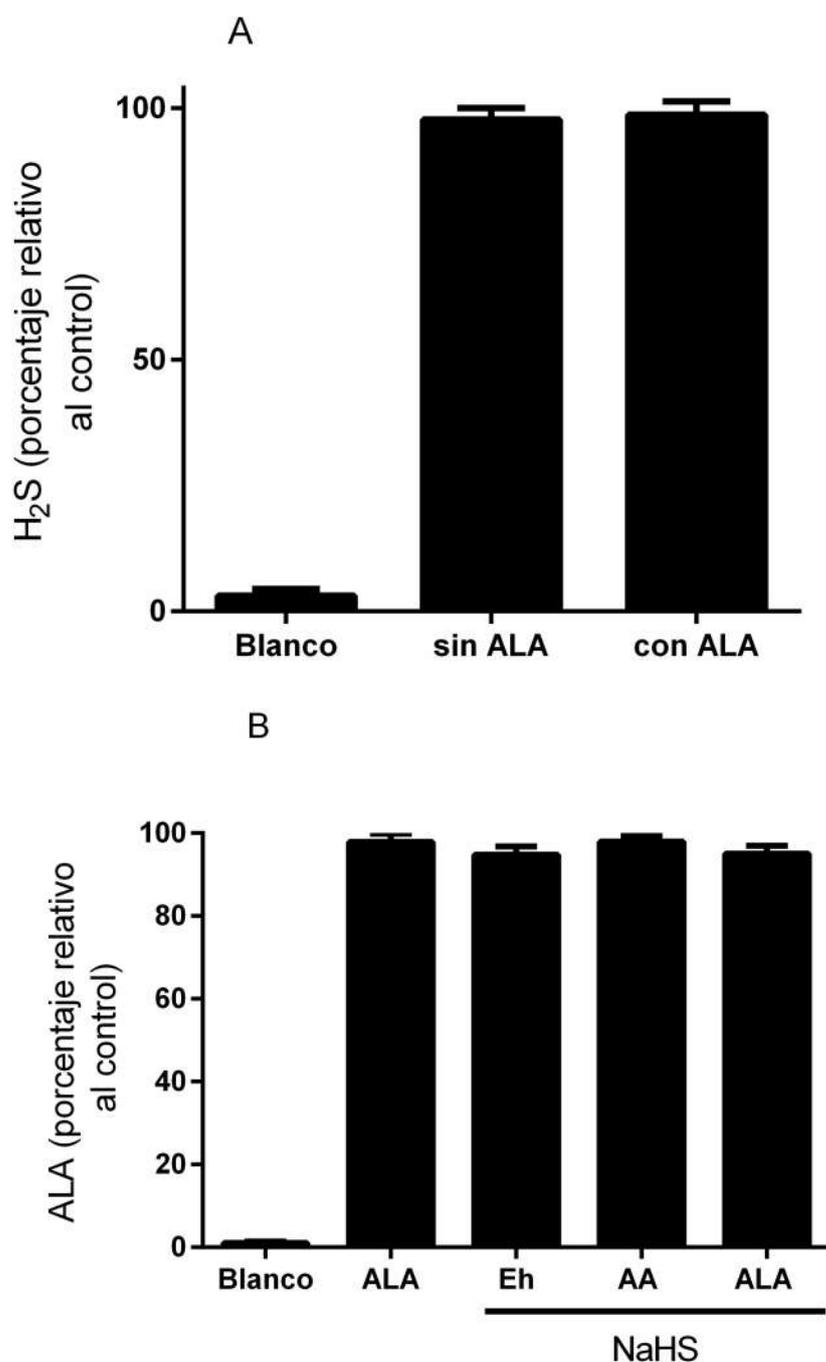


Figura IV.4. A) Cuantificación de H₂S (10 mM) en presencia o ausencia de ALA 1mM, expresado como porcentaje relativo al control (Sin ALA); B) Cuantificación de ALA (0,05 mM) en presencia o ausencia de NaHS 10 mM, expresado como porcentaje relativo al control (ALA). **Blanco**: blanco de reactivo; **ALA**: ALA 0,05 mM; **Eh**: reactivo de Ehrlich; **AA**: acetil acetona. Cada uno de los reactivos se incubó con NaHS 10 mM durante 3h por separado, y luego se realizó la determinación de Ehrlich.

La cuantificación de ALA por el reactivo de Ehrlich no se modificó en ausencia o presencia de NaHS 10 mM. Por otra parte, la determinación de H₂S por formación de azul de metileno tampoco se modificó por la presencia de ALA 1 mM (ver Materiales y Métodos III.10 y III.11).

Aunque no hay reportes sobre la interacción directa entre ALA y NaHS, a partir de dichos ensayos se podría excluir que esta interacción ocurra cuando ambas moléculas se incuban juntas en nuestras condiciones experimentales. Asimismo, no se detectaron cambios en el pH mediados por el NaHS que pudieran modificar las condiciones de la incubación con el ALA. Por todo esto, descartamos que la disminución de la efectividad de la ALA-TFD se deba a la disminución de las moléculas del ALA mediada por el NaHS y de igual manera, el ALA no modifica la acción posible del NaHS.

Considerando que el mecanismo de muerte celular de la TFD es mediado por la producción de EROs, y el NaHS modifica la respuesta a la ALA-TFD en las células LM2, se estudió cómo afecta la adición de NaHS al estado redox de dichas células durante el desarrollo de dicha terapia.

IV.2.1. Efectos del NaHS previos a la ALA-TFD.

IV.2.1.1. Síntesis endógena de GSH y su efecto en la ALA-TFD.

Se evaluó la síntesis de glutatión reducido (GSH) en células LM2 pre-incubadas con diferentes concentraciones de NaHS (0,1 - 10 mM), 24 y 3 h antes de la determinación, y luego del agregado de DL-butionina-(S, R)- sulfoximina (BSO) 200 µM 24 h antes de la determinación. La BSO es un potente inhibidor de la enzima γ-glutamylcisteína sintetasa (GGS) (Britten et al., 1992), enzima clave en la síntesis de GSH. Se observó que BSO produce una disminución en la síntesis del GSH (ver Figura I.2.9).

En la Figura IV.5 se observan los resultados de los niveles intracelulares de GSH en células LM2. Las células LM2 elevan sus niveles de GSH por encima de los niveles del control (aproximadamente en un 20%), solo al ser pre-incubadas con 10 mM NaHS,

mientras que en presencia de BSO, los niveles intracelulares de GSH disminuyen por debajo de 77% del valor del control.

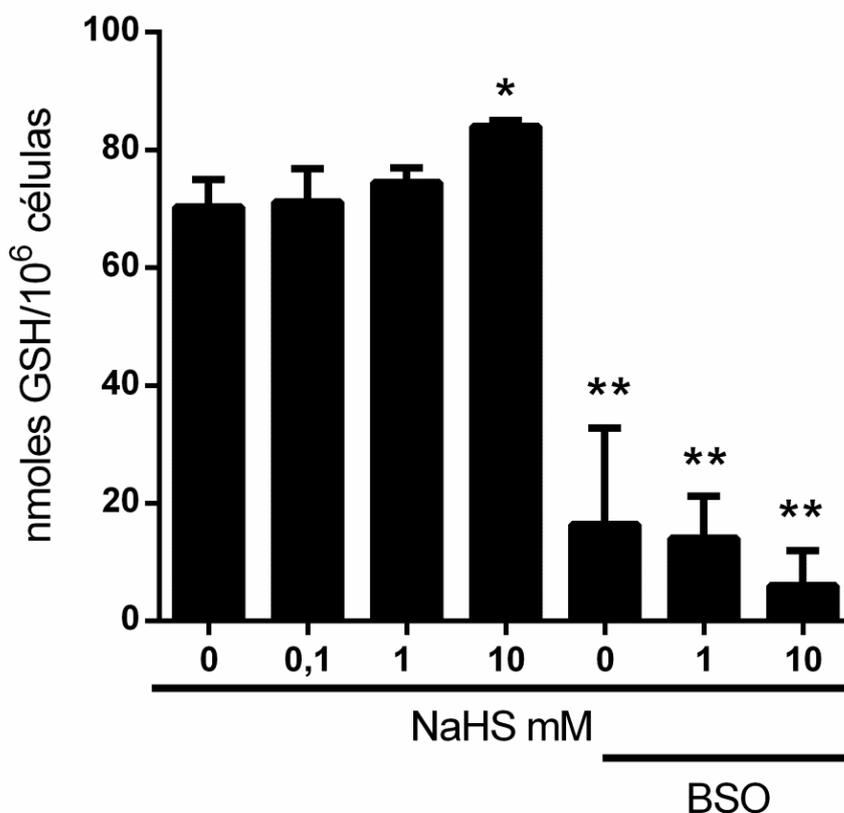


Figura IV.5. Síntesis de glutatión reducido (GSH) intracelular en células LM2, efecto del NaHS (0,1-10mM) con o sin BSO (200 μ M). Los datos son la media \pm DE (n = 4 réplicas), realizadas por duplicado. *p <0,05 y **p <0,01 frente al control sin NaHS ni BSO. Test de ANOVA seguido de test de Dunnett.

La presencia de BSO inhibe a la enzima GGS (Figura I.2.9), independientemente de una putativa inducción de GGS o mayor ingreso del sustrato L-cisteína a la célula por efecto del NaHS (Kimura, 2015). Por ello no se observa el aumento en la síntesis de los niveles de GSH en ninguna de las condiciones, cuando el BSO está presente.

Como ya se describió en la sección anterior (Figura IV.3), el agregado de NaHS durante 24 h antes de la ALA-TFD ejerce un efecto protector parcial frente al ALA-TFD. Por tal motivo, se buscó evaluar la participación de la síntesis de GSH endógeno en la respuesta a la ALA-TFD en células LM2. Bajo las mismas condiciones experimentales, el agregado de BSO 200 μ M 24 h antes de la ALA-TFD, solo o junto con NaHS, provoca un aumento de la muerte celular. Las curvas de supervivencia celular bajo estos tratamientos se muestran en la Figura IV.6.

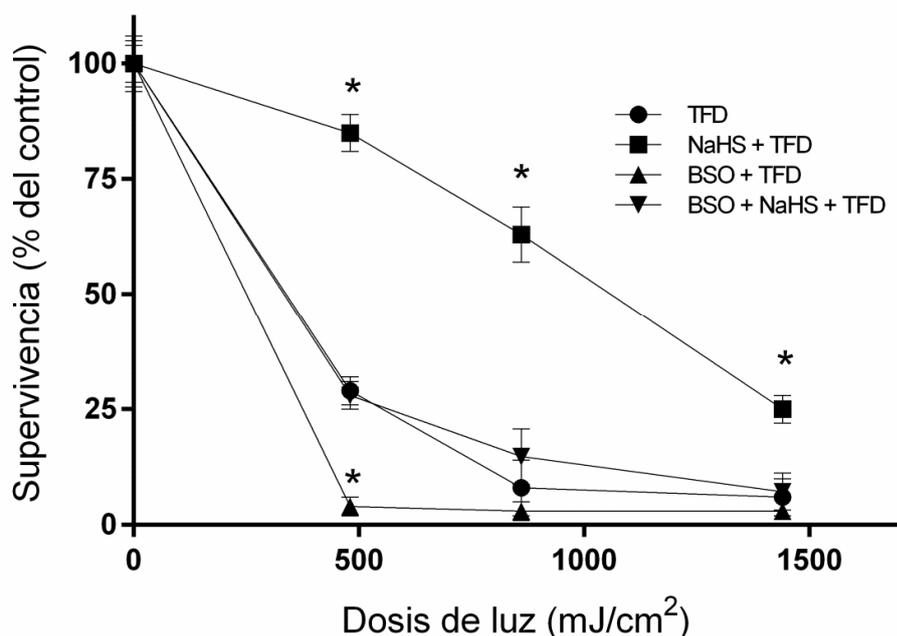


Figura IV.6. Supervivencia de células LM2 sometidas a ALA-TFD, luego de haber sido incubadas 24 h antes de la ALA-TFD con NaHS 10 mM, con BSO 200 μ M o con NaHS 10 mM + BSO 200 μ M. Los datos son la media \pm DE (n = 4 réplicas), realizadas por duplicado. *p <0,05 frente TFD. Test de ANOVA seguido de comparaciones múltiples de Tukey.

Como se desprende de la Figura IV.5, los niveles de GSH luego de la incubación con BSO y con BSO + NaHS son muy bajos, por lo que las células se encuentran más vulnerables frente al daño oxidativo producido por la ALA-TFD. Esto sugiere además, que la presencia del GSH juega un papel clave en la protección de células frente al daño oxidativo generado por la ALA-TFD, lo que es coherente con el conocimiento

general de que el GSH es una de las principales moléculas de la defensa antioxidante en las células (Uhlig y Wendel 1992; Perotti et al., 2002; Ballatori et al., 2009).

En concordancia con los niveles sintetizados de GSH (Figura IV.5), las células pre-incubadas con NaHS 24 h antes de la ALA-TFD mostraron una supervivencia mayor que las células que recibieron ALA-TFD sin NaHS. Por otro lado, las células pre-incubadas con BSO mostraron una mortalidad similar, pero alcanzaron la muerte total a menor dosis de luz que las células que sólo recibieron ALA-TFD. Con respecto a la combinación de BSO y NaHS 10 mM, el agregado del dador no logra contrarrestar el efecto del BSO (Figura IV.6).

Estas diferencias se ven reflejadas en las DL_{50} (Tabla IV.3) calculadas a partir de las curvas de la Figura IV.6. La DL_{50} para las células tratadas con NaHS es aproximadamente 3,5 veces mayor que las que no recibieron NaHS, y 4,5 veces mayor que la de las células tratadas con BSO, dando cuenta de la magnitud del efecto protector que posee el NaHS frente a la ALA-TFD en las células LM2.

Tabla IV.3. DL_{50} calculados para las células LM2, a partir de los correspondientes tratamientos de la Figura IV.6.

Tratamiento	DL_{50} (mJ/cm ²)
TFD	338 ± 21
NaHS 10 mM + TFD	1124 ± 27
BSO 20 μM + TFD	250 ± 18
BSO + NaHS + TFD	366 ± 17

IV.2.1.2. Síntesis endógena de H₂S y su efecto en la ALA-TFD.

Se estudió también el efecto de la síntesis endógena de H₂S a partir de L-cisteína 10 mM. Antes de comenzar esta serie de experimentos, adaptamos y las condiciones de nuestros cultivos celulares el método descrito por Kartha et al. (2012), para medir la

producción de H₂S por las células en cultivo, sin interferencia de otros tioles (ver Materiales y Métodos III.16).

En la Figura IV.7 se muestran los resultados obtenidos a partir de 2000 nmoles/pocillo de NaHS en el medio de cultivo. Se calculó el H₂S atrapado por evaporación espontánea a 37°C y el remanente en el medio de cultivo a diferentes tiempos.

Durante la validación de la técnica se pudo determinar que prácticamente el 100% del H₂S generado por el NaHS se volatiliza al cabo de una hora, es decir que se obtuvieron tiempos de eliminación del H₂S en nuestras condiciones de trabajo similares a los reportados en trabajos previos (Predmore et al., 2012).

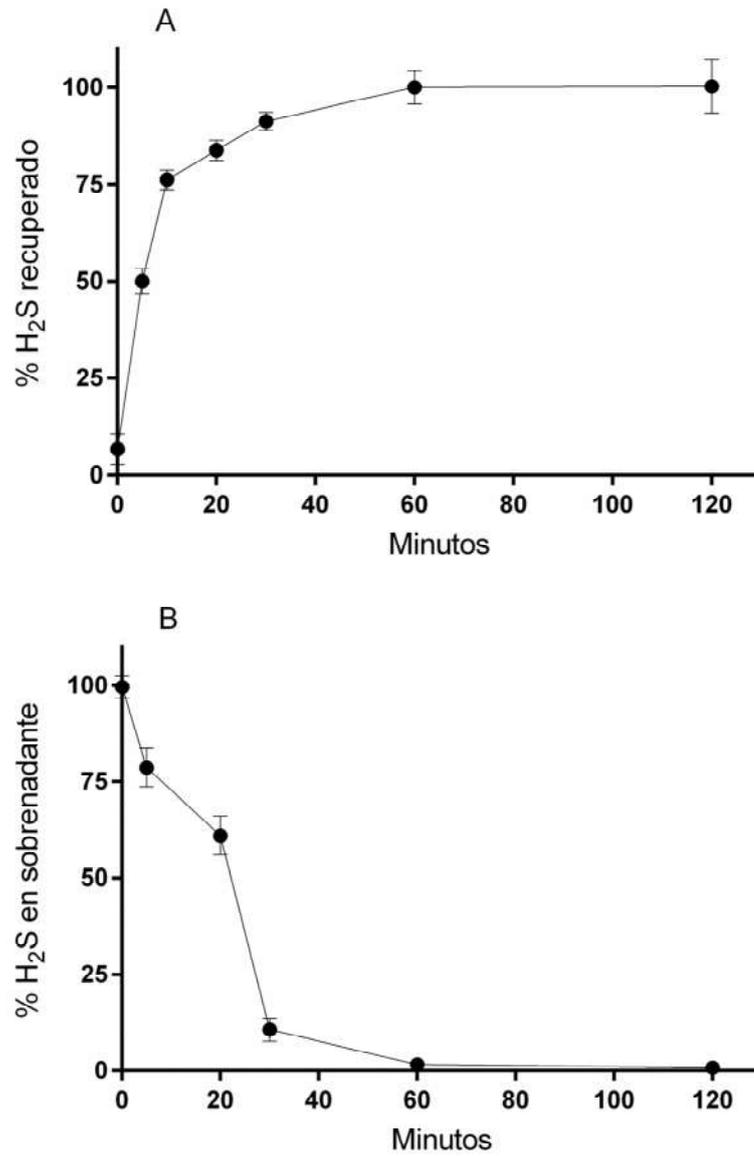


Figura IV.7. Determinación del H₂S generado a partir de 2000 nmoles/pocillo de NaHS. A) Evaporación espontánea de H₂S y captado por el agar alcalino. B) Remanente de H₂S en el medio de cultivo. El H₂S se determinó según lo descrito en Materiales y Métodos, ítem III.16.

Se determinó la síntesis y acumulación de H₂S durante 24 h en las células LM2, estimulada a partir de L-cisteína 10 mM, y en presencia de distintos inhibidores de las enzimas productoras de H₂S, Figura IV.8.

Cuando se agrega L-cisteína 10 mM al medio de cultivo, luego de 24 h, se observa un incremento de la síntesis y acumulación de H₂S de aproximadamente dos veces y media respecto al control sin L-cisteína (el medio de cultivo contiene L-cistina 0,2 mM). También se observa el efecto de los distintos inhibidores de las enzimas involucradas en la generación de H₂S endógena en presencia de L-cisteína 10 mM: L-aspartato 10 mM (Asp) inhibidor de la CAT/3MST, ácido aminooxacético 1 mM (AOA) inhibidor de la cistationina β-sintasa, (CBS), y propargilglicina 10 mM (PAG) inhibidor de la cistationina γ-liasa, (CSE) (Kimura, 2010).

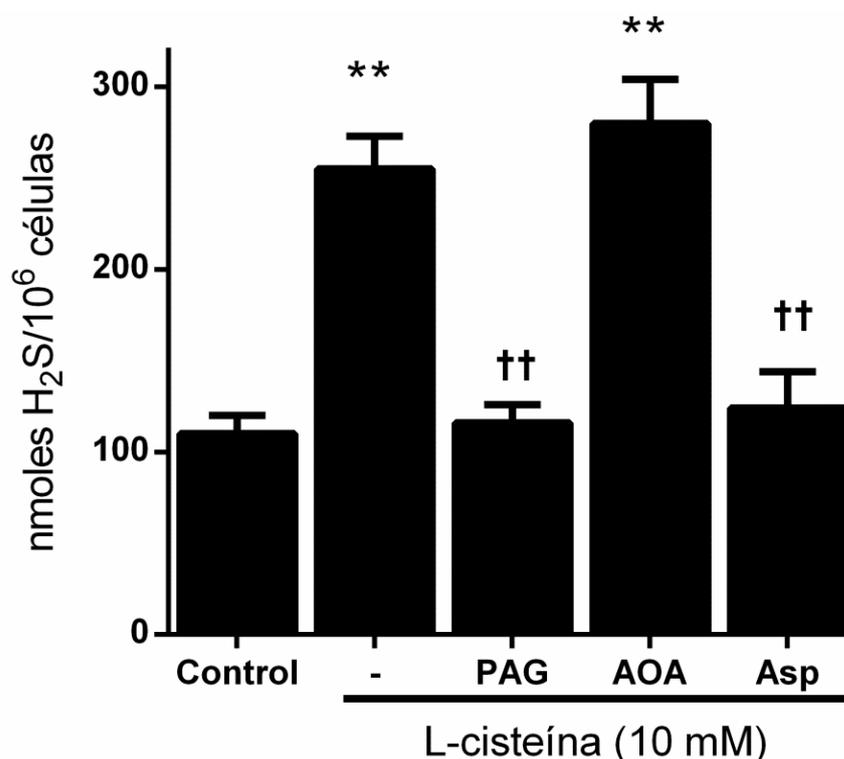


Figura IV.8. Síntesis endógena y acumulación de H₂S durante 24 h en células LM2 en ausencia o presencia de L-cisteína 10 mM, y el agregado de inhibidores de las enzimas de la síntesis. L-aspartato 10 mM (Asp) inhibidor de la CAT/3MST, ácido aminooxacético 1mM (AOA) inhibidor de la cistationina β-sintasa, (CBS), y propargilglicina 10 mM (PAG) inhibidor de la cistationina γ-liasa, (CSE). El control corresponde a células sin L-cisteína y sin inhibidores. Los datos son la media ± DE (3-4 réplicas), realizadas por duplicado. **p <0,01 frente al control; ††p <0,01 frente a L-cisteína 10 mM. ANOVA seguido de Test de Tukey.

Estos resultados sugieren que la síntesis endógena de H₂S, a partir de L-cisteína 10 mM en la línea celular LM2, es producida principalmente por las enzimas CAT/3MST y CSE.

Posteriormente se evaluó el efecto de la generación o inhibición del H₂S endógeno en la supervivencia de las células sometidas a la ALA-TFD (Figura IV.9). Como inhibidores de la síntesis de H₂S, se utilizaron Asp y PAG (Figura IV.8). En presencia de L-cisteína 10 mM 24 h antes de la ALA-TFD, la supervivencia celular es mayor que en su ausencia. Esto está de acuerdo con el efecto observado al agregar H₂S exógeno. Por otro lado, la co-incubación de L-cisteína junto con Asp no mostró diferencias con respecto a la incubación con L-cisteína. No se observan diferencias al aplicar el ALA-TFD con células

pre-incubadas con L-cisteína y Asp 10 mM 24 h antes de la ALA-TFD, a pesar que dicha combinación de aminoácidos disminuye los niveles de H₂S sintetizado. La co-incubación de L-cisteína con PAG 10 mM 24 h antes de la ALA-TFD, resulta altamente tóxica para las células.

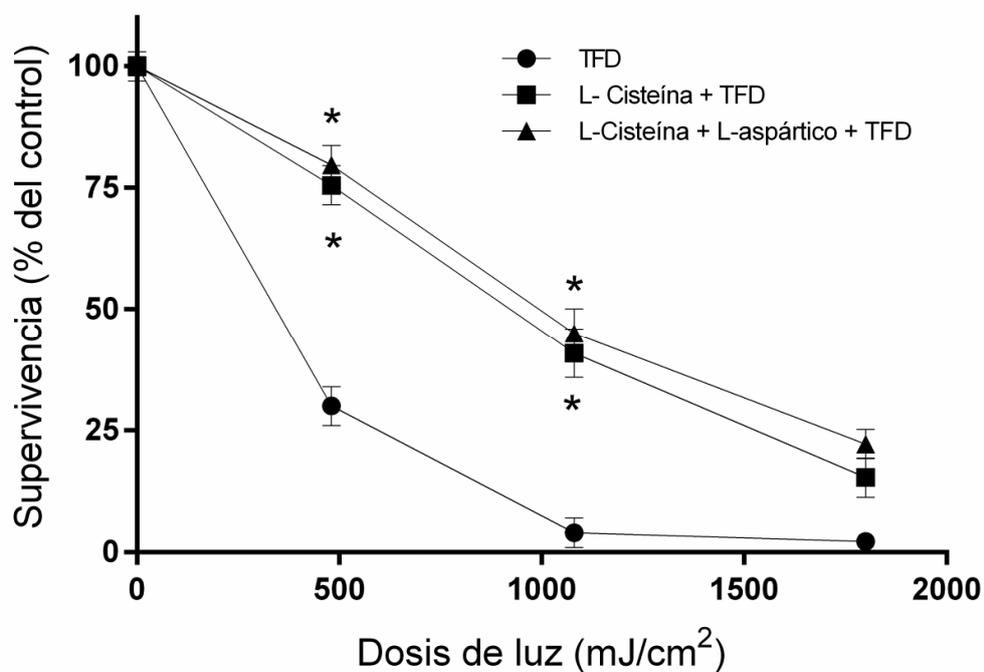


Figura IV.9. Respuesta a la ALA-TFD de células LM2 incubadas 24 h con o sin 10 mM de L-cisteína y con o sin inhibidor de la síntesis, L-aspártico 10 mM, inhibidor de la CAT/3MST. El control corresponde a la ALA-TFD. Los datos son la media \pm DE (3 muestras), realizadas por duplicado. *p < 0,05 frente a TFD. ANOVA seguido de Test de Tukey. En los experimentos con L-cisteína, el medio de cultivo fue reemplazado por medio fresco, antes del ensayo de MTT.

Las DL₅₀ correspondientes a los diferentes tratamientos representados en la Figura IV.9, se muestran en la Tabla IV.4.

Tabla IV.4. DL₅₀ calculadas para las células LM2, a partir de los correspondientes tratamientos de la Figura IV.9.

Tratamiento	DL ₅₀ (mJ/cm ²)
TFD	343 ± 31
L-cisteína 10 mM	922 ± 46
L-cisteína 10 mM + L-aspártico 10 mM + TFD	994 ± 49

Es de remarcar, que hasta la actualidad no se encuentran inhibidores específicos de las enzimas de la síntesis endógena de H₂S.

La L-cisteína hace que las células LM2 sean menos sensibles al tratamiento fotodinámico, esto se refleja en un DL₅₀ de casi el triple del control (Tabla IV.4). Una de las posibles causas sería que el H₂S generado endógenamente a partir de la L-cisteína, también protegería a las células LM2 de la ALA-TFD. Sin embargo, la inhibición de la enzima CAT/3MST por L-aspártico no genera mayor muerte celular; posiblemente porque la enzima CSE, produce los niveles de H₂S mínimos y necesarios para la protección.

IV.2.1.3. Efecto del NaHS en la síntesis de porfirinas.

En un protocolo típico de TFD, se incuban las células durante un tiempo determinado con el FS o con el pro-FS. Esto le da tiempo a las células para incorporar el FS del medio de cultivo y que se acumule, o bien de incorporar el pro-FS y transformarlo en FS activo. Cuanta mayor cantidad de FS se acumula dentro de las células, mayor será el efecto de la TFD a una misma dosis de luz, ya que habrá más moléculas de FS disponibles para ejercer su efecto cuando entren en contacto con la luz.

En el caso de la ALA-TFD, las células LM2 se incuban durante 3 h con ALA 1 mM como pro-FS, esto permite la síntesis de porfirinas y en particular la Pp IX, que es la que posee mayor efecto FS entre las porfirinas biosintetizadas en el camino de hemo. Aprovechando la propiedad de las porfirinas de emitir fluorescencia, se determinó

semi-cuantitativamente la acumulación de porfirinas en las células LM2 incubadas durante 3 h con ALA 1 mM en medio sin suero (condiciones estándar de ALA-TFD), y con diferentes concentraciones de NaHS (0,1-10 mM) 24 y 3 h antes de la determinación (en las flechas negras 1 y 2 de la Figura III.4). La detección de porfirinas se realizó a través de microscopía de fluorescencia. En la Figura IV.10 se muestran fotografías representativas de cada tratamiento en campo claro y fluorescencia roja característica de las porfirinas; mientras que en la Figura IV.11 se muestra un gráfico de intensidad de fluorescencia relativizado al área celular de cada imagen.

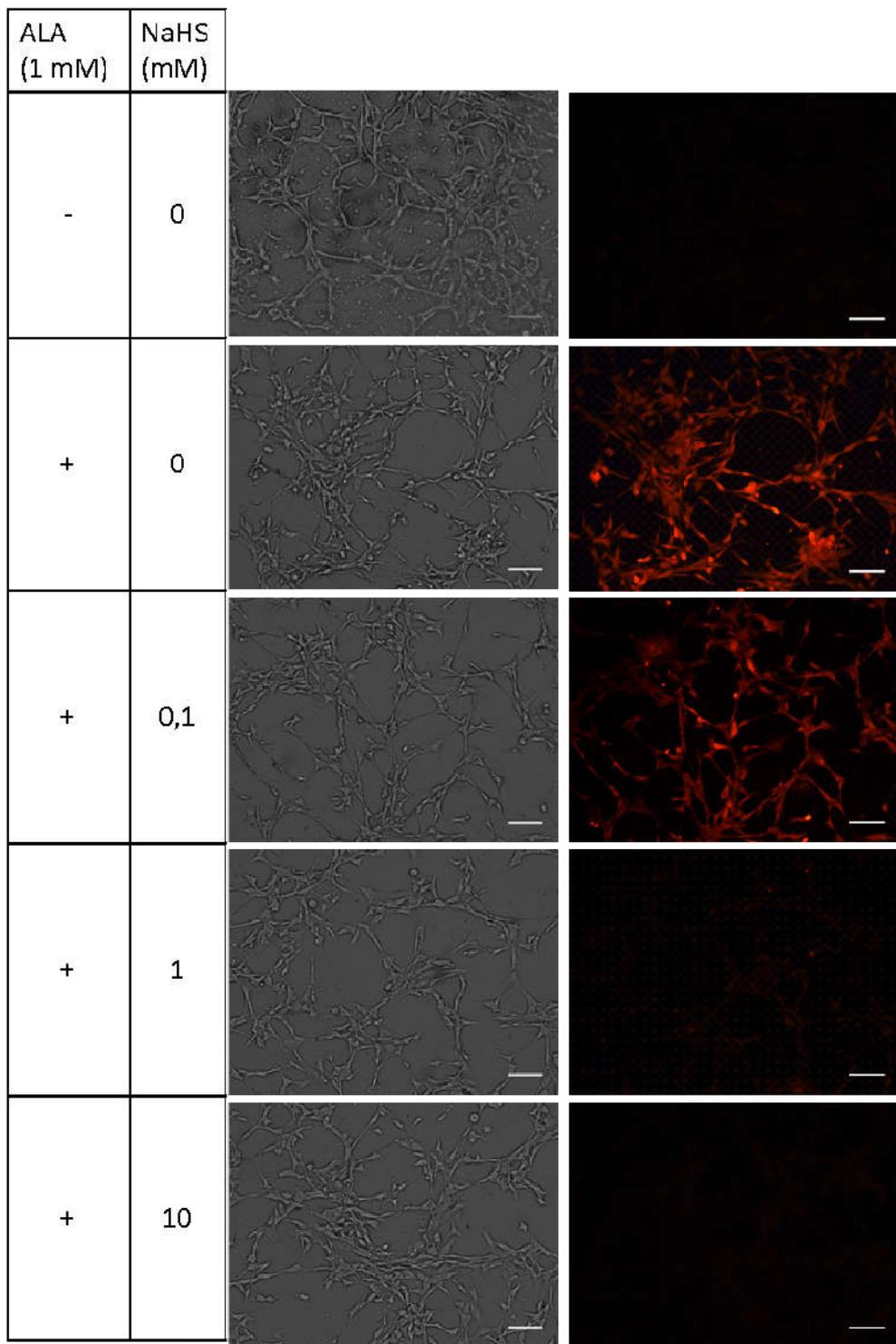


Figura IV.10. Imágenes de microscopía de campo claro (izquierda) y de fluorescencia roja (derecha) de células LM2 incubadas 3h con ALA 1 mM en medio sin suero, y diferentes concentraciones de NaHS (0,1-10 mM). Se muestran fotografías representativas de cada tratamiento. La barra de escala representa 50 μ m.

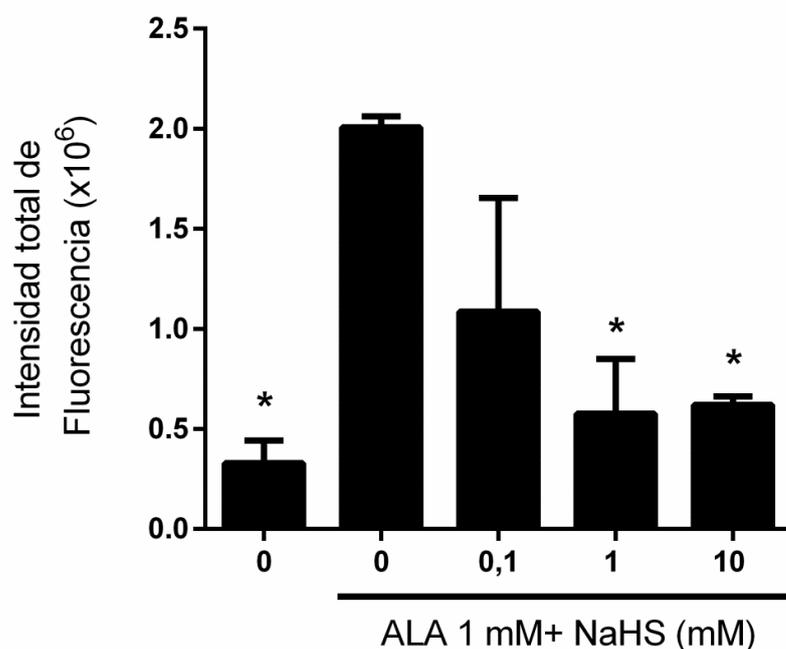


Figura IV.11. Intensidad de fluorescencia de las porfirinas sintetizadas a partir de 3 h de incubación con ALA 1 mM cuantificadas de las imágenes y relativizada al área celular de la fotografía de la Figura IV.10. El análisis se realizó con el software *Fiji*[®]. Los datos son la media \pm DE (3 réplicas), *p <0,05 frente a las células tratadas con ALA 1 mM sin NaHS. ANOVA y posterior Test de Dunnett.

La intensidad de fluorescencia disminuye significativamente a partir de concentraciones de NaHS 1 mM, con respecto a las células incubadas con ALA 1 mM sin NaHS. Este último resultado indicaría que el NaHS inhibe la síntesis y acumulación de porfirinas a partir de ALA en la línea celular LM2.

La disminución en la generación endógena de porfirinas parece ser otro factor importante que contribuye a que la ALA-TFD sea menos eficiente en presencia de NaHS, ya que reduciría la cantidad de FS que se generó endógenamente en las células LM2 incubadas con ALA 1 mM.

IV.2.1.4. Efecto directo del NaHS sobre algunas EROs.

Se determinó la influencia del NaHS sobre la capacidad oxidante total (Materiales y Métodos III.17), utilizando peróxido de hidrógeno, en un sistema *in vitro* sin componentes celulares.

Se pudo observar una disminución significativa en los niveles de EROs en presencia de diferentes concentraciones de NaHS (0,05 - 1 mM), lo que muestra una relación directa en la eliminación de diferentes EROs generados por el NaHS (Figura IV.12).

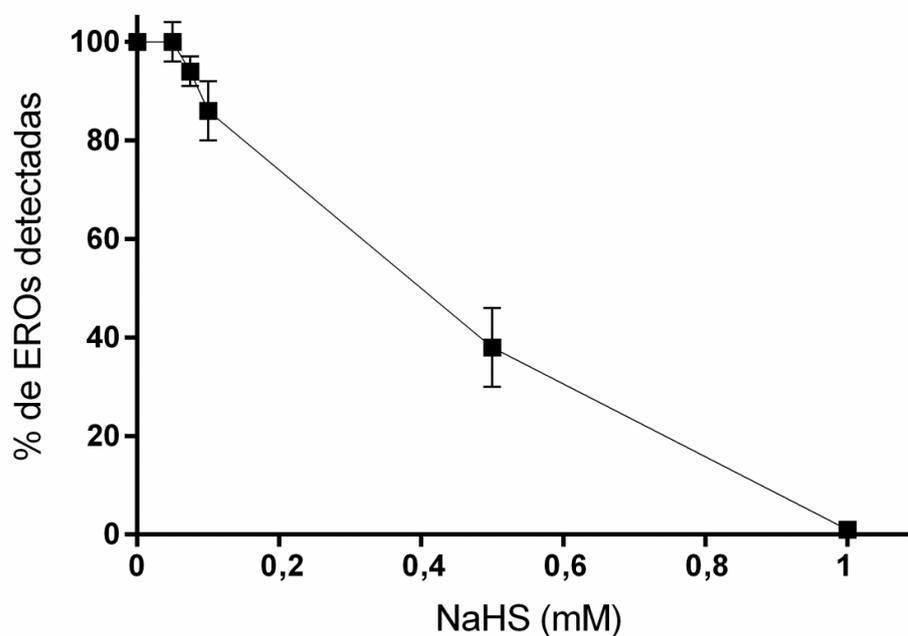


Figura IV.12. Capacidad oxidante como porcentaje de EROs determinadas en función de la concentración de NaHS (0,05 - 1 mM) respecto al control sin NaHS. El ensayo se realizó en un sistema libre de células.

Si bien existe abundante bibliografía acerca de la capacidad del H_2S de reaccionar con diferentes EROs (Du et al., 2013; Murphy et al., 2019), no se encontraron reportes acerca de la interacción directa del H_2S con el oxígeno singlete (1O_2), la principal especie producida durante la TFD (Weishaupt et al., 1976).

Se procedió a realizar un ensayo donde se generó $^1\text{O}_2$ en un sistema *in vitro* sin células detectando la presencia de $^1\text{O}_2$ con una sonda fluorescente específica para $^1\text{O}_2$, *Singlet Oxygen Sensor Green*[®] (SOSG, Invitrogen, USA), según fue descrito en Materiales y Métodos III.18.

Inicialmente se realizó el experimento con el FS azul de toluidina (AT) para generar $^1\text{O}_2$ y se observó una curva descendente en la medida que la concentración de NaHS aumenta (Figura IV.13).

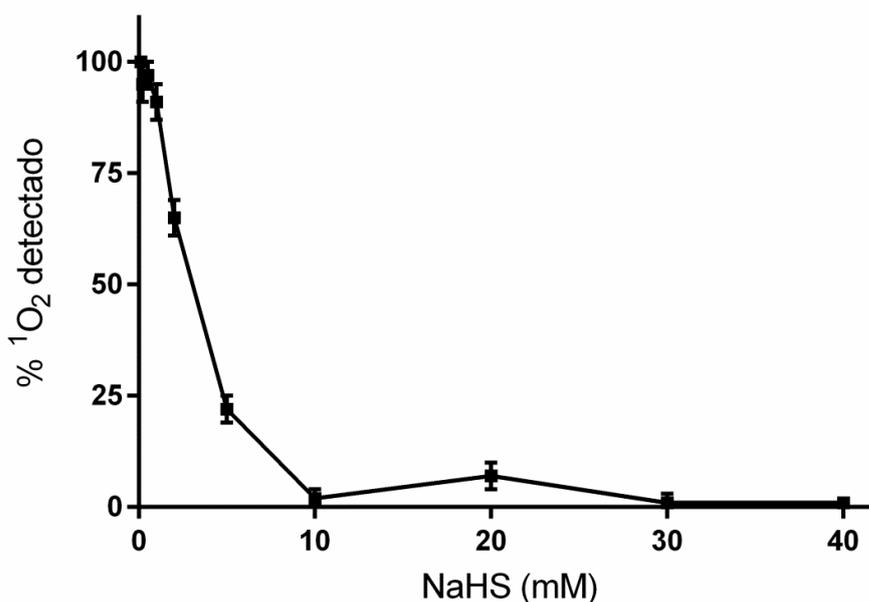


Figura IV.13. Porcentaje de $^1\text{O}_2$, generado a partir AT 20 μM , en función de la concentración de NaHS (0,1 - 40 mM). Los experimentos se realizaron en sistemas libres de células por triplicado según fue descrito en Materiales y Métodos, III.18.

Recientemente fue reportado que el azul de metileno reacciona con H_2S , reduciéndose y revirtiendo los efectos tóxicos del gas (Haouzi et al., 2019). Teniendo en cuenta que tanto el azul de metileno como el AT utilizado en este experimento, son moléculas muy similares estructuralmente (Figura IV.14) y para evaluar posibles reacciones químicas entre el AT y el H_2S que cambien su espectro de absorción, se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad, una solución de AT (20 μM)

con o sin NaHS (0,1-40 mM) y posteriormente se midieron los espectros de absorción de la mezcla entre 450 y 750 nm. En la Figura IV.15 se muestran los resultados obtenidos.

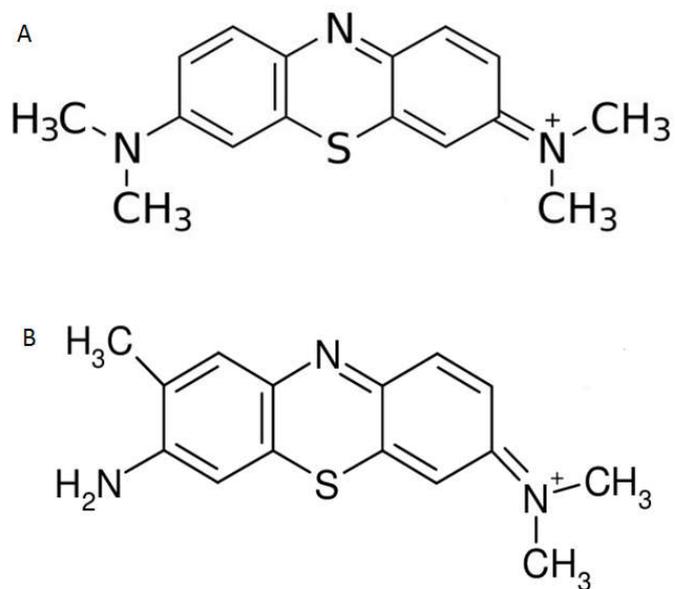


Figura IV.14. Estructuras químicas: A) azul de metileno. B) azul de toluidina.

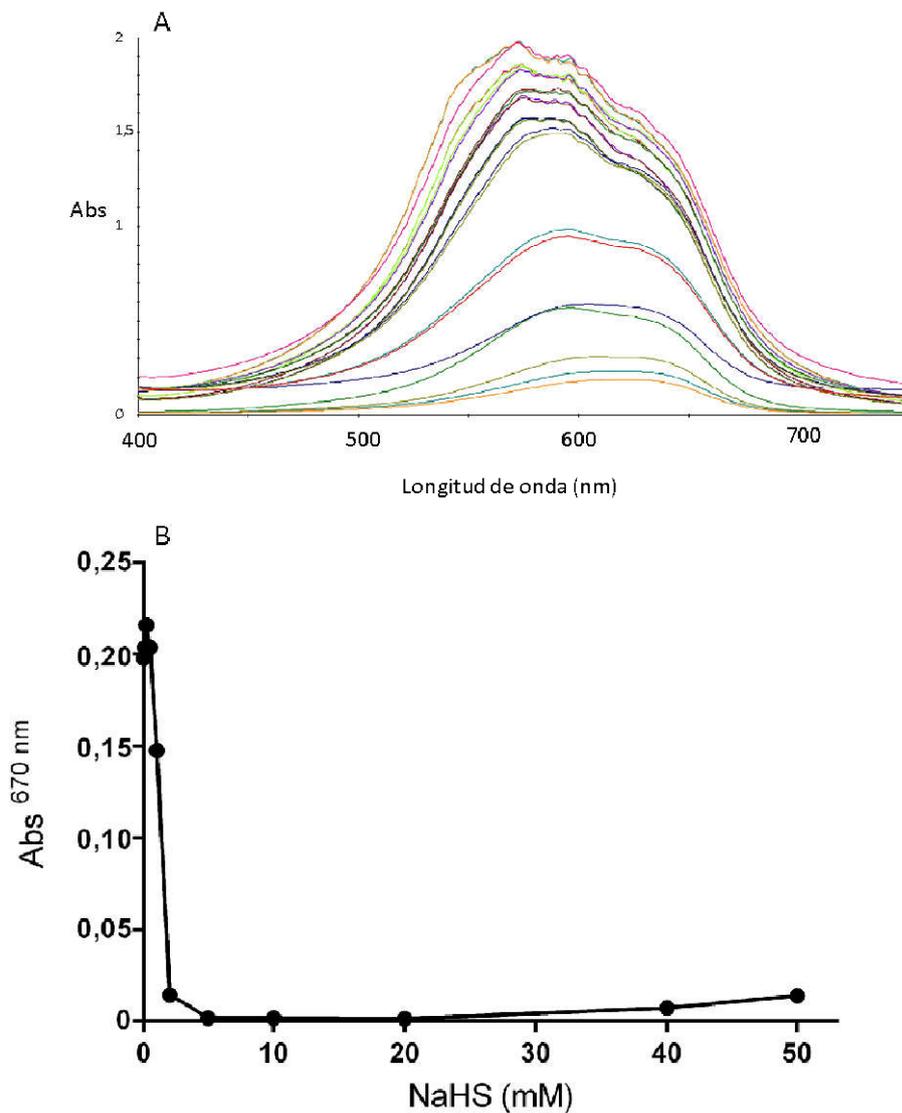


Figura IV.15. A) Espectros de absorción entre 450 y 750 nm del AT (20 μM) incubado durante 30 min a temperatura ambiente con distintas concentraciones de NaHS (0,01 - 50 mM). B) Absorbancia a 670 nm del AT (20 μM) en función de la concentración de NaHS (0,01 - 50 mM).

Se observa que la absorbancia del AT a 670 nm, disminuye a medida que se incrementa la concentración de NaHS, como muestra la Figura IV.15 B). Esta podría ser la causa de que el AT vaya perdiendo su capacidad fotosensibilizante en presencia del NaHS. Los resultados de la Figura IV.13 demuestran que la respuesta al tratamiento fotodinámico está dada por infinidad de factores. AT puede ser un FS eficaz pero en presencia de NaHS/H₂S sería menos óptima la terapia, no por efecto del H₂S sobre la célula sino directamente por una acción química sobre el compuesto

fotosensibilizante. Es importante en este estudio poder discernir entre el efecto del H₂S sobre la terapia o directamente sobre el compuesto fotosensibilizante.

De todas maneras, era necesario conocer si el efecto del NaHS en células LM2 tratadas con ALA-TFD era reproducible con otros FS. Es así que se decidió repetir el mismo ensayo con otros dos FS: Ce6 y PII (Figura IV.16). Para ambos compuestos se realizaron los controles necesarios para garantizar que no sufren modificaciones en sus capacidades al ser co-incubados con NaHS y en presencia de luz.

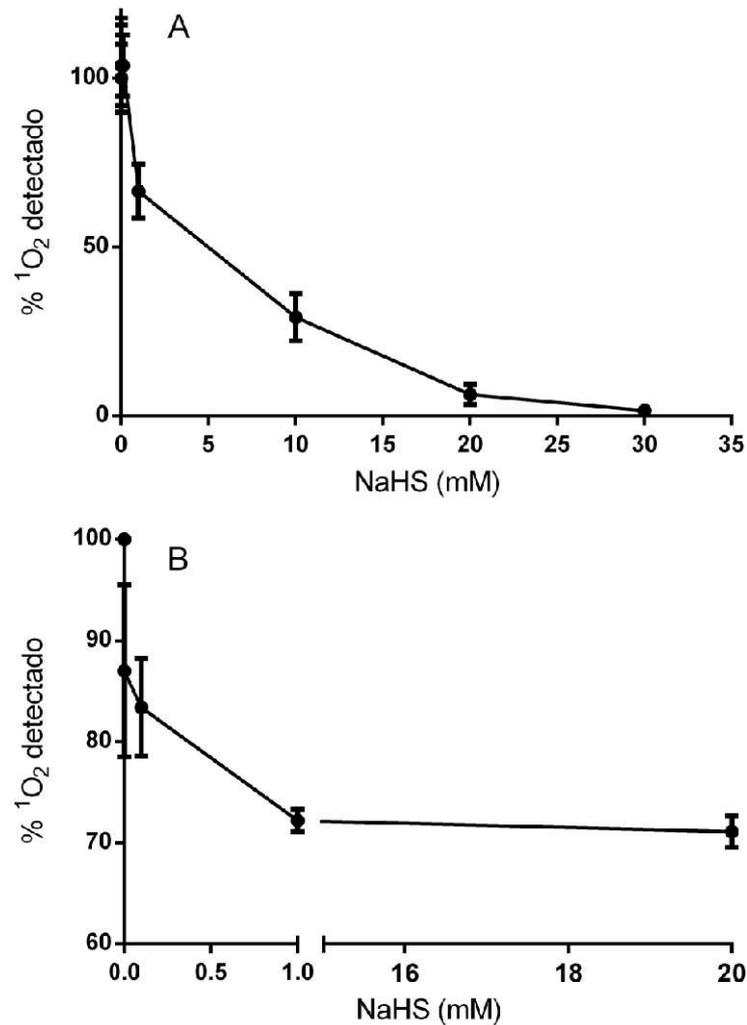


Figura IV.16. Porcentaje de ¹O₂, generado a partir Ce6 2 μM (A) y PII 20 μM (B), en función de la concentración de NaHS. Los experimentos se realizaron en sistemas libres de células por triplicado según fue descrito en Materiales y Métodos.

Al utilizar ambos FS, se observa una disminución en la señal fluorescente de la *SOSG* conforme se incrementa la concentración de NaHS, siendo más drástica para Ce6, lo que indica una menor presencia de ¹O₂ en el sistema. Esto pone de manifiesto la capacidad del H₂S de actuar directamente como secuestrante de ¹O₂, siendo este el primer reporte bibliográfico de esa propiedad. Los derivados de Ce6 han sido aprobados para varios tipos de cáncer por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) (Agostinis et al., 2011).

La Figura IV.17 muestra la capacidad protectora del NaHS durante el tratamiento fotodinámico de células LM2 independientemente de la contribución de su efecto en la disminución de síntesis de porfirinas a partir de ALA. Para ello, las células fueron sometidas a la TFD utilizando Ce6 como FS (Ce6-TFD). La Ce6 es un FS *per se*, es decir que no requiere una conversión enzimática, como si lo requiere el pro-FS, ALA, para generar el FS Pp IX. Además, la molécula Ce6 no pierde su potencial como fotosensibilizante ante la presencia de NaHS, como se pudo corroborar en los controles del ensayo de detección de $^1\text{O}_2$ (datos no mostrados).

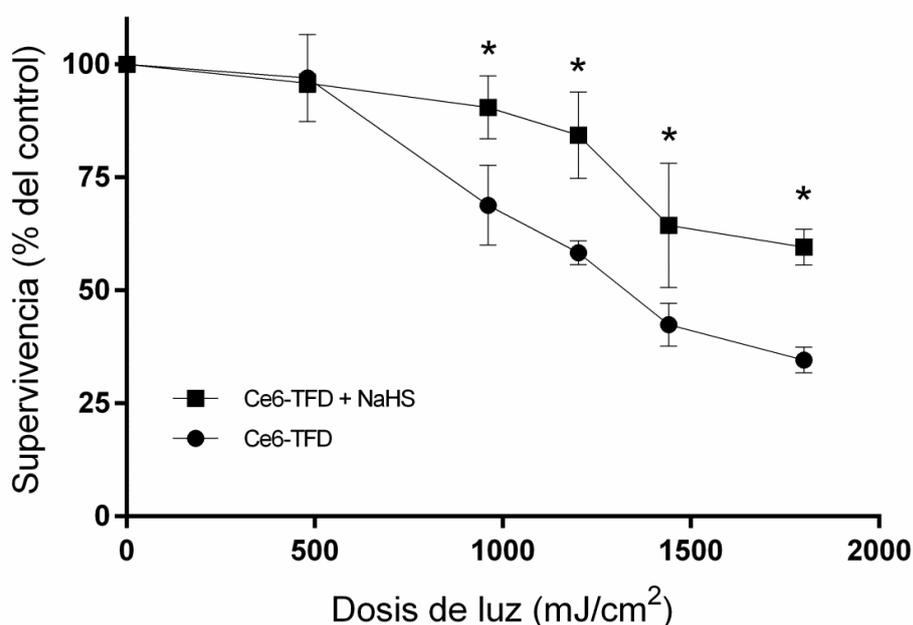


Figura IV.17. Respuesta de las células LM2 a la Ce6-TFD. Las células se incubaron con Ce6 2 μM en medio sin suero durante 3 h y fueron irradiadas durante distintos tiempos. Las células se incubaron 3 tiempos con NaHS 10 mM, 24 y 3 h antes de la irradiación, y post irradiación. Al cabo de 19 h se realizó el ensayo de MTT (mismas condiciones que la Figura IV.2). Los valores se expresan como porcentaje respecto del control sin irradiación, y representan la media \pm DS de 3 réplicas independientes realizadas por duplicado. * $p < 0,05$ respecto al Ce6-TFD y posterior Test de Tukey.

Las DL_{50} correspondientes son: $1371 \pm 37 \text{ mJ/cm}^2$ para control LM2 y $> 1800 \text{ mJ/cm}^2$ para NaHS 10 mM.

Se observa que en las células tratadas con NaHS 10 mM hay una supervivencia del 58%, mientras que a la misma dosis de luz, el porcentaje de supervivencia en las células que no recibieron NaHS es de 34%.

Los resultados de Ce6-TFD muestran que las células LM2 son menos sensibles a Ce6-TFD en presencia de NaHS 10 mM. Esta diferencia se manifiesta en que no se alcanza la DL_{50} en las células que recibieron NaHS. Es decir que, en ese tratamiento, no fue posible eliminar el 50 % de las células ni con la mayor dosis de luz utilizada. La incubación de células LM2 con NaHS 10 mM durante Ce6-TFD conferiría una mayor resistencia al tratamiento. Las incubaciones de NaHS se realizaron en las 3 dosis consecutivas, respetando los mismos tiempos de administración que se utilizaron para los tratamientos con ALA-TFD, representados en la Figura IV.2.

Este resultado concuerda con la tendencia que se observa en los resultados antes descritos en la Figura IV.16, y es que el NaHS, o mejor dicho el H_2S generado a partir del dador, tiene un efecto citoprotector frente al daño oxidativo generado durante la Ce6-TFD o la ALA-TFD. Existe abundante bibliografía acerca de la protección al daño oxidativo evocada por H_2S en diferentes modelos y tejidos (Elrod et al., 2007; Blackstone y Roth, 2007; Esechie et al., 2008; Florian et al., 2008; Henderson et al., 2010; Fox et al., 2012; Bos et al., 2013). La protección frente al daño oxidativo provocado por la TFD, complementarían dichos reportes.

IV.2.1.5. Efecto del NaHS post ALA-TFD.

Una de las maneras de evaluar el daño oxidativo es a partir de los niveles de oxidación en macromoléculas, que pueden ser lípidos de membrana, proteínas celulares, o el ADN.

Para tal fin, se determinó el daño a proteínas, evaluados mediante una adaptación del ensayo espectrofotométrico de cuantificación de carbonilos por la 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH) (ver Materiales y Métodos III.21).

Las células LM2 fueron expuestas a ALA-TFD y tratadas en tres tiempos, con diferentes concentraciones de NaHS (0,1 - 10 mM) en las condiciones de la Figura IV.2, y 4 h después de la irradiación, se determinó la presencia de grupos carbonilos en las células.

El tiempo de 4 h fue elegido por ser el máximo tiempo post ALA-TFD durante en cuál no se observa una disminución de la viabilidad de las células por el método de MTT (Denzinot y Lang, 1986). Es decir, el tiempo máximo en el que está ocurriendo daño oxidativo antes de que tenga una correspondencia con la muerte celular, lo que permitía ver el mayor grado de daño oxidativo posible en las proteínas.

La Figura IV.18 muestra un aumento en los niveles de proteínas oxidadas 4 h después de la ALA-TFD cuando se usa ALA 1 mM, en comparación con el control sin ALA o sin irradiación de luz (dato no mostrado). Esto concuerda con resultados anteriores, que indican un aumento en la peroxidación lipídica en tumores luego de la ALA-TFD (Casas et al., 1997).

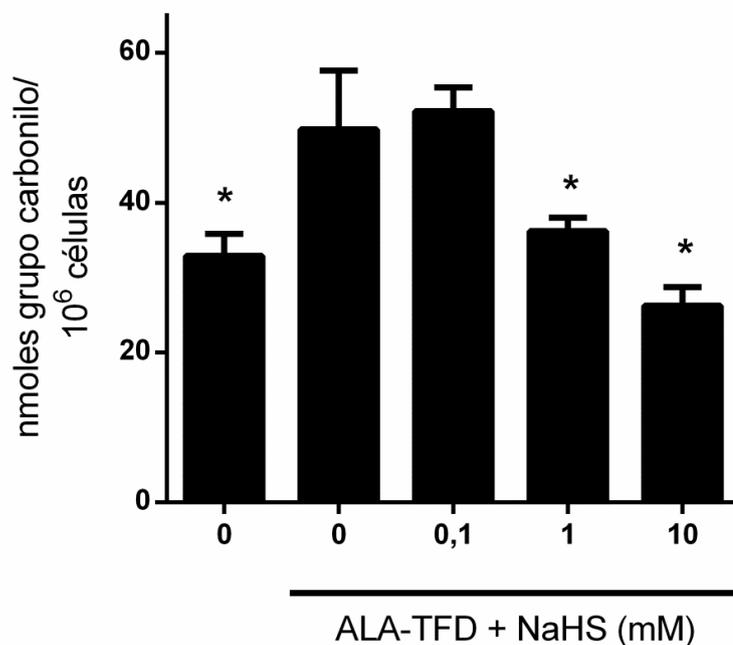


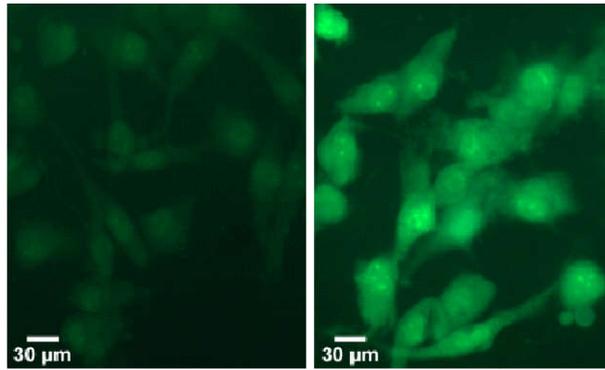
Figura IV.18. Oxidación de proteínas en células LM2 luego de ALA-TFD con diferentes concentraciones de NaHS (0,1 - 10 mM). Determinación realizada a partir de la formación de grupos carbonilos según fue descrito en Materiales y Métodos. Los datos son la media \pm DE (3 muestras), realizadas por duplicado, *p <0,05 con respecto células tratadas con ALA-TFD sin NaHS. ANOVA y Test de Dunnett.

La incubación con diferentes concentraciones de NaHS (0,1 - 10mM), muestra un descenso significativo en los niveles de carbonilos provenientes de la oxidación de las proteínas a partir de una concentración de NaHS de 1 mM, en comparación con el tratamiento con ALA 1 mM y sin NaHS. Es de notar que los niveles de proteínas oxidadas en los tratamientos con 1 y 10 mM de NaHS, son similares a los niveles basales de proteínas oxidadas de las células que no recibieron ALA-TFD, dejando ver el grado verdadero de protección que tiene el NaHS sobre las proteínas celulares durante el tratamiento con la ALA-TFD.

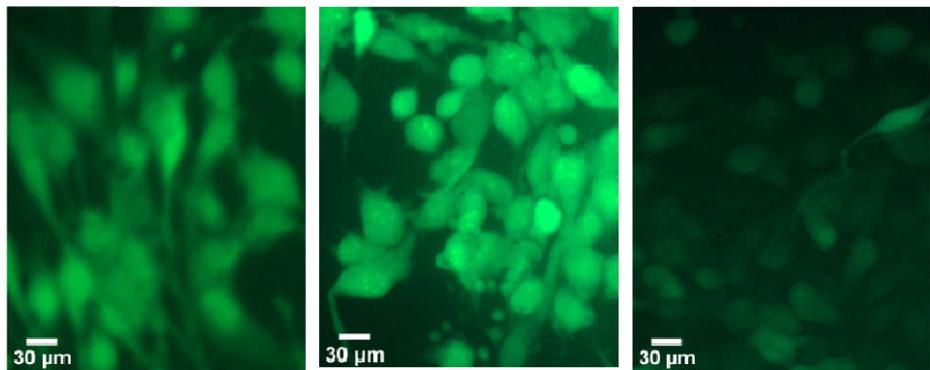
Además, se evaluó el estado redox general de las células por microscopía de fluorescencia 30 min después de ALA-TFD, con el uso de la sonda fluorescente 2,7 diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH₂-DA) (ver Materiales y Métodos III.19). La

DCFH₂-DA es un compuesto no fluorescente, que ingresa a las células y en el citoplasma es clivada por esterasas, resultando en la 2,7 diclorodihidrofluoresceína, que no es capaz de atravesar la membrana celular. Por ese motivo, una vez que ingresa, ya no puede salir de la célula. Además, cuando es oxidada por EROs a 2,7 diclorofluoresceína, emite fluorescencia verde, por lo que permite comparar la cantidad de especies oxidantes totales presentes en el interior de las células que hayan sido sometidas o no a diferentes tratamientos. Hay que tener en cuenta que esta sonda es específica para EROs, por lo que los cambios en la fluorescencia son más indicativos de la alteración del estado redox global de las células en tiempo real (Kalyanaraman et al., 2012).

En la Figura IV.19 se muestran imágenes representativas del estado redox general de las células LM2, con la sonda fluorescente DCFH₂-DA, mientras que en la Figura IV.20 se muestra una cuantificación de la intensidad de fluorescencia realizada en *FIJI*[®]. Para la cuantificación se utilizó la suma de las intensidades de fluorescencia dentro de las células de cada fotografía.



ALA-TFD	-	+
NaHS (mM)	0	0



ALA-TFD	+	+	+
NaHS (mM)	0,1	1	10

Figura IV.19. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células LM2 incubadas con DCFH₂-DA 20 μM 30 min después de tratarlas con la ALA-TFD y diferentes concentraciones de NaHS (0,1-10 mM). Al oxidarse la sonda intracelular emite fluorescencia en color verde. La barra de la escala corresponde a 30 μm.

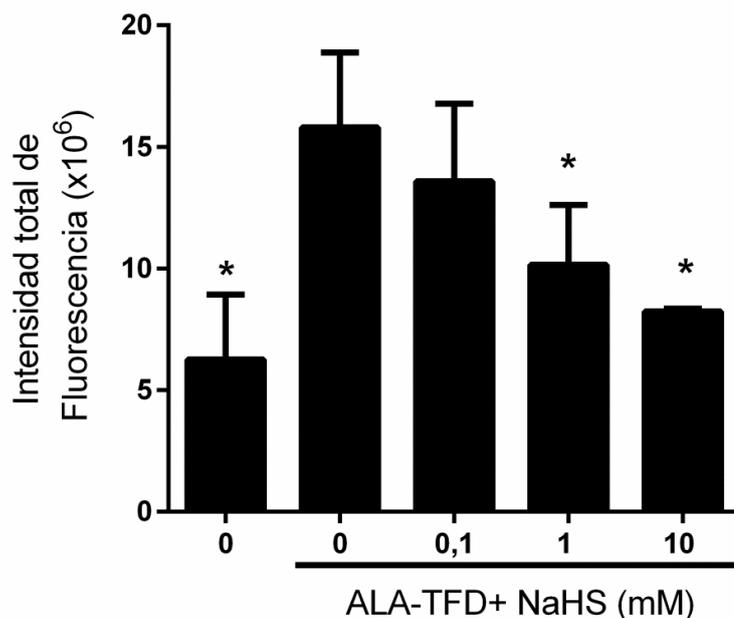


Figura IV.20. Intensidad de fluorescencia de la sonda DCFH₂-DA, relativa al área celular. La cuantificación se realizó con *FIJI*[®], los datos son la media ± DE (3-4 muestras), * p < 0,05 con respecto a células tratadas con ALA-TFD sin NaHS. ANOVA y Test de Dunnett.

Se obtiene la máxima intensidad de la señal fluorescente, concordantemente a la mayor cantidad de EROs, cuando se realiza la ALA-TFD, sin el agregado de NaHS (control positivo).

Notablemente, en las células tratadas con ALA-TFD y NaHS, la intensidad de la señal de fluorescencia se vuelve menos intensa con relación al control positivo. En particular, a partir de una concentración de NaHS 1 mM, la intensidad de fluorescencia disminuye significativamente con respecto al control positivo. Al igual que en la Figura IV.18, donde se determinaron los niveles de oxidación de proteínas post ALA-TFD, los niveles de fluorescencia de la sonda en el tratamiento con NaHS 10 mM alcanzan niveles comparables a los de la fluorescencia de la sonda en células sin ALA, es decir en aquellas que no habían recibido ALA-TFD.

Es importante mencionar que las células pueden cambiar su aspecto morfológico luego de la TFD. Esto ha sido previamente reportado por el grupo de Terapias Fotoasistidas

del CIPYP (Casas et al., 2008; Di Venosa et al., 2012; Calvo et al., 2017) y por otros (Sharkey et al., 1993).

IV.3. Efecto del H₂S sobre la ALA-TFD en otras líneas celulares.

Los resultados en la línea LM2 sugieren que el tratamiento con NaHS protege a las células contra la TFD. Es decir, resulta en una terapia menos efectiva y una mayor supervivencia celular. Para ampliar los resultados descritos anteriormente, se aplicó el mismo esquema de administración de 3 dosis de NaHS a diferentes concentraciones (0,1 - 10 mM) junto con ALA-TFD a un panel de líneas celulares disponibles en el laboratorio.

Se utilizaron dos líneas tumorales de ovario humanas (SKOV-3 e IGROV-1), una línea de macrófagos murinos (Raw264.7) y otra línea de adenocarcinoma mamario murino (LM3). No se observaron efectos tóxicos del NaHS a las concentraciones utilizadas en todas las líneas (datos no mostrados).

Conjuntamente se determinó la concentración de porfirinas totales de todas las líneas celulares, al momento de realizar la ALA-TFD (ver Materiales y Métodos, III.15.1).

Al igual que lo descrito para LM2, en tres de las cuatro líneas evaluadas (SKOV-3, IGROV-1 y Raw 264.7), se vio un efecto protector del NaHS sobre las células, aumentando la supervivencia celular frente a la ALA-TFD en comparación con células sin tratar con NaHS. Asimismo, se observó un descenso en la cantidad de porfirinas totales sintetizadas intracelularmente a partir de ALA 1 mM, en presencia de diferentes concentraciones de NaHS (0,1 - 10 mM). Los resultados obtenidos con las líneas SKOV-3, IGROV-1 y Raw264.7 y los correspondientes a las células LM2, se muestran en la Figura IV.21. Las cuatro líneas celulares muestran el mismo comportamiento, y los resultados son concordantes con los obtenidos inicialmente con la línea LM2. Es posible considerar entonces que el NaHS estaría confiriendo

protección a las células tratadas, mediante los mismos mecanismos previamente descritos.

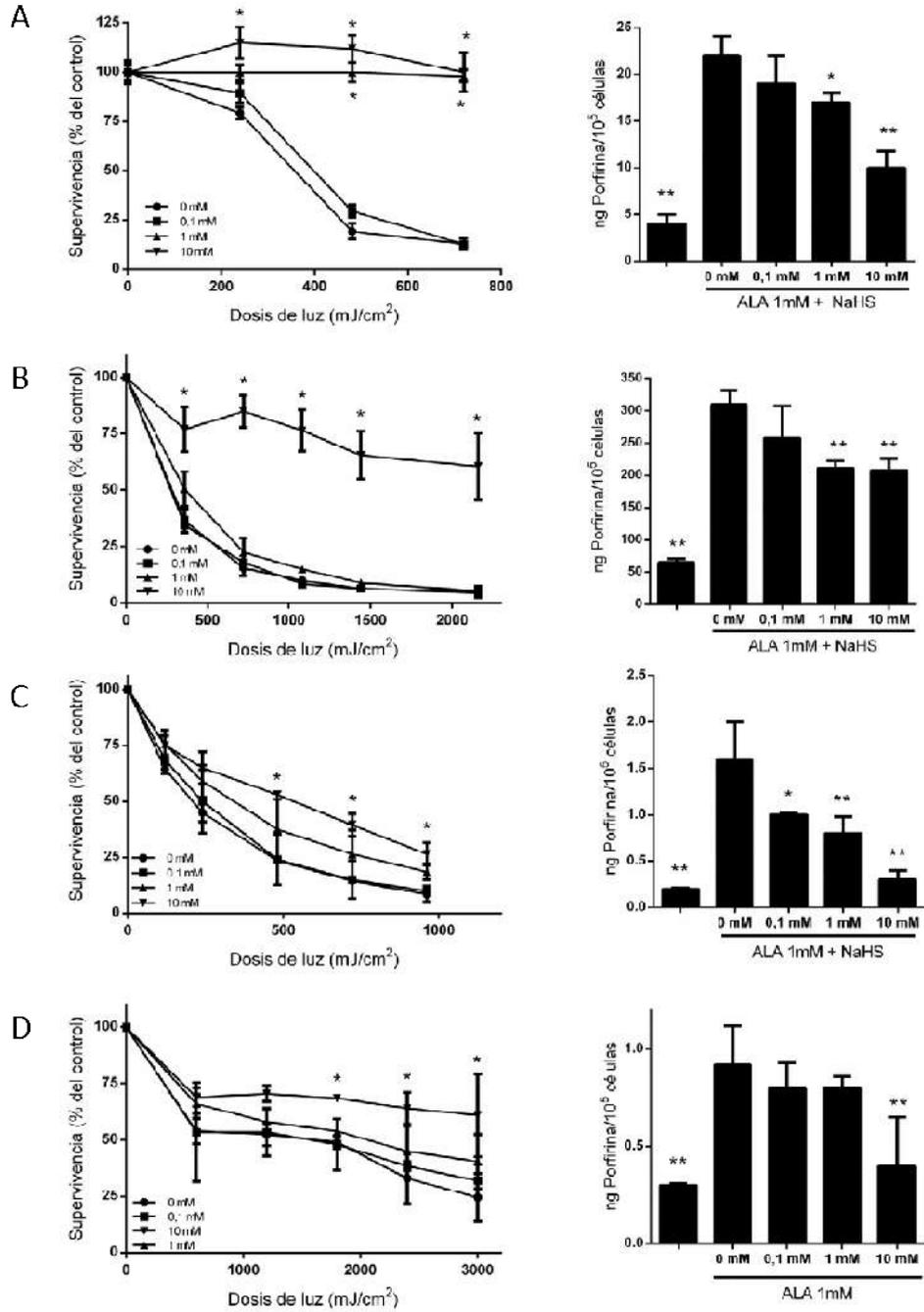


Figura IV.21. Respuesta a ALA-TFD (columna izquierda) y cuantificación de porfirinas totales (columna derecha) con NaHS (0,1-10mM). A) LM2, B) Raw264.7, C) IGROV-1 y D) SKOV-3. Los datos son media \pm DS (3-4 réplicas) realizadas por duplicado, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (respecto a las tratadas con ALA-TFD o ALA sin NaHS). ANOVA y test de Tukey (TFD) o Dunnett (porfirinas).

Sin embargo, en la línea LM3, la supervivencia celular luego de la ALA-TFD no se vio afectada por el agregado de diferentes concentraciones de NaHS (0,1 - 10 mM). Tampoco se observó un descenso en la cuantificación de las porfirinas totales, luego de la incubación con ALA 1 mM y NaHS (0,1 - 10 mM). Estos resultados se observan en la Figura IV.22 y serán profundizados en la próxima sección de este capítulo.

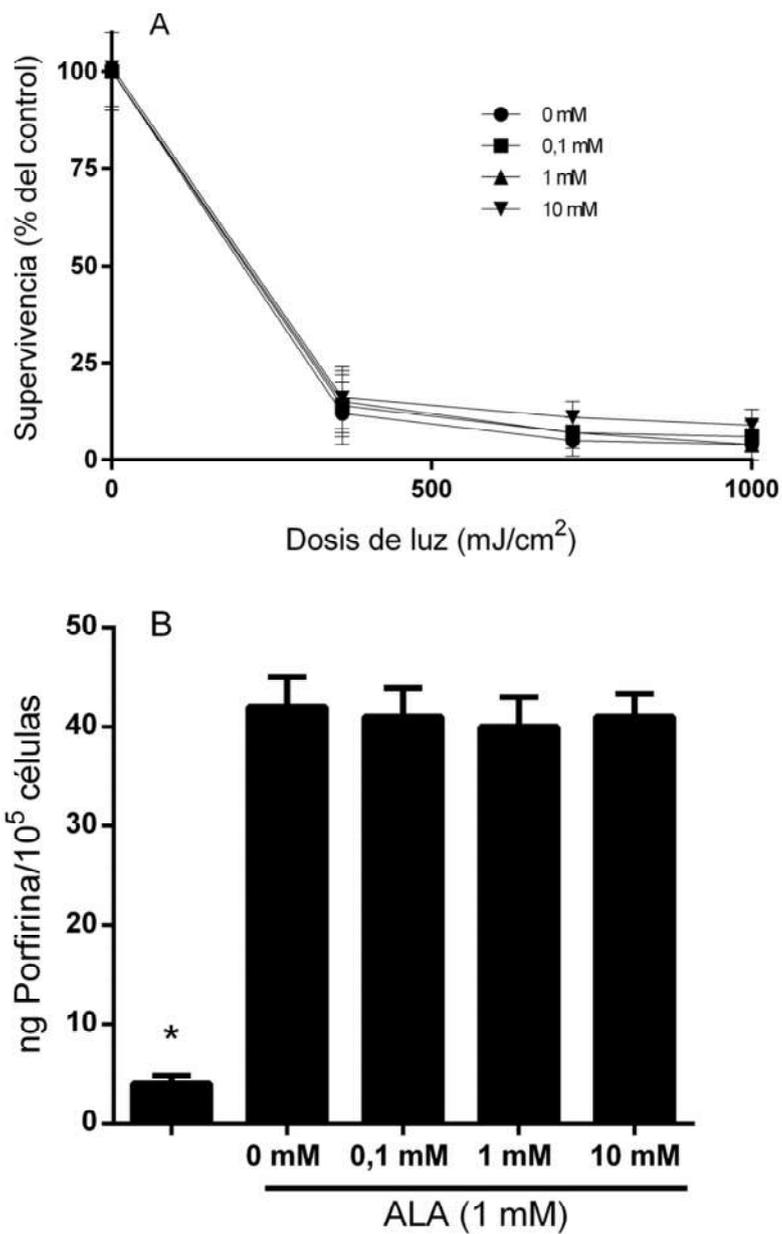


Figura IV.22. Respuesta a la ALA-TFD (A) y cuantificación de porfirinas totales (B) con NaHS (0,1-10mM), en la línea de adenocarcinoma mamario murino LM3. Los datos son media \pm DS (3-4 réplicas) realizadas por duplicado, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (respecto al tratamiento con ALA-TFD o ALA y sin NaHS). ANOVA y test de Tukey (TFD) o Dunnett (porfirinas).

En la Tabla IV.5 se compilaron las DL₅₀ para la ALA-TFD de todas las líneas celulares estudiadas y todos los tratamientos utilizados. La comparación de la DL₅₀, como ya se mencionó, es útil para comparar la efectividad de los tratamientos. Así, se puede ver que en todas las líneas celulares excepto en la línea LM3, la DL₅₀ aumenta a medida que aumenta la concentración de NaHS, significando que el tratamiento pierde efectividad, dado que se requiere una mayor dosis de luz para obtener el mismo efecto. A su vez, la DL₅₀ permite ver la susceptibilidad diferencial que tiene cada línea celular frente a la ALA-TFD.

Tabla IV.5. DL₅₀ de diferentes líneas celulares sometidas a ALA-TFD con las 3 dosis de NaHS (0,1-10 mM): 24 y 3 h antes de irradiar, y post TFD. Los datos son media ± DS de 2-4 réplicas.

Línea celular	NaHS (mM)			
	0	0,1	1	10
LM2	357 ± 26	398 ± 17	>720	>720
Raw 264.7	283 ± 28	275 ± 21	366 ± 33	>2160
IGROV-1	248 ± 40	240 ± 36	340 ± 49	533 ± 27
SKOV-3	1294 ± 133	1560 ± 145	2600 ± 108	>3000
LM3	220 ± 18	209 ± 15	212 ± 21	214 ± 17

Las DL₅₀ son expresadas en mJ/cm².

Lamentablemente resulta imposible comparar con resultados de bibliografía, dado que no existen en la literatura investigaciones que involucren el efecto del NaHS en ALA-TFD. Sin embargo, podemos especular que no se trata de una respuesta tejido-dependiente dado que las líneas del par LM2 y LM3 derivan del mismo tejido de la misma especie, pero ambas responden de manera diferente al NaHS.

IV.4. Discusión.

De los resultados obtenidos en estos experimentos, se observó que la administración de NaHS tiene un efecto protector sobre las células LM2 sometidas a ALA-TFD. En nuestras condiciones de trabajo, este efecto es detectable a partir de concentraciones de NaHS 0,5 mM o inclusive menores, y posee su máxima protección a la concentración de 10 mM, que fue la máxima concentración utilizada en las diferentes incubaciones con células. Concentraciones mayores de NaHS resultaban citotóxicas.

Las células LM2 producen GSH de manera basal, y al incubarse con NaHS 10 mM 24 y 3 h antes de la determinación, dicho parámetro aumenta. Es decir, el NaHS a esa concentración provoca un aumento en los niveles intracelulares de GSH. Este efecto es consistente con los antecedentes bibliográficos (Parsanathan y Jain, 2018), y se le adjudica al aumento en la expresión de la subunidad catalítica de la enzima γ -glutamilcisteína sintetasa por un lado, y al aumento en la actividad de los transportadores de cistina/glutamato X_c^- y de cisteína $X_{A,G}^-$, por el otro (Kimura, 2015). El mismo autor reporta un aumento de la enzima antioxidante hemooxigenasa-1 por efecto del H_2S (Kimura, 2015), por lo que hay que tener en cuenta que el aumento de GSH probablemente no sea el único efecto, aunque en esta tesis no se ha estudiado el efecto del H_2S sobre las enzimas antioxidantes.

Se ha reportado que en la línea celular de monocitos U937, el H_2S actúa induciendo la transcripción del gen de la GGS, enzima reguladora de la síntesis de GSH intracelular, vía el factor de transcripción Nrf2 y elevando el contenido de L-cisteína intracelular (Kaspar et al., 2009; Jain et al., 2014), mediante el aumento de la síntesis de uno de sus transportadores, el $X_{A,G}^-$ (Kimura, 2015).

Los niveles basales de GSH de las células LM2 son $70,3 \pm 4,6$ nmoles / 10^6 células, y aumentan a 84 ± 1 nmoles / 10^6 células luego de haber recibido NaHS 10 mM. Cuando las células se incuban con BSO, el inhibidor de la enzima GGS, los niveles del tripéptido disminuyen drásticamente, y esa disminución no se puede revertir por la administración de NaHS. El efecto producido por el NaHS podría deberse a que el H_2S

induciría la enzima GGS, mientras que el BSO actúa como inhibidor de la misma, es decir, el efecto del NaHS es anterior al del BSO. La importancia de los niveles de GSH intracelulares se evidencia cuando se evalúa la supervivencia celular utilizando BSO y NaHS. Como ya se ha discutido, el NaHS aumenta la supervivencia celular frente a la ALA-TFD, pero el BSO hace que las células sean más sensibles a la ALA-TFD que las células que no lo recibieron. Cuando las células se incuban simultáneamente con NaHS y BSO, la supervivencia es menor que las células que solo recibieron ALA-TFD. Es decir que el efecto del BSO, es el que prevalece. Como se mencionara en la introducción, el GSH no sólo actúa como antioxidante directa e indirectamente, sino que también cumple un rol fundamental en la manutención de los tioles reducidos de muchas proteínas, conservando su buen funcionamiento.

En las células LM2, los niveles endógenos de GSH parecen ser fundamentales para la vulnerabilidad o la protección de ALA-TFD (Ju et al., 2016). Además, se propone que los niveles endógenos de H₂S también podrían desempeñar un papel clave en la protección o no frente a la ALA-TFD. Esto está de acuerdo con resultados previos del grupo de Terapias Fotoasistidas del CIPYP, que muestran protección en ALA-TFD incubando células LM2 con diferentes concentraciones exógenas de GSH, L-cisteína o L-metionina (Perotti et al., 2002).

En las condiciones experimentales, el H₂S es producido a partir del aminoácido L-cisteína administrado exógenamente a las células LM2. Los niveles de producción basales son 110 ± 10 nmoles de H₂S/10⁶ células. Esto es teniendo en cuenta la cistina 0,2 mM, disponible en el medio de cultivo, mientras que con el agregado de L-cisteína 10 mM, la producción aumenta a 255 ± 18 nmoles de H₂S/10⁶ células. Además, los compuestos PAG 10 mM y Asp 10 mM inhiben la producción de H₂S, disminuyendo los niveles a una cantidad equivalente a la basal. El compuesto AOA 1 mM no tuvo efecto inhibitorio sobre la síntesis endógena del H₂S, lo cual sugiere que en las células LM2 no estaría presente la enzima CBS.

El aumento de la producción de H₂S también podría estar dado por un aumento en la expresión de las enzimas antes descritas, y no solo en el aumento del sustrato de síntesis. Hourihan et al. (2013) mostraron que el NaHS administrado en fibroblastos murinos de la línea MEF, aumenta la expresión de los genes de las enzimas CBS y CSE, pero no así de la enzima 3MST. En el caso de las LM2, no se descarta que se produzca inducción de la enzima CSE y no así sobre la enzima CBS, basado en el efecto de los inhibidores antes descritos.

El efecto de protección frente a la ALA-TFD provocado por la L-cisteína podría estar mediado tanto por el aumento de la síntesis de H₂S como por el aumento de L-cisteína intracelular, disponible para la síntesis de GSH.

Otro de los efectos del NaHS es el de reducir la cantidad de porfirinas producidas y acumuladas dentro de las células a partir de ALA 1 mM, como se puede observar en las fotografías de fluorescencia de la Figura IV.10, su cuantificación (Figura IV.11) y en los niveles de porfirinas totales sintetizadas (Figura IV.21). La cantidad de porfirinas está relacionada con el efecto fototóxico de la ALA-TFD, dado que son las moléculas que actúan como FS. La disminución se observa a partir de 1 mM de NaHS.

Aunque la TFD resulta menos efectiva en las células LM2 al utilizar un FS *per se* como la Ce6-TFD, el NaHS tiene igualmente efecto protector sobre el daño producido por la TFD, mostrando que este efecto no se debe únicamente a la influencia en la disminución de la síntesis de porfirinas que fue observada en la ALA-TFD. Del resultado de la reacción directa con ¹O₂, mostrado en la Figura IV.16, se desprende que el NaHS no afecta la capacidad fotosensibilizante de la Ce6.

Este es el primer reporte acerca del impacto del NaHS sobre la síntesis de porfirinas. Este efecto del NaHS sobre el camino metabólico del hemo se retomará y profundizará en la sección VI de este capítulo de resultados.

La producción de EROs y el daño a macromoléculas se ven reducidos luego de la ALA-TFD cuando las células fueron tratadas también con NaHS. Esto podría estar

relacionado con la menor generación de porfirinas, lo cual tiene como consecuencia una menor generación de EROs. Pero se ha observado que el NaHS también aumenta la cantidad de GSH intracelular, que es uno de los compuestos antioxidantes más importantes de las células, como se mencionara en la introducción.

Además, se ha observado que el NaHS tiene la capacidad de disminuir dichas EROs, y en particular $^1\text{O}_2$, en un sistema libre de células. Esto muestra claramente que el NaHS, o el $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$ que genera, tienen la capacidad de reaccionar directamente con las especies oxidantes. Este es el primer reporte bibliográfico en mostrar el efecto directo del NaHS sobre el $^1\text{O}_2$. Este resultado es muy importante en el contexto de la TFD, dado que el $^1\text{O}_2$ es el principal compuesto oxidante formado durante la fotosensibilización (Weishaupt et al., 1976).

Tanto el aumento de GSH, como la menor cantidad de porfirinas sintetizadas, y el efecto directo del NaHS, o muy probablemente una combinación de los tres factores, podrían ser los responsables de la menor generación de EROs y posterior disminución de la oxidación de proteínas luego de la ALA-TFD.

En resumen, basados en nuestras condiciones experimentales, los resultados obtenidos en este capítulo son:

- La administración de NaHS, en diferentes dosis, disminuye la efectividad de la ALA-TFD en las líneas celulares LM2, SKOV-3, IGROV-1 y Raw264.7, pero no en la línea LM3.
- La administración de NaHS disminuye la síntesis y acumulación de porfirinas en la línea LM2, SKOV-3, IGROV-1 y Raw264.7, pero no en la línea LM3.
- El NaHS aumenta los niveles de GSH intracelulares en la línea LM2.
- Las células LM2 producen endógenamente H_2S . Dicha producción aumenta al elevar la concentración de L-cisteína disponible en el medio de cultivo, y es

inhibida por los compuestos PAG y Asp, pero no AOA. Esto sugiere que la síntesis de H₂S en la línea LM2 está generada fundamentalmente por la acción de las enzimas CSE y CAT/3MST. La enzima CBS no participaría de la producción del H₂S en esta línea celular.

- La cantidad de EROs generados y detectados en la línea LM2, 30 min después de la ALA-TFD, es menor cuando las células son tratadas previamente con NaHS.
- El daño oxidativo a proteínas post-TFD disminuye cuando las células son tratadas previamente con NaHS.
- El NaHS es capaz de disminuir directamente las EROs generadas en un sistema libre de células, particularmente el ¹O₂.

V. Efecto del H₂S en cultivos celulares de la línea de adenocarcinoma mamario murino LM3.

De lo expuesto en el capítulo anterior, se ha concluido que el NaHS tiene un efecto en la respuesta a la ALA-TFD en una variedad de líneas celulares. Sin embargo, en la línea celular LM3 (línea celular de adenocarcinoma mamario, que deriva del tumor espontáneo M3 de ratón BALB/c, Instituto Ángel H. Roffo) (Urtreger et al., 1997), el NaHS no parece tener mismo efecto en la supervivencia celular frente a la ALA-TFD.

En el presente capítulo, profundizaremos el estudio de la falta de efecto protector del H₂S frente a la TFD, en dicha línea celular.

V.1. Efecto del NaHS sobre la viabilidad de las células LM3.

La Figura V.1 da cuenta de la toxicidad del NaHS sobre las células LM3. Como se observa, no hay un efecto tóxico del NaHS en concentraciones de hasta 10 mM. En cambio, al aumentar la concentración a 100 mM, el compuesto resulta sumamente tóxico.

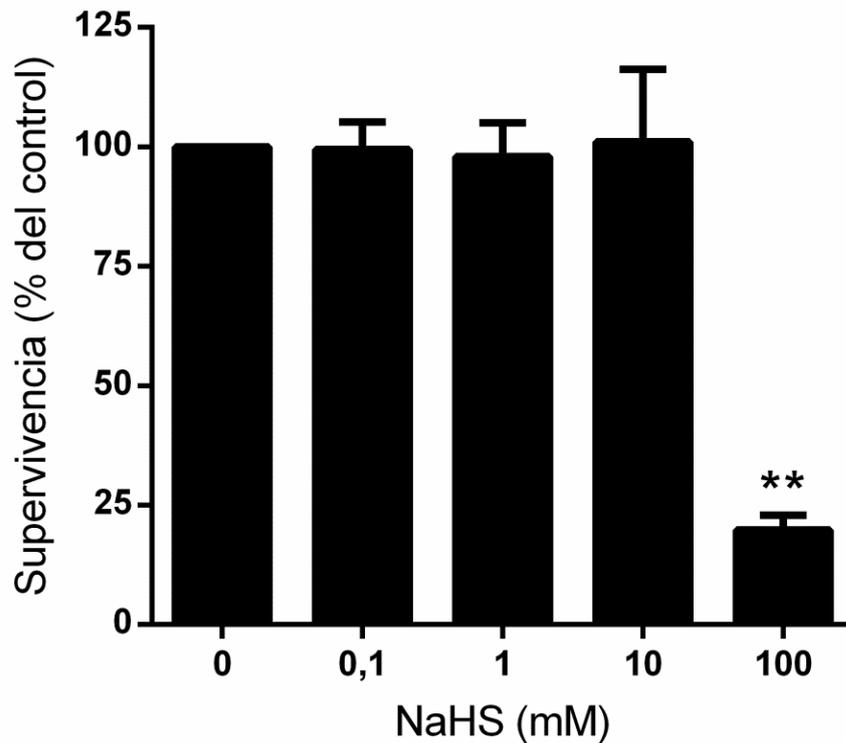


Figura V.1. Toxicidad del NaHS a diferentes concentraciones en la línea celular LM3. Los datos son media \pm DS (al menos 3 réplicas), ** $p < 0,01$ contra el control sin NaHS, ANOVA seguido de test de Dunnet.

V.2. Efecto del NaHS en la ALA-TFD en las células LM3.

En primer lugar, se consideró el efecto de distintas concentraciones de NaHS en la respuesta a la ALA-TFD en células LM3 (Figura IV.22 A). La ALA-TFD fue realizada en idénticas condiciones a las utilizadas con las otras líneas celulares (ver Materiales y Métodos, ítem III.4), y también lo fueron las administraciones de NaHS en tres tiempos antes indicados, 24 h, 3 h durante la incubación con ALA 1 mM y post TFD. (ver Figura III.4 Materiales y Métodos). La Figura IV.22 B muestra la síntesis de porfirinas totales bajo las mismas condiciones.

De la Tabla IV.5, se desprende que ninguna de las concentraciones de NaHS estudiadas (0,1 - 10 mM) tiene un efecto sobre la respuesta a la ALA-TFD. No hay diferencias significativas en el cálculo de las DL₅₀, y al aumentar la dosis de luz, el porcentaje de supervivencia es igualmente bajo en todos los tratamientos, como se observa en los trazados de las diferentes curvas para la línea LM3, presentados en la Figura IV.22 A.

De igual modo, no se observan diferencias significativas en la síntesis de porfirinas totales (Figura IV.22 B), hecho que se correlaciona perfectamente con la falta de efecto protector frente a la ALA-TFD en presencia de NaHS.

V.2.1. Efectos del NaHS previos a la ALA-TFD.

V.2.1.1. Síntesis endógena de GSH.

Un efecto que ya se ha mencionado del NaHS, es el de aumentar los niveles intracelulares de GSH. Con el objetivo de estudiar este efecto en la línea celular LM3, se determinaron los niveles intracelulares de GSH con diferentes tratamientos con NaHS y en células control sin NaHS. Los resultados se muestran en la Figura V.2.

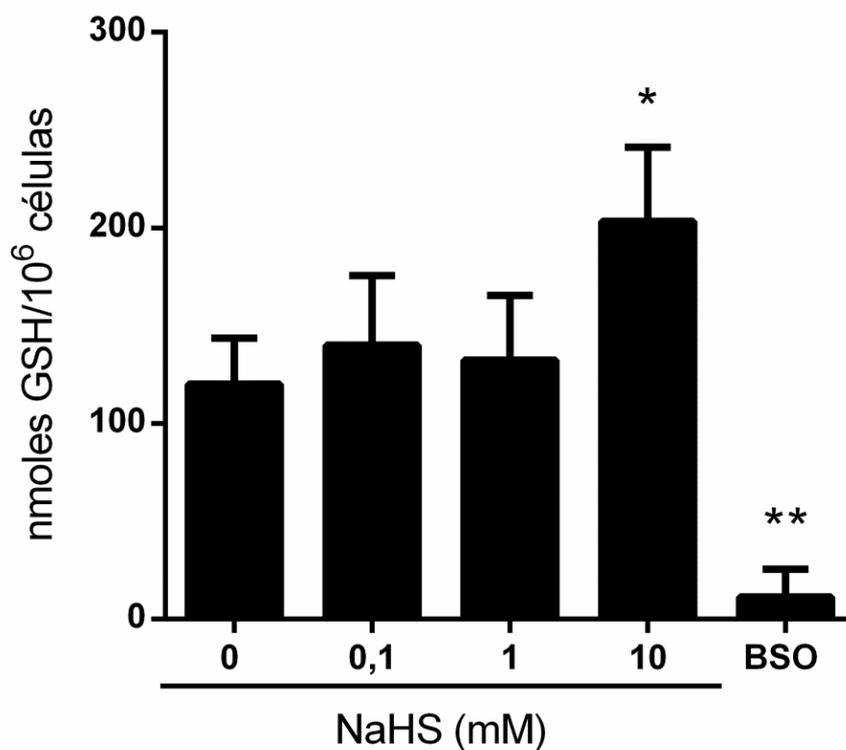


Figura V.2. Niveles intracelulares de GSH en células de la línea LM3, luego de haber sido incubadas con NaHS 24 y 3 h antes de la determinación, o con BSO 24 h antes. Los datos son media \pm DS (3 réplicas) realizadas por duplicado. * $p < 0,05$ respecto al control sin NaHS; ** $p < 0,01$ respecto al control sin NaHS, ANOVA seguido de test Dunnet.

En esta línea celular, los niveles de GSH aumentan más del 50% en las células que recibieron NaHS 10 mM comparado con las que no lo recibieron. Este aumento también fue observado en la línea LM2, pero incluso no tan marcado como en esta línea celular. El BSO depleta a las células de GSH hasta alcanzar alrededor de un 5% del valor del control.

V.2.1.2. Síntesis endógena de H₂S y del NO y su efecto en la ALA-TFD.

Con respecto a la síntesis endógena de H₂S, el mismo se determinó en las células LM3 utilizando el método ya descrito (ver Materiales y Métodos III.16). Se utilizó L-cisteína 10 mM como precursor de la síntesis, y los compuestos PAG 10 mM, AOA 1 mM y Asp 10 mM, como inhibidores de las enzimas CSE, CBS y CAT/3MST,

respectivamente. Además, se incorporó también un análogo de la L-arginina que inhibe la síntesis de óxido nítrico (NO), el N^w-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) 100 μM, dado que la línea LM3 sintetiza NO. La línea LM3 presenta la isoenzima productora de NO óxido nítrico sintasa 1 (NOS1 o antiguamente denominada nNOS) (Español et al., 2002; Davel et al., 2004), y considerando la evidencia disponible acerca de la interacción de los transmisores gaseosos (Pae et al., 2009; Mustafa 2009; Kajimura et al., 2010; Giuffrè y Vicente, 2018) se decidió incorporar este tratamiento en el experimento, cuyos resultados se muestran en la Figura V.3.

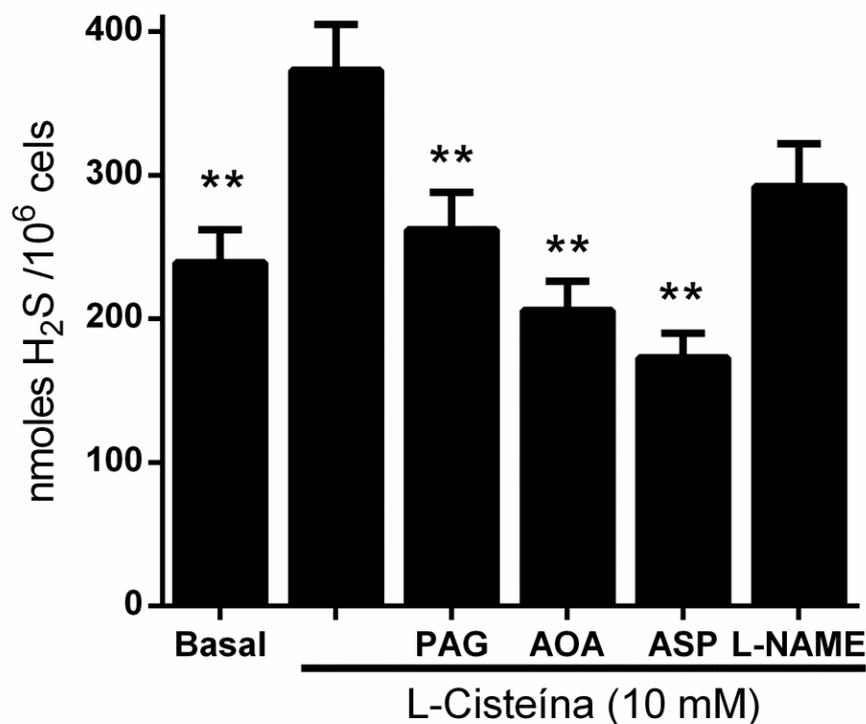


Figura V.3. Síntesis endógena de H₂S basal y a partir de L-cisteína 10 mM, en células de la línea LM3 con o sin inhibidores de síntesis de H₂S o NO. En las condiciones basales, las células crecen en medio de cultivo RPMI 1640 que según especificaciones del fabricante, contiene 0,20 mM de L-cistina y 1,15 mM de L-arginina. Los datos son media ± DS (n=3-4 réplicas) realizadas por duplicado. **p < 0.01 respecto a L-cisteína 10 mM. ANOVA seguido de test de Dunnett.

Como se muestra en la Figura V.3, las células de la línea LM3 son capaces de sintetizar H_2S . Lo hacen de forma basal, y dicha síntesis aumenta significativamente al aumentar la cantidad de L-cisteína disponible. En presencia de 10 mM de L-cisteína, los inhibidores PAG 10 mM, AAOA 1 mM y Asp 10 mM, son capaces de inhibir la síntesis endógena de H_2S , y reducir sus niveles de forma significativa con respecto al tratamiento con L-cisteína 10 mM (condiciones de máxima producción). El agregado de L-NAME no modifica significativamente la producción de H_2S .

La síntesis de NO se da a partir del aminoácido L-arginina por la acción de las enzimas NOSs (Nathan, 1992). Como se citó anteriormente, Davel et al. (2004) describieron que células de la línea LM3 sintetizan NO, fundamentalmente por la presencia de la isoenzima NOS1 o NOS neuronal.

Se verificó la síntesis de NO en las condiciones de trabajo y se evaluó la existencia de alguna relación con los niveles de H_2S presentes en las células LM3 o por el agregado exógeno del mismo por adición de diferentes concentraciones de NaHS (0,05 -10 mM).

En la Figura V.4, se muestra la síntesis de NO y su relación con el agregado de diferentes concentraciones de NaHS (0,05 -10 mM) o sustrato para la síntesis endógena del H_2S (L-cisteína 10 mM) en las células LM3.

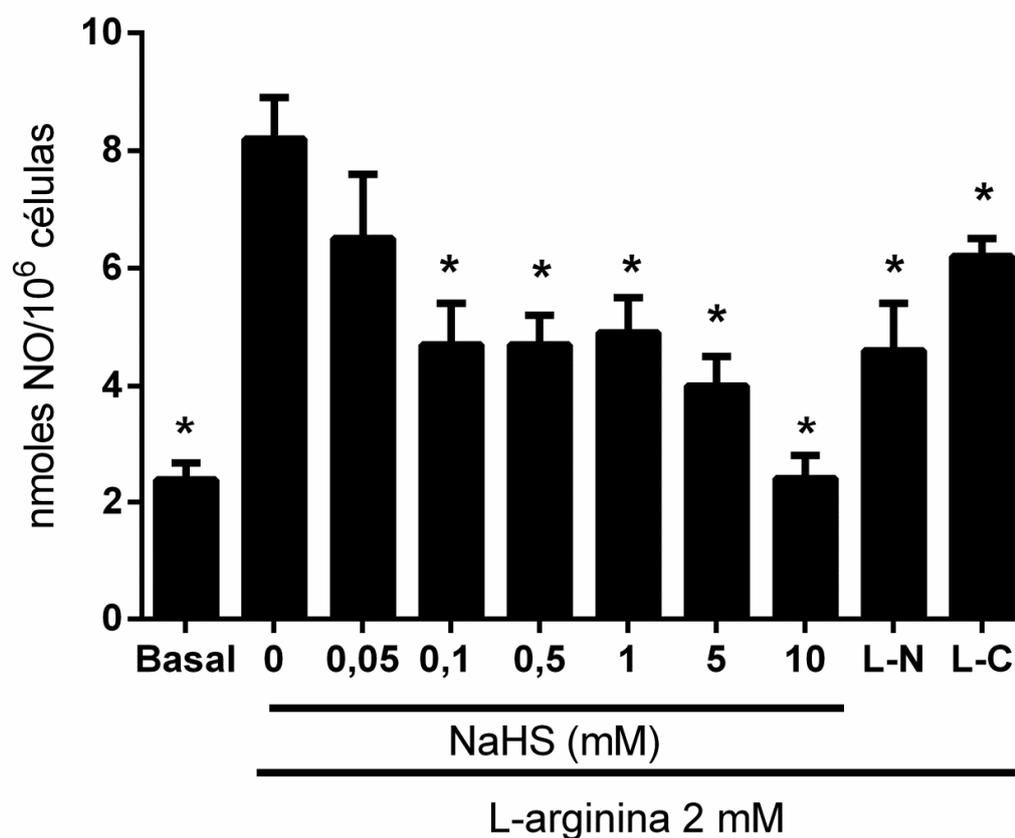


Figura V.4. Síntesis endógena de NO en las células LM3 basal y a partir de L-arginina 2mM, en presencia y ausencia de NaHS (0,05 - 10 mM), L-NAME 100 μ M (L-N) y L-cisteína 10 mM (L-C). Las células crecen en medio de cultivo RPMI 1640 que según especificaciones del fabricante, contiene 1,15 mM de L-arginina y 0,20 mM de L-cistina. La determinación se realizó en el medio de cultivo luego de las incubaciones. Los datos son media \pm DS (3 réplicas) realizadas por duplicado, *p < 0.05 respecto a L-arginina 2 mM. ANOVA seguido de test de Dunnett.

En las condiciones basales, las células crecen en medio de cultivo RPMI 1640 que contiene L-arginina 1,15 mM. En la Figura V.4 se observa que la síntesis de NO es máxima al ser incubada con L-arginina 2 mM. Como es de esperarse, el inhibidor L-NAME 100 μ M reduce los niveles de síntesis de NO en la línea LM3, inhibiendo un 45 % de los niveles máximos obtenidos. Además, se observa un efecto inhibitorio del NaHS sobre la síntesis de NO en células LM3. Es de destacar que la presencia de H₂S, tanto administrado exógenamente, a través de diferentes concentraciones de NaHS, como el sintetizado endógenamente a partir de L-cisteína 10 mM, inhibe la generación de NO

en las células LM3. Concretamente, el NaHS tiene un efecto significativo a partir de la concentración de 0,1 mM.

Se evaluó también el efecto combinado de la inhibición de la síntesis de NO y el agregado de NaHS en la respuesta a la ALA-TFD en las células LM3. Para ello se realizó la ALA-TFD a 120 mJ/cm^2 , y dos tratamientos combinados: L-NAME (0 o $100 \mu\text{M}$) y diferentes concentraciones de NaHS (0,1 - 10 mM) en comparación con células que no recibieron tratamiento fotodinámico (Figura V.5).

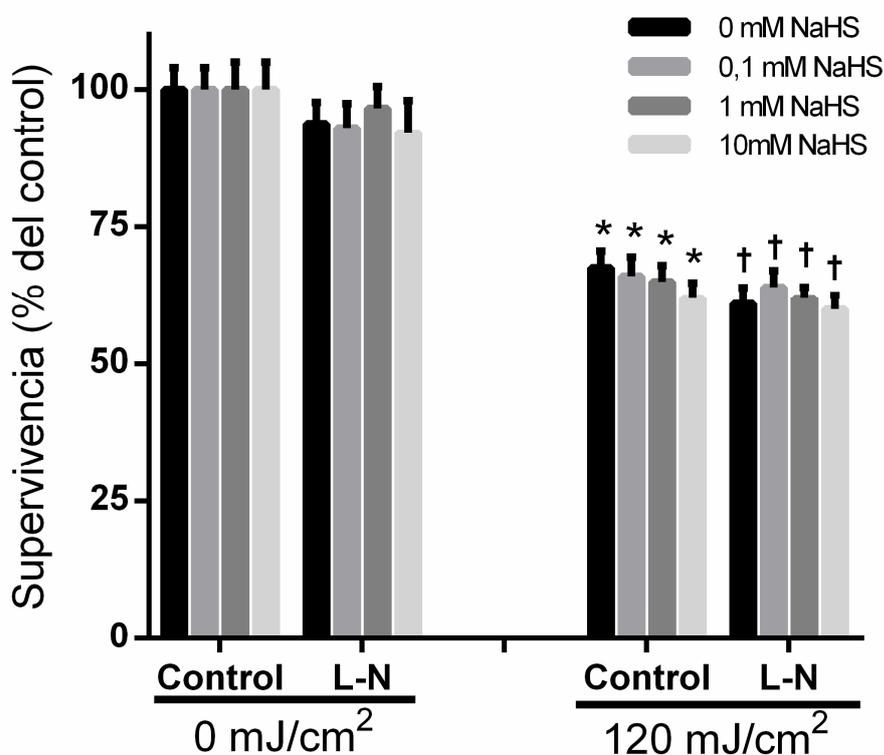


Figura V.5. Respuesta de las células LM3 a la ALA-TFD en presencia o ausencia de L-NAME $100 \mu\text{M}$ (L-N) y con o sin NaHS (0,1 - 10 mM). Los datos son media \pm DS (n= 3). ANOVA seguido de test de Tukey, *, † p < 0,05 respecto al control correspondiente a su concentración de NaHS no iluminado.

En ausencia del L-NAME, no se observaron efectos de las diferentes concentraciones de NaHS agregado, sobre la ALA-TFD, lo cual concuerda con los resultados de la Figura

IV.22 A). El agregado de L-NAME 100 μ M no modifica significativamente el efecto del NaHS en la ALA-TFD de las células LM3.

Finalmente, tampoco se observó un efecto combinado del agregado de NaHS y la inhibición del NO en la supervivencia celular, ya que al comparar las columnas dentro del tratamiento de L-NAME, no se observan diferencias significativas en la respuesta de las células a la ALA-TFD, en ninguna de las dosis de luz evaluadas.

V.2.1.3. Efecto del NaHS en la síntesis de porfirinas.

Se ha visto también en el capítulo anterior, que la síntesis de porfirinas totales en la línea LM2 y otras líneas celulares, se ve disminuida por la incubación con diferentes concentraciones de NaHS (Figuras IV.10; IV.11 y IV.21).

En el caso de LM3, no se observan diferencias en la acumulación de porfirinas totales luego de haber sido incubadas durante 3 h en medio sin suero con ALA 1 mM, y habiendo recibido o no diferentes concentraciones de NaHS (0,1-10 mM) 24 h y 3h antes de la determinación (Figura IV.22 B). Es decir, el NaHS no afecta la acumulación de porfirinas generadas a partir de ALA en la línea LM3. En las Figuras V.6 y V.7 se muestran las microfotografías de fluorescencia de Pp IX y su cuantificación luego de los diferentes tratamientos.

El experimento se realizó bajo las mismas condiciones que las utilizadas para la línea LM2 (Figura IV.10), para la cual sí se observó un efecto del NaHS sobre la acumulación de las porfirinas intracelulares por fluorescencia.

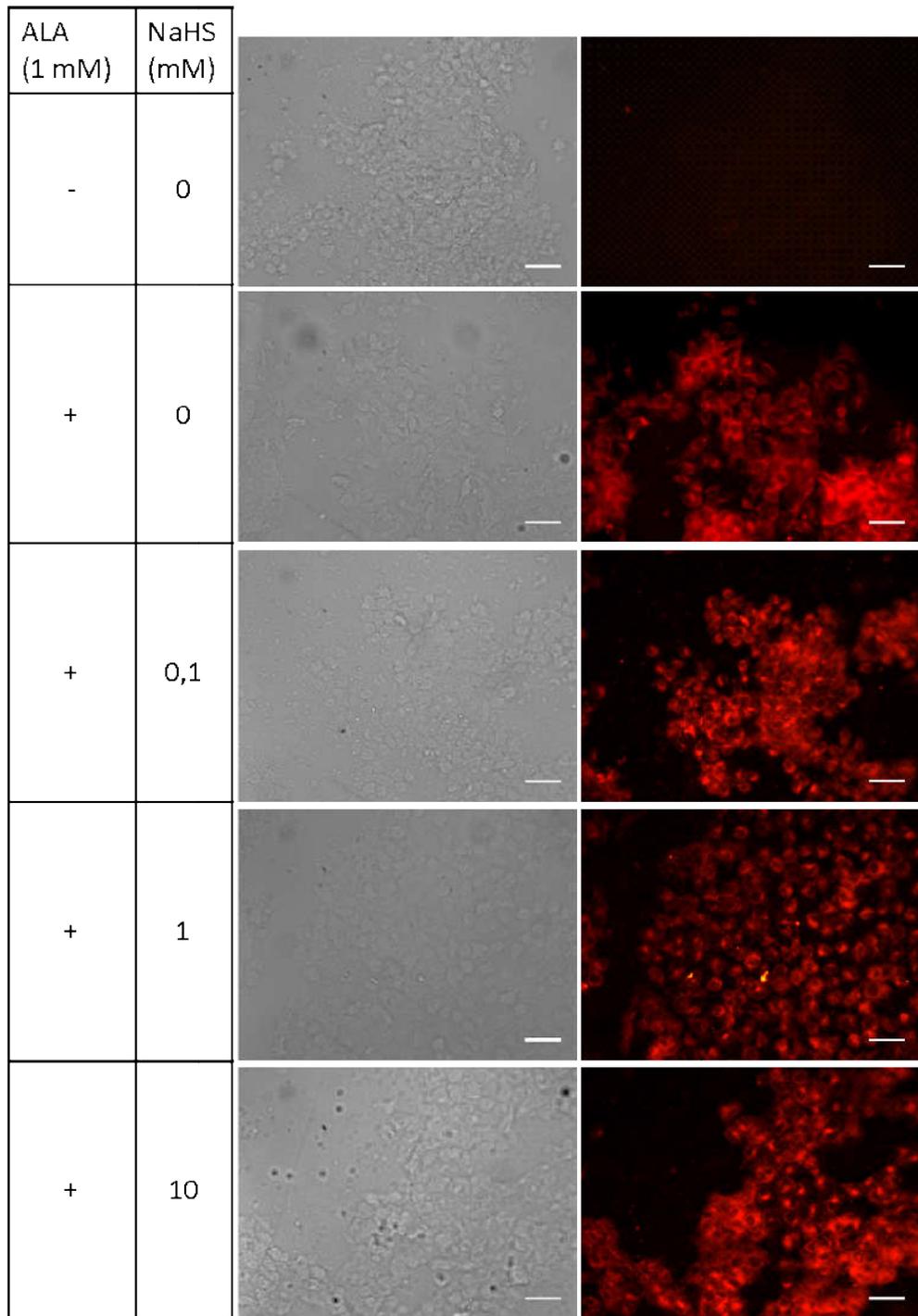


Figura V.6. Imágenes de microscopía de campo claro y de fluorescencia roja de células LM3 incubadas 3 h con ALA 1 mM en medio sin suero, y diferentes concentraciones de NaHS (0,1 - 10 mM). Se muestran fotografías representativas de cada tratamiento. La barra representa 50 μm .

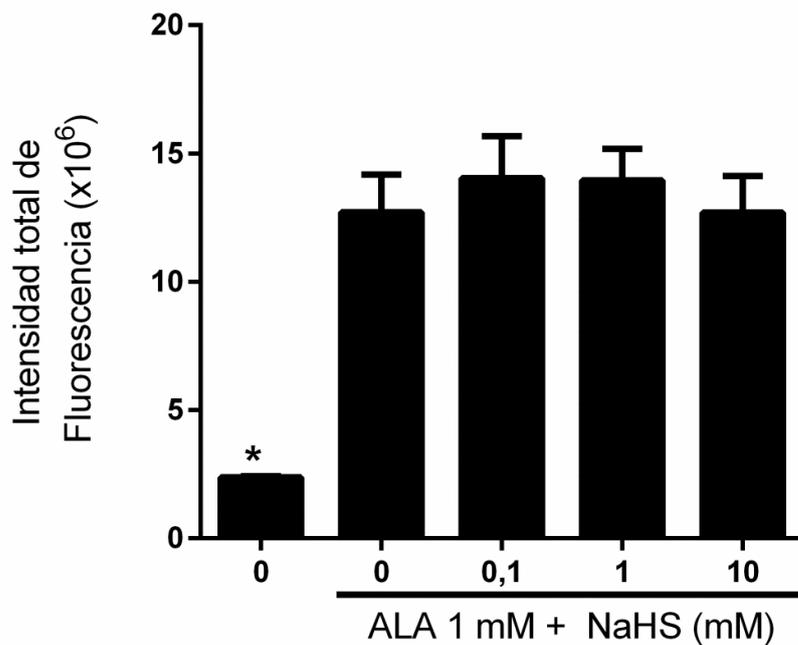
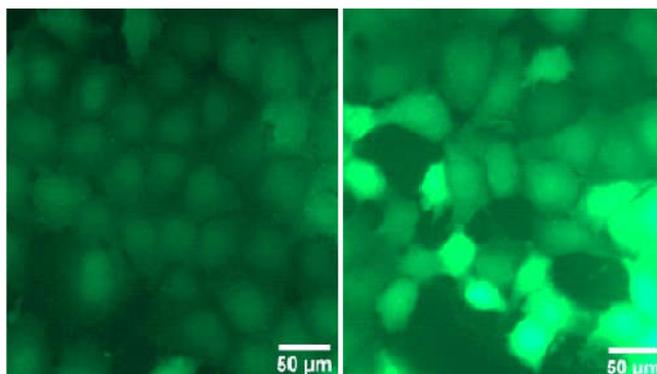


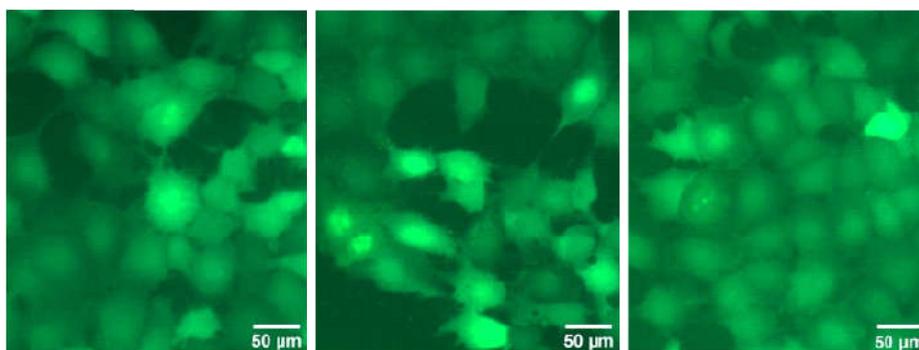
Figura V.7. Intensidad de fluorescencia de porfirinas totales de las imágenes, relativizada al área celular de la fotografía de la Figura V.6. El análisis se realizó con el software *FIJI*[®]. Los datos son la media \pm DE (3 muestras), * $p < 0,05$ frente a ALA 1 mM sin NaHS. ANOVA y Test de Dunnett.

V.2.1.4. Efecto del NaHS post ALA-TFD.

Con respecto al efecto del NaHS sobre la generación de EROs luego de la ALA-TFD, se evaluó su presencia mediante la fluorescencia de la sonda DCFH₂-DA (ver Materiales y Métodos, III.19). En la Figura V.8 se muestran imágenes representativas de cada tratamiento, y en la Figura V.9, se presenta el gráfico que refleja la intensidad de fluorescencia dentro del área celular de las imágenes.



ALA-TFD	-	+
NaHS (mM)	0	0



ALA-TFD	+	+	+
NaHS (mM)	0,1	1	10

Figura V.8. Presencia de EROs en las células LM3, 30 min luego de la ALA-TFD con y sin NaHS. Micrografías tomadas por microscopía de fluorescencia de la sonda DCFH₂-DA, que emite fluorescencia verde en presencia de EROs. Se muestran imágenes representativas de cada tratamiento. La barra de escala representa 50 μm.

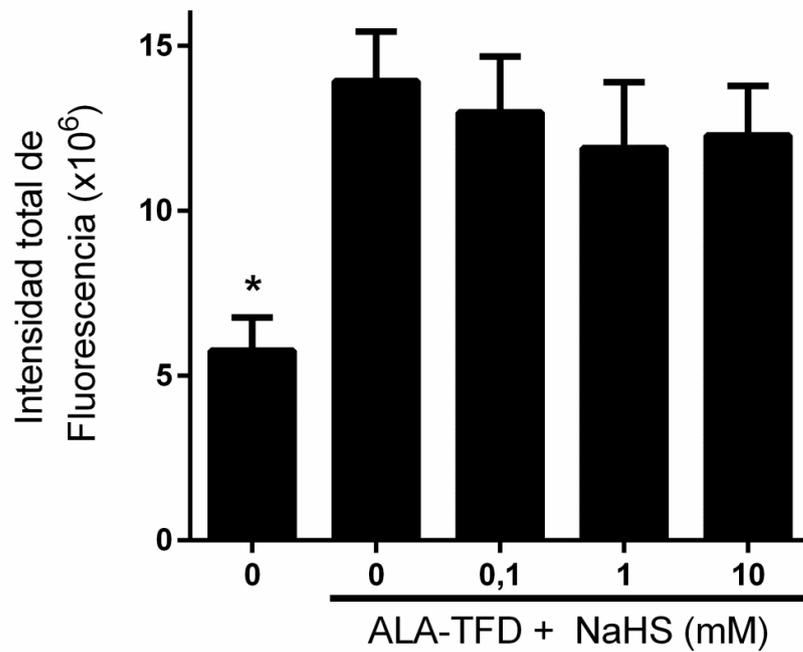


Figura V.9. Intensidad de fluorescencia de la sonda DCFH₂-DA en células LM3, luego de ALA-TFD con o sin NaHS. Los valores corresponden a la fluorescencia dentro de las células de la Figura V.8, relativizadas al área celular, y realizadas por análisis de imágenes con el software *FIJI*®. Los datos son media ± DS (3 réplicas) realizadas por duplicado, *p < 0.05 con respecto a ALA-TFD sin NaHS. ANOVA seguido de test de Dunnett.

Tanto en las imágenes de fluorescencia de la sonda DCF, como en el gráfico de intensidad de fluorescencia, se observa que no hay diferencias significativas en los niveles de EROs generados entre los diferentes tratamientos y el control con ALA-TFD. Es decir, que la incubación con NaHS (0,1 - 10 mM) 24 y 3 h antes de la ALA-TFD y post-TFD, no disminuye la cantidad de EROs presentes en las células 30 min post TFD.

V.3 Discusión.

En base a los resultados obtenidos de la supervivencia celular a la ALA-TFD con NaHS en la línea LM3, se concluiría que no existe un efecto del NaHS en la respuesta a la ALA-TFD. Lo mismo sucede si se observa la síntesis de porfirinas a partir de ALA, en presencia del dador de H₂S.

Consistentemente con el efecto reportado del H₂S, la cantidad de GSH intracelular aumenta un 69% cuando las células son expuestas a una concentración de NaHS 10 mM (120,2 ± 23,5 nmoles/10⁶ células de GSH en condiciones control, y 203,3 ± 37,8 nmoles/10⁶ con NaHS 10 mM 24 y 3 h antes de la determinación).

El GSH es una de las moléculas más importantes del sistema antioxidante de las células, tanto por su alta concentración, que puede llegar a concentraciones cercanas a 10 mM dependiendo del tejido (Uhlir y Wendel 1992; Casas, 1996; Ballatori et al., 2009), como por su capacidad de eliminar directa o indirectamente sustancias oxidantes, siendo cofactor de enzimas peroxidasas y peroxiredoxinas, reaccionando directamente con radicales libres, o regenerando otros antioxidantes como la vitamina E y la C (Forman et al., 2009).

Además, el GSH cumple un rol importante como detoxificante, al conjugarse con compuestos extraños y facilitar su eliminación. Finalmente, cumple un rol fundamental en el balance de la homeostasis redox de la células, al mantener los sulfhidrilos reducidos tanto de las proteínas de membrana como de las proteínas solubles (Casas, 1996).

Las células LM3 son capaces de sintetizar H₂S endógenamente a partir del aminoácido L-cisteína. En condiciones basales de cultivo, la cantidad de L-cistina y L-metionina que posee el medio de cultivo es 0,20 Y 0,10 mM, respectivamente. En dichas condiciones, las células LM3 producen 239 ± 23 nanomoles/10⁶ células de H₂S, mientras que al incrementar la L-cisteína a 10 mM, la síntesis aumenta a 373 ± 32 nanomoles/10⁶

células. Es decir que, en presencia de 10 mM de L-cisteína, la producción del H₂S aumenta en un 56% con respecto a su nivel basal.

Por otro lado, los tres compuestos utilizados como inhibidores para la síntesis de H₂S endógeno, el PAG 10 mM, el Asp 10 mM y el AOA 1 mM, que inhiben a la CSE, la CAT/3MST y la CBS, respectivamente; inhiben la síntesis de H₂S de manera significativa en las condiciones experimentales.

Finalmente, el inhibidor de las isoenzimas NOSs, L-NAME, no afecta la síntesis endógena de H₂S.

Con respecto a la síntesis de NO, se verificó que las células LM3 producen dicho compuesto, y que la síntesis es inhibida por el L-NAME en las condiciones de trabajo. El efecto del L-NAME en la síntesis de NO en células LM3 ya ha sido reportada por el grupo de Terapias Fotoasistidas del CIPYP y por otros grupos de trabajo (Eijan et al., 1998; Di Venosa et al., 2005).

La síntesis de NO es inhibida por el agregado exógeno de H₂S generado por el dador NaHS a partir de 0,1 mM, y por la L-cisteína 10 mM, un sustrato de la síntesis endógena de H₂S. Es decir, que la inhibición se da tanto a partir de H₂S endógeno, cómo exógeno. Este efecto inhibitorio había sido reportado antes (Kubo et al., 2007), quienes mostraron el efecto del NaHS en las tres isoformas recombinantes de la NOS. Este hecho no resulta extraño a la luz de la creciente evidencia acerca de la interacción entre transmisores gaseosos (ver Introducción, I.2.3.).

En cuanto a la síntesis y acumulación de porfirinas totales, no se observó una disminución de los niveles intracelulares de porfirinas generadas a partir de ALA 1 mM frente a ninguna de las concentraciones de NaHS estudiadas.

Al comparar los niveles de porfirinas totales sintetizados en las células LM3 con respecto a las LM2, a partir de una incubación de 3 h con ALA 1 mM, LM3 sintetiza casi

el doble de las porfirinas que las que sintetiza LM2 (Figuras IV.21 y IV.22). Esto concuerda con lo reportado anteriormente por Di Venosa et al. (2005).

Con respecto al rol del NaHS en la producción de EROs, los resultados presentados en este capítulo para LM3 son diferentes a los presentados para la línea LM2 en las Figuras IV.19 y IV.20. Para las células de la línea LM3, el NaHS no muestra efecto sobre la generación de EROs, mientras que para las células LM2 disminuye la cantidad de EROs generadas en la ALA-TFD.

El resultado obtenido con la línea LM2, con respecto a que el NaHS es eficaz en disminuir la formación de EROs, es avalado por reportes bibliográficos previos (Wen et al., 2013; Dong et al., 2015; Feng et al., 2018).

Sin embargo, los resultados obtenidos en LM3 son consistentes con el hecho de que la respuesta a la ALA-TFD no se vea modificada por la administración de NaHS en las células de dicha línea (Figura V.2).

En resumen, basados en nuestras condiciones experimentales, los resultados obtenidos en este capítulo son:

- La administración de NaHS no produce un efecto en la respuesta de células LM3 a la ALA-TFD.
- Las células LM3 producen GSH, y aumentan la producción de GSH ante la presencia de NaHS 10 mM.
- Las células LM3 sintetizan porfirinas a partir de ALA, y esa síntesis no se ve inhibida por concentraciones de NaHS de hasta 10 mM.
- Las células LM3 son capaces de sintetizar H₂S, y dicha síntesis se incrementa al aumentar la cantidad del sustrato L-cisteína disponible. Esta síntesis es inhibida por los 3 compuestos estudiados, PAG, AOA y Asp, pero no así por el inhibidor

de la síntesis de NO, L-NAME. Esto sugiere que en las células LM3 están presentes y activas las enzimas la CBS, la CAT/3MST y la CSE.

- Las células LM3 tienen la capacidad de sintetizar NO de manera endógena, a partir de L-arginina, sustrato de las isoenzimas NOSs. Dicha síntesis es inhibida por L-NAME, inhibidor general de las enzimas NOS, y también por el H₂S, tanto el producido endógenamente a partir de L-cisteína como el administrado exógenamente con el dador NaHS.

Todos los resultados expuestos en el capítulo anterior, alentaban a concluir que el H₂S administrado exógenamente o producido de manera endógena ejercía un efecto protector sobre la TFD, tanto mediada por ALA como por administración directa de otros FS. Sin embargo, lo más relevante de este capítulo es que dicha conclusión no puede generalizarse, ya que no fue posible obtener resultados análogos con la línea LM3.

El H₂S produce modulación de algunos parámetros biológicos también sobre la línea celular LM3, como pudo observarse en la síntesis de NO, pero está claro que las modificaciones que puedan producirse, no ejercen cambios en la respuesta a la ALA-TFD. Una de las principales diferencias entre las líneas LM2 y LM3 es la producción endógena de NO. Ello llevó a hipotetizar que si se eliminaba la producción de NO en las células LM3, con L-NAME, quizás la respuesta frente a la TFD en presencia de H₂S podía ser similar a las células LM2, pero esto no sucedió, corroborando que la interacción entre ambos gases no afecta la respuesta diferencial a la ALA-TFD.

La línea celular LM3 posee en general características similares a la LM2 por derivar de un adenocarcinoma mamario espontáneo en ratones BALB/c, pero resulta evidente que a pesar de aparentes similitudes, cada tumor se comporta de manera única frente a la TFD y a cualquier otra terapia oncológica, razón por la cual se vuelve tan relevante el constante estudio de nuevas terapias y la optimización de las ya existentes, como es el caso de esta tesis.

VI. Estudio de las enzimas de la vía metabólica del hemo y síntesis de H₂S.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los capítulos anteriores, y considerando los datos obtenidos a partir de la cuantificación de la síntesis de porfirinas en las diferentes líneas celulares utilizadas y la acumulación de porfirinas en los cultivos celulares por efecto del NaHS, surge la importancia de estudiar su efecto sobre la actividad de algunas de las enzimas de la vía metabólica del hemo, que genera porfirinas a partir de ALA.

En este capítulo se estudia, en parte, el efecto del NaHS en la actividad de dos enzimas del camino biosintético del hemo, como así también el perfil de síntesis de porfirinas de las líneas celulares LM2 y LM3 a partir de ALA 1 mM, en presencia o en ausencia del dador de H₂S, NaHS.

Por otro lado, se aborda el estudio de la actividad de los genes de las enzimas que sintetizan H₂S. Como se mencionó en la introducción (ítem I.2.4.2), en los mamíferos hay 3 enzimas principales que sintetizan H₂S: CBS, CSE y 3MST. Estas enzimas poseen diferente grado de expresión y localización subcelular, y su regulación podría estar involucrada en distintos eventos patológicos, entre ellos el cáncer (Hellmich y Szabo, 2015).

Concluyendo esta tesis, se informan los resultados de un análisis bioinformático de la actividad de los genes de las enzimas productoras de H₂S en diferentes tejidos tumorales, y se comparan con sus contrapartes no tumorales.

VI.1. Efecto del NaHS en el camino metabólico del hemo.

Para estos estudios, se utilizaron las células LM2 y LM3 porque, como se ha mostrado anteriormente, el NaHS posee efectos disímiles en ambas líneas celulares.

Recordando brevemente lo descrito en la introducción (I.1.3.2), el camino biosintético del hemo es un proceso que consta de 8 pasos enzimáticos. Comienza con la síntesis de ALA a partir de glicina y succinil-CoA en la mitocondria. A la generación de ALA, le suceden siete pasos enzimáticos, los cuatro primeros en el citoplasma y los últimos tres dentro de la mitocondria, hasta la formación del hemo, y todas las células son capaces de realizarlo (Figura VI.1).

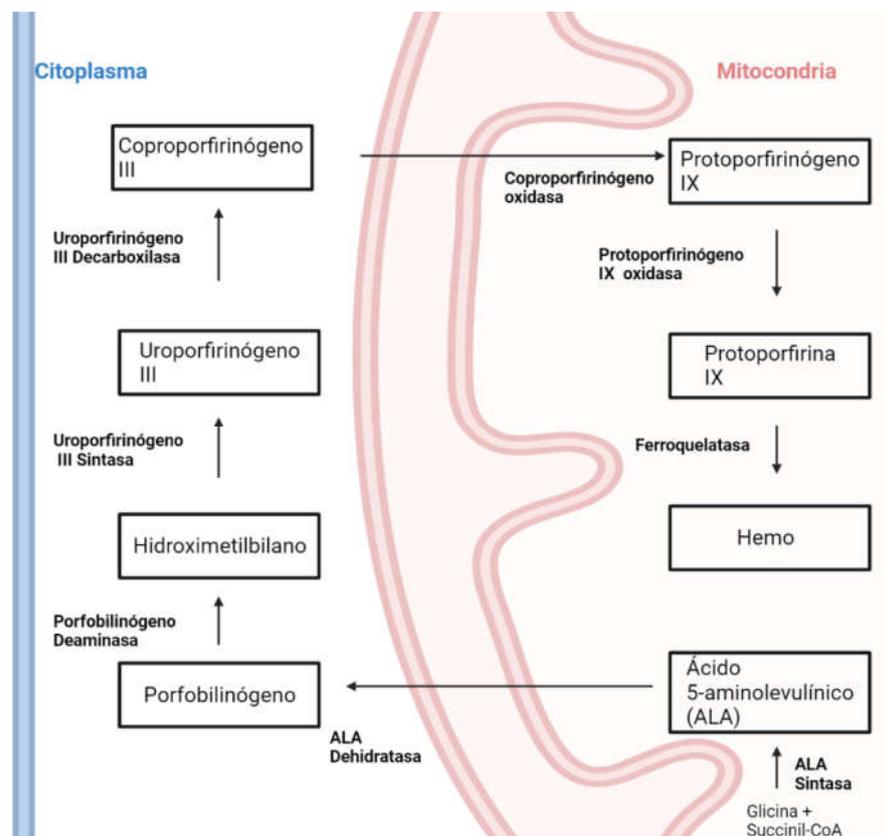


Figura VI.1. Esquema que representa la biosíntesis del grupo hemo. Dentro de los recuadros se señalan los intermediarios del proceso, y en negrita junto a las flechas las enzimas involucradas.

La ALA-TFD se vale de parte del camino de síntesis del hemo, al administrarle exógenamente ALA a las células se evita el paso de síntesis de ALA por la enzima ALA-S, que es la enzima regulable de la vía (Batlle et al., 1975).

Resultados previos indican que las líneas celulares LM2 y LM3, al ser incubadas con ALA 1 mM durante 3 h, alcanzan la saturación de la vía de síntesis de porfirinas. En estas condiciones, la síntesis de porfirinas alcanza un *plateau* o valor máximo de acumulación; independientemente del aumento de concentración de ALA extracelular utilizado (Di Venosa et al., 2005).

VI.1.1. Síntesis de porfirinas: análisis de intermediarios por HPLC de fase reversa en células LM2 y LM3.

Las dos líneas celulares estudiadas mostraron un comportamiento diferente frente a la incubación con NaHS. En el caso de LM2, se observó un efecto protector frente a la ALA-TFD, y una reducción en la síntesis y acumulación de porfirinas intracelulares. Por el contrario, en las células LM3 incubadas con NaHS, no se observó dicha reducción en la síntesis y acumulación de porfirinas intracelulares, ni la protección de las células frente a la ALA-TFD.

Con el objetivo de profundizar el estudio de estas diferencias, se analizaron los productos de la síntesis de porfirinas en ambas líneas celulares, a partir de ALA 1 mM y en ausencia o presencia de NaHS 10 mM, por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (*RP-HPLC*, por sus siglas en inglés, ver Materiales y Métodos III.25). Esta técnica permite identificar cada uno de los intermediarios porfirínicos generados en la vía metabólica de la síntesis del hemo.

Para identificar las señales correspondientes a cada uno de los intermediarios, se utilizó un patrón de porfirinas comercial como estándar y una solución ácida patrón de Pp IX. Ambos patrones se corren en las mismas condiciones experimentales que las muestras, lo que permite identificar los picos y tiempos de retención de cada especie y así identificar los picos obtenidos. A los fines de este trabajo, se utilizó esta técnica con

la finalidad de identificar el conjunto de las especies sintetizadas presentes en cada línea celular, permitiendo conocer las cantidades relativas de cada especie intermediaria.

La Figura VI.2 muestra los perfiles representativos para los patrones utilizados, uno de los cuales contiene una mezcla comercial de seis porfirinas en medio ácido (uroporfirina, heptaporfirina, hexaporfirina, pentaporfirina, coproporfirina y mesoporfirina), y el otro corresponde a una solución ácida de Pp IX.

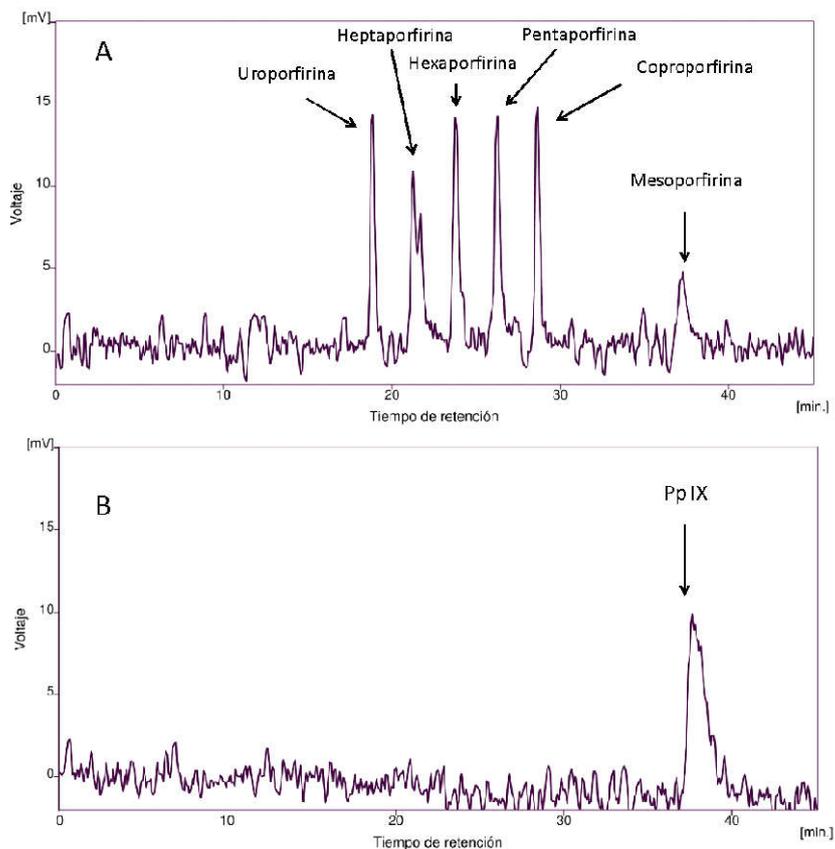


Figura VI.2. Cromatogramas representativos de los diferentes estándares de porfirinas utilizados. A) mezcla comercial equimolar de diferentes intermediarios en medio ácido. De izquierda a derecha, los picos corresponden a cada uno de los componentes, que son: uroporfirina, heptaporfirina, hexaporfirina, pentaporfirina, coproporfirina y mesoporfirina. B) solución ácida patrón de Pp IX.

La Figura VI.3 muestra los cromatogramas representativos de los extractos ácidos obtenidos de la línea LM2 incubada 3 h con ALA 1 mM, con y sin NaHS 10 mM. En la Tabla VI.1 se muestra la cantidad relativa de porfirinas, expresada como porcentaje del total de porfirinas en dicha línea celular. El análisis de estos resultados reveló que la línea LM2 produce principalmente Pp IX a partir de una incubación de 3 h con ALA 1 mM, y que en presencia de 10 mM NaHS, la cantidad de porfirinas totales sintetizadas desciende notablemente, ya que no se detectan señales de ningún intermediario en el cromatograma, en nuestras condiciones de trabajo. Dicho resultado es concordante con el obtenido anteriormente en la cuantificación de porfirinas totales, que descienden drásticamente cuando la células LM2 son co-incubadas con ALA 1 mM y NaHS 10 mM, con respecto a las células incubadas sólo con ALA 1 mM (Figuras IV.10 IV.11 y IV.21).

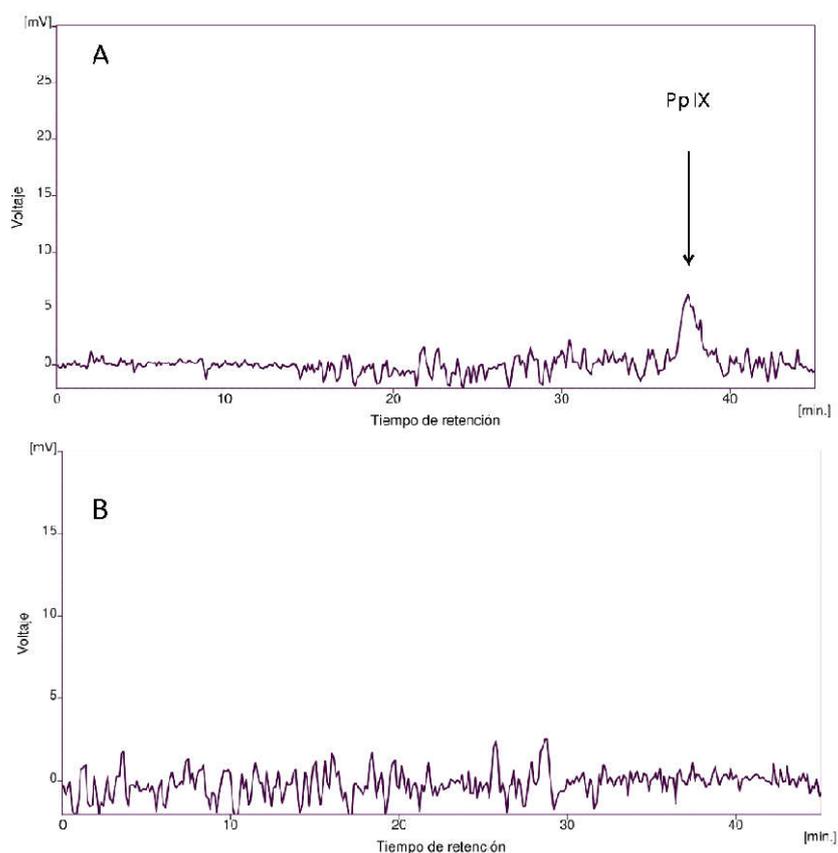


Figura VI.3. Perfil representativo de intermediarios en la síntesis de porfirinas en la línea celular LM2 a partir de la incubación de 3 h de ALA 1 mM, A) control sin NaHS y B) con NaHS 10 mM. El análisis se realizó por RP-HPLC, como fue descrito en Materiales y Métodos III.25.

Tabla VI.1. Análisis por RP-HPLC de los intermediarios involucrados en la síntesis de porfirinas en la línea LM2.

Porfirina	Porcentaje relativo al total	
	ALA 1mM	ALA 1 mM + NaHS 10 mM
Uroporfirina	ND	ND
Heptaporfirina	ND	ND
Hexaporfirina	ND	ND
Pentaporfirina	ND	ND
Coproporfirina	ND	ND
Protoporfirina	100	ND

ND= No detectable.

En el cromatograma que corresponde a LM2 sin NaHS, se señala el pico correspondiente a Pp IX, pero no se observan los picos característicos de las otras porfirinas presentes comparadas con los estándares utilizados (Figura VI.2).

En el caso de las células LM3 incubadas durante 3 h con ALA 1 mM, el análisis de RP-HPLC muestra que dichas células producen en mayor proporción Pp IX y uroporfirina. Al co-incubar dichas células con ALA 1 mM junto con NaHS 10 mM bajo las mismas condiciones, se observa que disminuyen los picos correspondientes a coproporfina y Pp IX y aumentan los picos de otros intermediarios, siendo los mayoritarios, uroporfirina, hepta y hexaporfirina. Los cromatogramas representativos se muestran en la Figura VI.4.

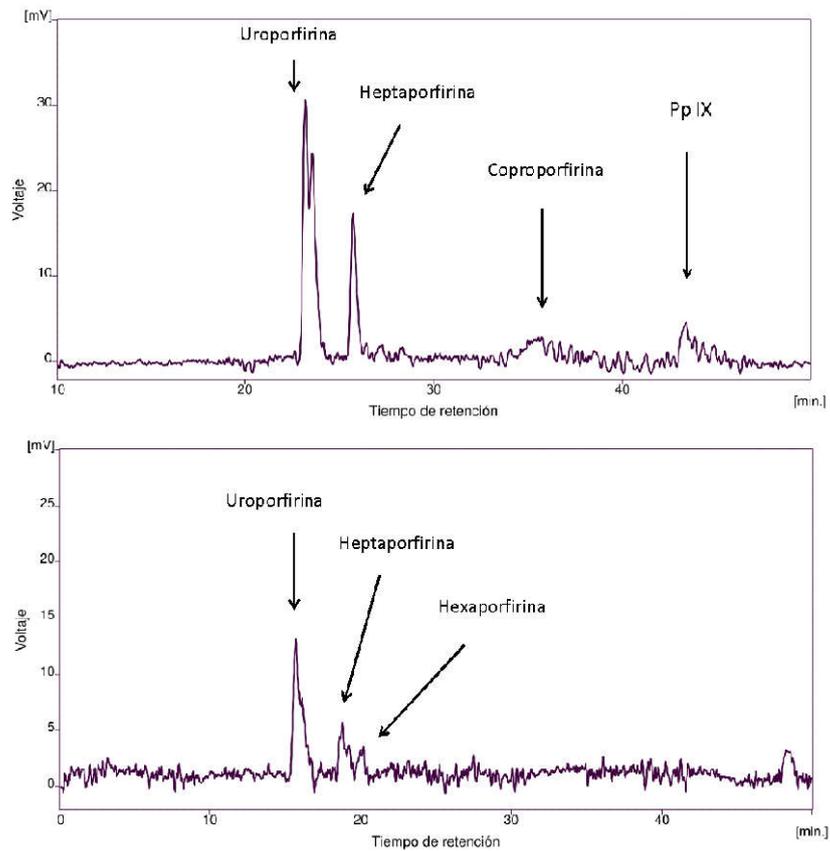


Figura VI.4. Perfil representativo de intermediarios en la síntesis de porfirinas en la línea celular LM3 a partir de la incubación de 3 h de ALA 1mM, A) sin NaHS y B) con 10 mM NaHS. El perfil fue obtenido por RP-HPLC, según fue descrito en Materiales y Métodos III.25.

La Tabla VI.2 muestra la cantidad relativa de porfirinas en las células de la línea LM3, expresadas como porcentaje respecto del total.

Tabla VI.2. Análisis por RP-HPLC de los intermediarios involucrados en la síntesis de porfirinas en la línea LM3.

Porfirina	Porcentaje (relativo al total)	
	ALA 1 mM	ALA 1mM + NaHS 10 mM
Uroporfirina	32,4	42,8
Heptaporfirina	14,3	22,7
Hexaporfirina	4,5	29,9
Pentaporfirina	2,5	5,2
Coproporfirina	5,7	ND
Protoporfirina	40,7	ND

ND= No detectable

Se puede observar en la Tabla VI.2, que en las células LM3 luego de 3 h de incubación con ALA 1 mM, los picos de uroporfirina y Pp IX corresponden a más del 70% del total de los productos formados en estas condiciones experimentales.

Por otro lado, al ser co-incubadas durante 3 h con ALA 1 mM y NaHS 10 mM, el perfil de intermediarios producidos por las células se modifica sustancialmente. El producto mayoritario pasa a ser uroporfirina, seguido de hexa y heptaporfirina en cantidades similares; y sin señal detectable de coproporfirina y Pp IX. En los cromatogramas correspondientes se señalan los picos de los intermediarios identificados.

Teniendo en cuenta la desaparición de los picos correspondientes a coproporfirina y Pp IX y el aumento de los intermediarios heptaporfirina y hexaporfirina, este resultado estaría indicando que la incubación con NaHS 10 mM estaría inhibiendo a la enzima URO-D en las células de la línea LM3.

VI.1.2. Determinación de porfirinas totales sintetizadas en explantes de tumores LM2 y LM3.

Con la finalidad de buscar explicaciones para las diferencias encontradas, se estudió la actividad de algunas enzimas de la vía metabólica del hemo, mediante una aproximación *ex-vivo*. Este recurso se empleó para aumentar la cantidad de células disponibles y mejorar la sensibilidad de las técnicas. Los explantes se obtuvieron a partir de tumores generados por inyección subcutánea de las líneas LM2 y LM3 en ratones BALB/c (Materiales y Métodos II.23).

Como paso previo, se determinó la síntesis de porfirinas *ex vivo* a partir de ALA en los explantes de tumor en las mismas condiciones que en las líneas celulares, para corroborar que el efecto en el tejido tumoral fuera el mismo que en las células en cultivo. Los resultados de dichos experimentos se muestran en las Figuras VI.5 y VI.6.

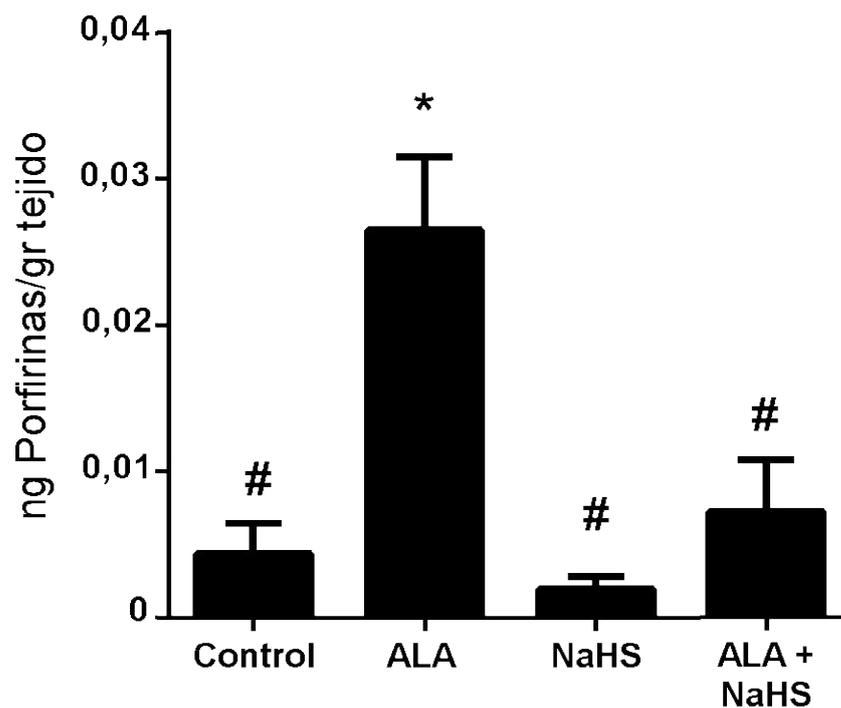


Figura VI.5. Síntesis de porfirinas *ex vivo* a partir de ALA 1 mM durante 3 h en presencia o ausencia de NaHS 10 mM, en explantes de tumores derivados de la línea LM2. Los datos son media \pm DS (3 réplicas), * $p < 0,05$ con respecto al control sin ALA ni NaHS, y # $p < 0,05$ con respecto a ALA 1mM. ANOVA seguido de test de Tukey.

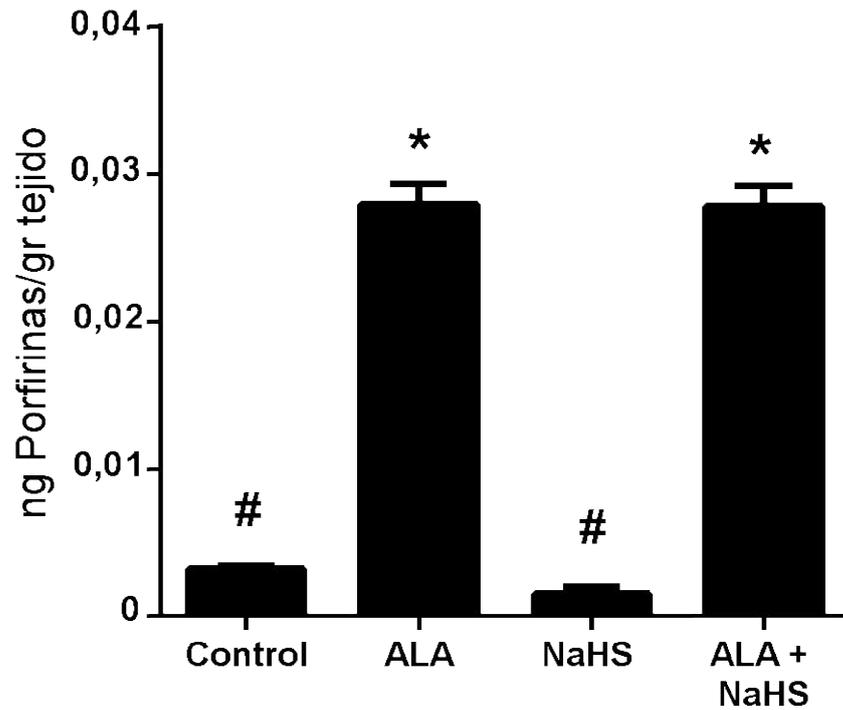


Figura VI.6. Síntesis de porfirinas *ex vivo* a partir de ALA 1 mM durante 3 h en presencia o ausencia de NaHS 10 mM, en explantes de tumores derivados de la línea LM3. Los datos son media \pm DS (3 réplicas), * $p < 0,05$ con respecto al control sin ALA ni NaHS, y # $p < 0,05$ con respecto a ALA 1mM. ANOVA seguido de test de Tukey.

En la Figura VI.5, se puede observar que la síntesis de porfirinas aumenta en el tejido tumoral como consecuencia del agregado de ALA 1 mM durante 3 h, en comparación con el tejido sin ALA. Como se mostró en la Figura VI.1, el ALA sirve de sustrato a la enzima ALA-D, la cual permite que comience la síntesis porfirinas. La cantidad de porfirinas sintetizadas por el tejido, en cambio, disminuye cuando además de ALA 1 mM, se agrega NaHS 10 mM. Este efecto inhibitorio del NaHS sobre la síntesis y acumulación de porfirinas en células LM2 en cultivo ya fue descrito en la sección IV (Figura IV.10 y Figura IV.21). Entonces, el efecto del NaHS sobre la síntesis de porfirinas en células LM2 es similar cuando se trata de células en cultivos 2D y en explantes provenientes de dichas células.

En el caso de los tumores generados a partir de células LM3, nuevamente se observa una similitud en el efecto del NaHS sobre la síntesis de porfirinas en las células en cultivos 2D (Figura IV.22 B) y en explantes generados a partir de dicha línea celular

(Figura VI.6). En ambos modelos, no se observan cambios en la síntesis de porfirinas totales a partir de ALA 1 mM por la adición de NaHS 10 mM.

El hecho de que ambos modelos (cultivos celulares 2D y explantes de tejido tumoral) se comportan de la misma manera respecto a la síntesis de porfirinas con ALA 1 mM durante 3 h, y respondan de manera similar al NaHS, permitió avanzar en el estudio de la actividad enzimática en los tejidos tumorales para mejorar la sensibilidad de las técnicas, y continuar con la comparación de las actividades enzimáticas de las líneas celulares usando como fuente celular los explantes derivados de ellas.

VI.1.3. Determinación de diferentes actividades enzimáticas involucradas en la síntesis de porfirinas.

En el CIPYP, lugar donde se llevó a cabo esta tesis, se realiza en forma habitual el diagnóstico bioquímico y genético de las porfirias, enfermedades metabólicas producidas por fallas enzimáticas en el camino metabólico del hemo. Por este motivo, fue posible adaptar los protocolos bioquímicos utilizados para la determinación de las actividades de algunas de las enzimas que se utilizan habitualmente en el Centro para el diagnóstico clínico, al modelo de investigación básica en los tumores generados por las líneas LM2 y LM3.

Las enzimas estudiadas fueron ALA-D y PBG-D, dado que son las primeras enzimas de la vía, y que al no sintetizar porfirinas, no pueden ser estudiadas mediante RP-HPLC. Por otro lado, si bien el RP-HPLC no brinda información directa acerca de las actividades enzimáticas, puede dar indicios de qué enzimas están inhibidas, y ambas aproximaciones resultan complementarias.

VI.1.3.1. Actividad enzimática específica ALA-D y PBG-D en homogenatos de tumores de ambas líneas celulares.

Para medir la actividad específica de las enzimas ALA-D y PBG-D, en primer lugar se pusieron a punto las técnicas a partir de los protocolos ya mencionados, y luego se determinaron las actividades en homogenatos de tumores originados subcutáneamente en ratones singeneicos BALB/c, a partir de las líneas celulares LM2 y LM3 (ver Materiales y Métodos III.23).

VI.1.3.1.1. Actividad enzimática específica de ALA-D.

Se determinó la actividad específica de ALA-D en lisado de glóbulos rojos humanos en presencia de NaHS. Se emplearon dichas células por ser una muestra biológica de determinación habitual en los pacientes, que se realiza en el CIPYP. Los resultados se muestran en la Figura VI.7.

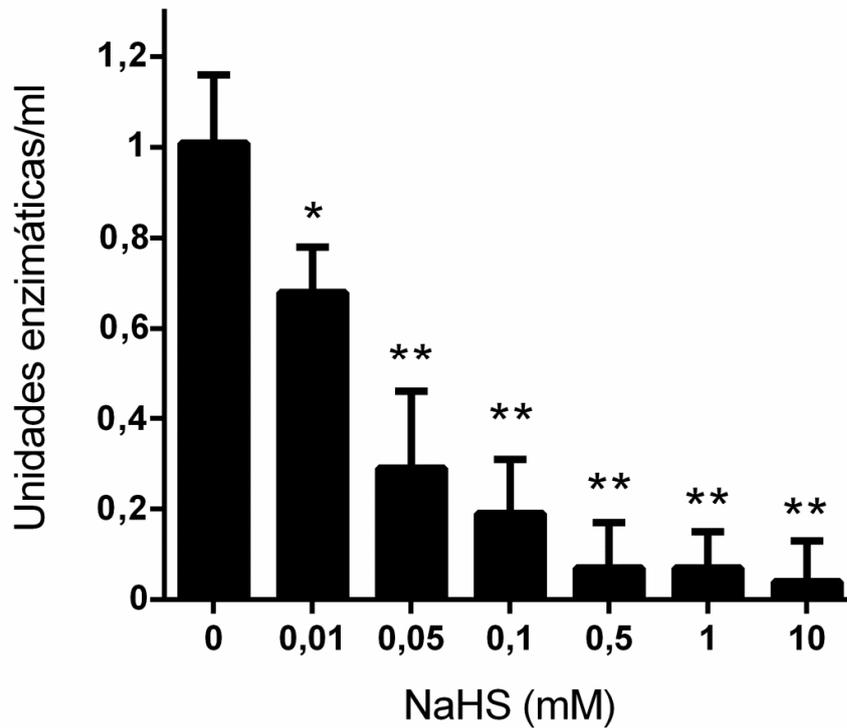


Figura VI.7. Actividad enzimática específica ácido 5-aminolevulínico dehidratasa (ALA-D) incubada con diferentes concentraciones de NaHS (0,01-10 mM). La fuente enzimática fue un lisado de glóbulos rojos humanos obtenidos a partir de sangre fresca. Los datos son media \pm DS (3-4 réplicas) realizadas por duplicado, * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto del control sin NaHS, ANOVA y Test de Dunnett.

Como muestra la Figura VI.7, el NaHS inhibe la actividad específica de la enzima ALA-D proveniente de lisado de eritrocitos humanos a partir de una concentración de 0,01 mM.

En las Figuras VI.8 y VI.9 se observan los resultados de las actividades específicas de la enzima ALA-D obtenida a partir de homogenatos de tumores de las líneas LM2 y LM3 respectivamente, incubados con diferentes concentraciones de NaHS (0,01-10 mM).

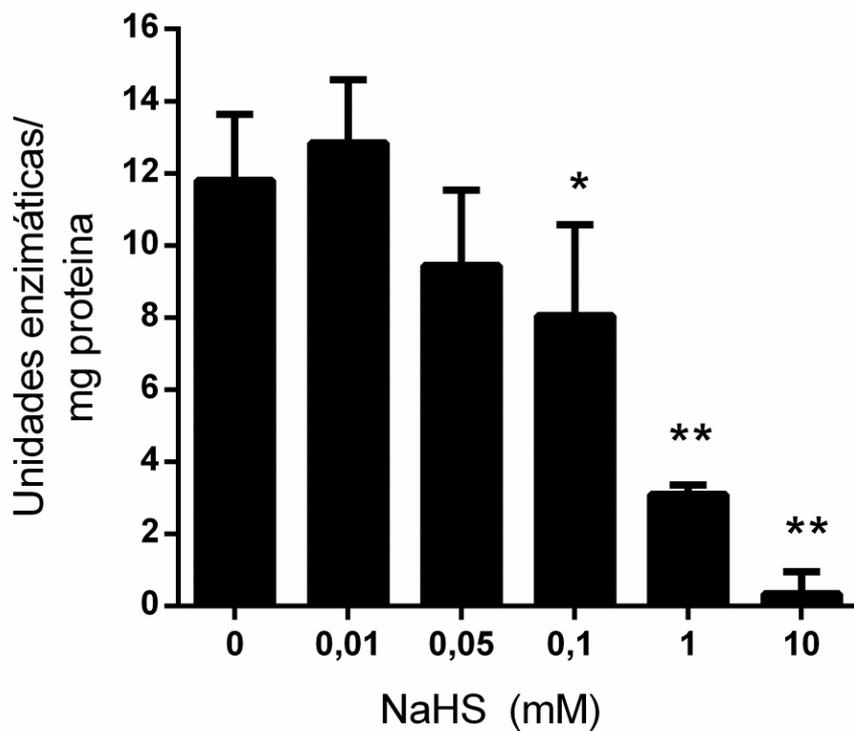


Figura VI.8. Actividad enzimática específica de la enzima ALA-D incubada con NaHS (0,01-10 mM). La fuente enzimática fueron homogenatos de tumores generados en ratones BALB/c a partir de células LM2. Los datos son media \pm DS (3-4 réplicas) realizadas por duplicado, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ respecto del control sin NaHS, ANOVA y Test de Dunnett.

En el caso de LM2, la incubación con NaHS reduce significativamente la actividad específica de la enzima ALA-D a partir de una concentración de 0,1 mM, y el grado de inhibición aumenta al incrementarse la concentración de NaHS a 1 y 10 mM. La actividad específica de la enzima disminuye en un 32% a 0,1 mM de NaHS; un 74% a 1 mM de NaHS; y un 97% a 10 mM de NaHS.

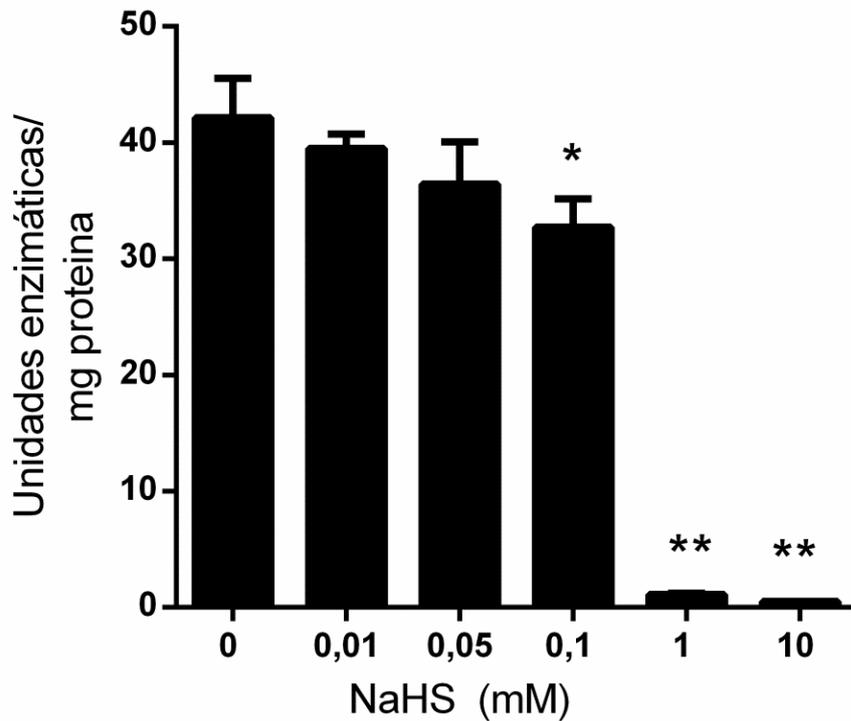


Figura VI.9. Actividad enzimática específica de la enzima ALA-D incubada con NaHS (0,01-10 mM). La fuente enzimática fueron homogenatos de tumores generado en ratones BALB/c a partir de células LM3. Los datos son media \pm DS (3-4 réplicas) realizadas por duplicado, * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto del control sin NaHS, ANOVA y Test de Dunnett.

Al evaluar la actividad específica de la enzima ALA-D en homogenatos de tumores de la línea LM3, la inhibición ocurre a partir de una concentración de 0,1 mM, y en esas condiciones la actividad específica se reduce un 24%. A concentraciones mayores de 1 mM, el grado de inhibición alcanzado es el máximo. En esas condiciones, la actividad específica se reduce un 95%.

Al realizar un análisis comparativo entre las actividades enzimáticas de ALA-D, proveniente de tumores de ambas líneas celulares, se observa que la actividad específica de la enzima ALA-D es aproximadamente 3,5 veces mayor en los tumores LM3 que en los LM2 en condiciones basales, diferencia estadísticamente significativa (* $p < 0,05$, respecto al valor correspondiente a LM2, ANOVA seguido del test de Tukey).

La actividad de ALA-D de tumores LM3 es significativamente mayor en presencia de NaHS 0,01 mM, 0,05 mM y 0,1 mM (*p< 0,05, respecto al valor correspondiente a tumores LM2, ANOVA seguido del test de Tukey). A concentraciones mayores a 0,1 mM, las actividades son tan bajas que no se registran diferencias significativas entre la actividad enzimática provenientes de ambas líneas celulares.

VI.1.3.1.2. Actividad enzimática específica de PBG-D.

Se utilizaron los mismos protocolos existentes en el CIPYP a partir de lisado de glóbulos rojos humanos, para la puesta a punto de la técnica de actividad de PBG-D en presencia de NaHS, y el resultado se muestra en la Figura VI.10.

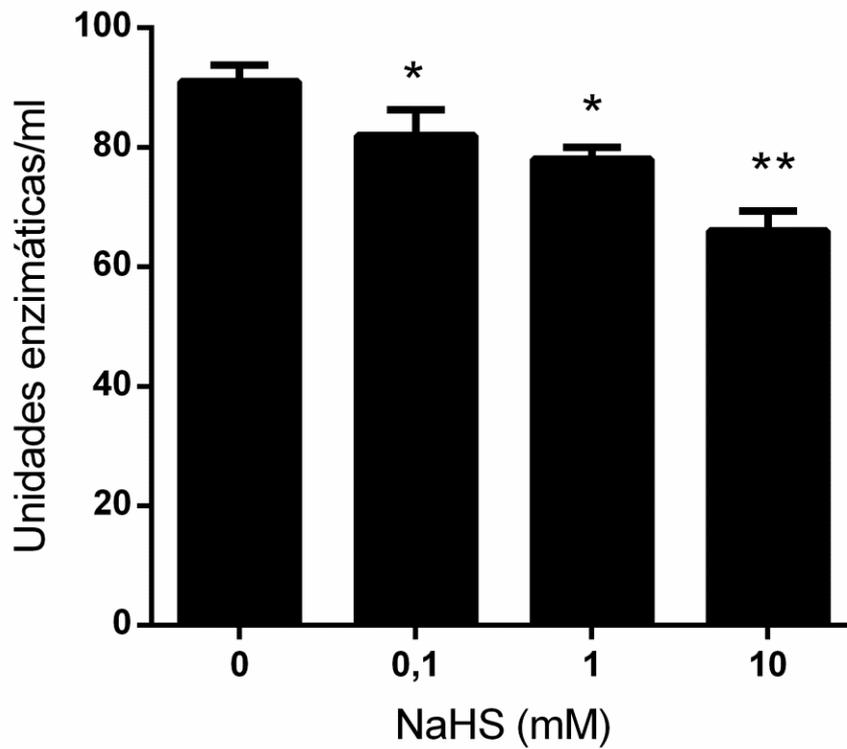


Figura VI.10. Actividad enzimática específica de porfobilinógeno deaminasa (PBG-D) incubada con diferentes concentraciones de NaHS (0,1-10 mM). La fuente enzimática fue un lisado de glóbulos rojos humanos obtenidos a partir de sangre fresca. Los datos son media \pm DS (3-4 réplicas) realizadas por duplicado, * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto del control sin NaHS, ANOVA y Test de Dunnett.

Las Figuras VI.11 y VI.12 muestran el efecto del NaHS sobre la actividad específica de la enzima PBG-D en tumores de las líneas LM2 y LM3.

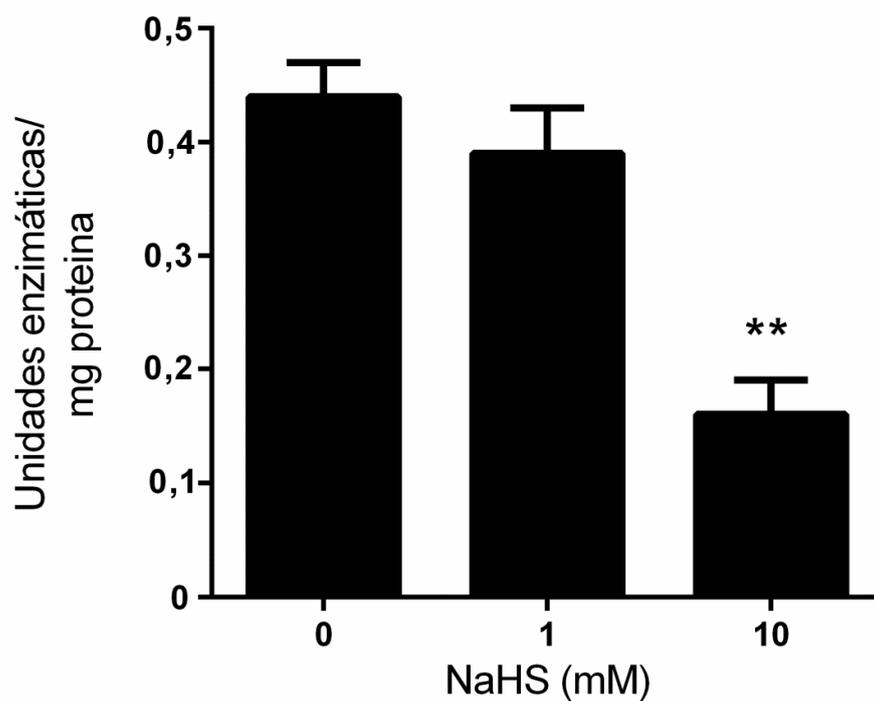


Figura VI.11. Actividad enzimática específica de la enzima PBG-D expuesta a NaHS (1-10 mM). La fuente enzimática fueron homogenatos de tumores generados en ratones BALB/c a partir de células LM2. Los datos son media \pm DS (4 réplicas) realizadas por duplicado, **p < 0,01 respecto del control sin NaHS, ANOVA seguido del test de Dunnet.

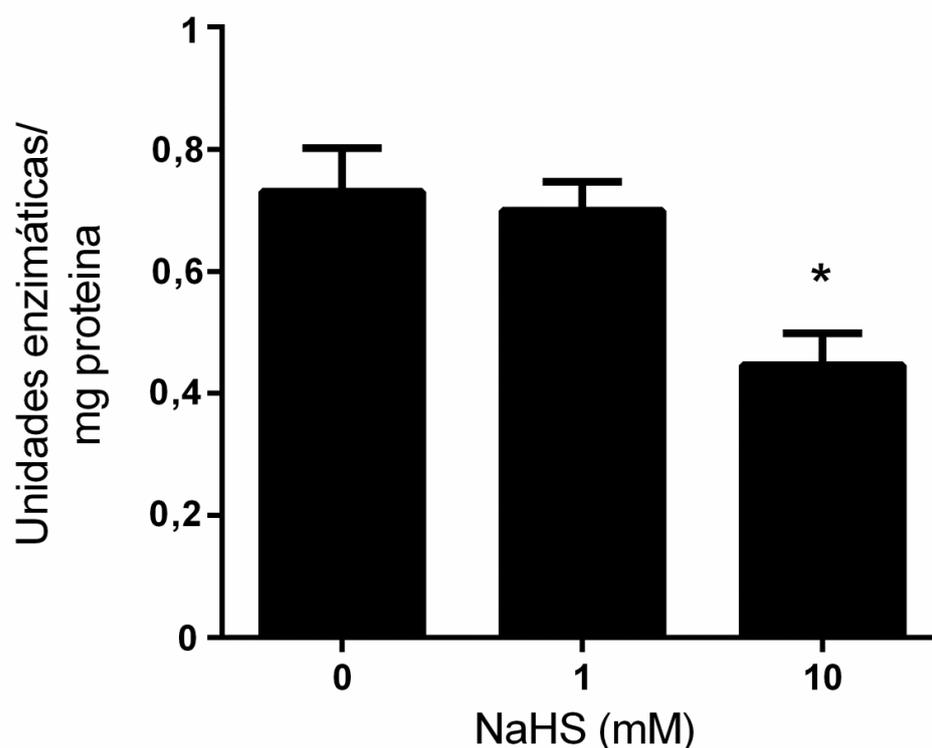


Figura VI.12. Actividad enzimática específica de la enzima PBG-D expuesta a NaHS (1-10 mM). La fuente enzimática fueron homogenatos de tumores generados en ratones BALB/c a partir de células LM3. Los datos son media \pm DS (4 réplicas) realizadas por duplicado, * $p < 0,05$ respecto del control sin NaHS, ANOVA seguido del test de Dunnet.

La presencia de NaHS 10 mM inhibe la actividad específica de la enzima PBG-D en tumores de ambas líneas celulares. Dicha actividad bajo las presentes condiciones es un 64% y 40% menor en relación a su respectivo control para tumores LM2 y LM3, respectivamente.

Al comparar la actividad específica de las enzimas provenientes de ambas líneas celulares, se observa que la actividad de la enzimas PBG-D de LM3 es significativamente mayor tanto en condiciones control (sin NaHS), como en presencia de NaHS 1 y 10 mM (* $p < 0,05$, respecto al valor correspondiente a LM2, ANOVA seguido del test de Tukey). La enzima PBG-D de LM3 per se tiene una actividad específica 1,6 veces mayor que la proveniente de LM2.

VI.2. Análisis bioinformático de las enzimas que generan H₂S.

Se ha descrito en los capítulos anteriores cómo el NaHS puede tener efectos sobre distintas variables que afectan a la TFD, y en particular a la ALA-TFD. Por esta razón, resulta interesante poder conocer si existen tejidos que tengan una mayor o menor producción de H₂S que otros, de forma tal de buscar el tratamiento más adecuado a cada tipo de tumor.

Aún no existen métodos estandarizados y confiables para medir el H₂S producido en los tejidos (Zhu et al., 2018). Una manera de conocer la posible producción de H₂S en diferentes tejidos, es a través de análisis moleculares de ADN y ARN, ya que conociendo la cantidad de copias o de ARN mensajero que haya para un determinado gen, se puede conocer cuán activo está ese gen en el tejido. Así, se puede buscar si existen correlaciones entre la actividad génica en diferentes muestras de tejido tumoral y no tumoral, e intentar identificar patrones que permitan entender mejor la relación entre la síntesis de H₂S y el cáncer.

Con este objetivo, utilizando bases de datos con grandes cantidades de muestras de tejido tumoral y no tumoral, se analizaron la cantidad de copias y la actividad transcripcional de los genes que codifican para las tres enzimas productoras de H₂S en mamíferos, que como se indicó anteriormente son: la cistationina β-sintasa (CBS), la cistationina γ-liasa (CSE), y la 3-mercaptopiruvato sulfotransferasa (3MST).

VI.2.1. Análisis genómicos.

Utilizando los datos proporcionados por GDC (*Genome Data Commons, NCI, EEUU*; <https://portal.gdc.cancer.gov/>), se pueden observar alteraciones genéticas en la variación del número de copias (*CNV en inglés, Copies Number Variation*) de una gran variedad de genes, tomados del proyecto El Atlas del Genoma del Cáncer (*TCGA en inglés, The Cancer Genome Atlas*).

Los *CNV* son regiones del genoma que varían en el número de copias (Lauer y Gresham, 2019). Son típicamente deleciones o inserciones de fragmentos de ADN que van de entre 50-100 pares de bases hasta 1 millón de pares de bases, y está postulado que juegan un rol importante en las enfermedades humanas y la diversidad poblacional (Girirajan et al., 2011).

Un *CNV* es entonces la variación de copias de un gen en particular que varía entre individuos. Esta variación puede incluir tener más copias de las 2 usuales (tres, cuatro, cinco o más), o menos copias, lo que puede producir un desbalance (aumento o disminución) del dosaje del producto de dicho gen.

No se encontraron publicaciones que consideren la presencia de variaciones en el *CNV* de los genes que codifican para las enzimas productoras de H₂S en humanos (CBS, CSE y 3MST). Enfocando el análisis en estos tres genes, se observó que el *CNV* de dichos genes está modificado, en una proporción de las muestras, en la mayoría de los tumores estudiados, como se muestra en la Figura VI.13.

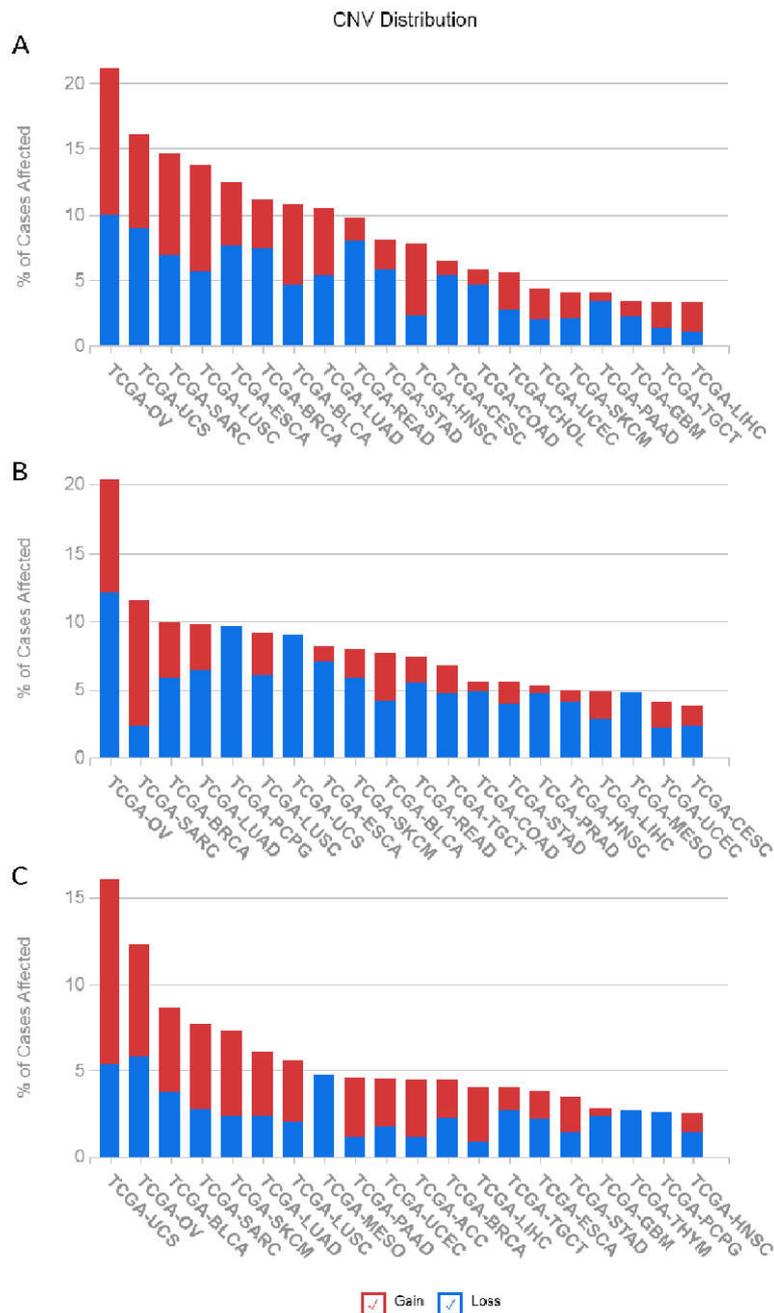


Figura VI.13. Ganancia (rojo) o pérdida (azul) del número de copias en los genes de las 3 enzimas productoras de H₂S en seres humanos. A) CBS; B) CSE y C) 3MST. Los datos son los 20 tipos de tumores que más CNV presentaron de un panel de muestras de 33 tipos de tumores, del *Genome Data Commons, NCI, EEUU* (<https://portal.gdc.cancer.gov/>). Referencias de los tumores: BRCA: mama; OV: ovario; COAD: colon; SKCM: piel; BLCA: vejiga; UCS: útero; LUAD y LUSC: bronquios y pulmón; PRAD: próstata; SARC: sarcomas (huesos, tejido conectivo); STAD: estómago; ESCA: estómago, esófago; PCPG: feocromocitoma y paraganglioma.

En la Figura VI.13 se observa que el *CNV* para las 3 enzimas está modificado en la mayoría de los tumores que forman parte del panel. El eje de las ordenadas de los gráficos corresponde a la frecuencia de casos afectados (tanto por aumento o disminución de *CNV*), y el eje de las abscisas, al tipo de tumor. Las barras de la figura representan, en azul, el porcentaje de disminución en el *CNV*, y en rojo, los aumentos. De esta manera, si una barra aparece mayormente azul, significa que en ese tipo de tumor, en la mayoría de los casos afectados, lo están por una disminución en el *CNV* para ese gen.

En relación al cáncer de mama (BRCA, n= 1072), el mismo aparece entre los tumores que registran un mayor porcentaje de *CNV* para el caso de las enzimas CBS y CSE: cerca del 11 % de los tumores de mama analizados presentó aumento o disminución en el número de copias del gen que codifica para esas proteínas. Para el gen de la enzima 3MST, la variación es menor, solo el 4 % de los tumores analizados presentó mayor o menor *CNV*.

Las muestras de cáncer de ovario (OV) también aparecen entre las que más aumento o disminución de *CNV* presentan. De 585 casos analizados, un 20% mostró variación en el *CNV* para los genes de CBS y CSE, y un 11 % para el de la 3MST.

Los tumores de útero (UCS, n = 56) y los sarcomas (SARC, n = 260) también mostraron valores comparativamente altos de variación en los *CNV* estudiados. En útero, se encontró aumento o disminución en el 16 % de los casos para CBS, en el 9 % para CSE y en el 16 % para 3MST. Por otro lado, en sarcomas, se encontraron variaciones en el 15 % de los casos en el gen de la CBS, en el 12 % para el gen de la CSE, y en el 8 % en el gen de la 3MST.

A pesar de que se observan variaciones en el número de copias de los genes de las enzimas productoras de H₂S, esto no significa que necesariamente se traduzca en un aumento o disminución de la producción endógena de H₂S en dichos tejidos.

VI.2.2. Análisis de expresión génica.

Continuando con el análisis bioinformático, y utilizando la herramienta *GEPIA* (del inglés, *Gene Expression Profiling Interactive Analysis*, <http://gepia.cancer-pku.cn/detail.php>), se analizó la expresión génica del mismo panel de 33 tumores del proyecto *TCGA* y además del proyecto de Expresión genotipo-tejido (*GTEX* en inglés, *Genotype-tissue expression*). El proyecto *GTEX* se enfoca en la regulación génica y la relación de la expresión génica entre los tejidos tumorales y no tumorales. Con esta herramienta se comparó el número de transcritos de los genes correspondientes a las 3 enzimas productoras de H₂S: CBS, CSE y 3MST.

En la Figura VI.14 se muestran los gráficos correspondientes al número de transcritos de cada gen, en muestras de tejido tumoral y no tumoral de los mismos órganos.

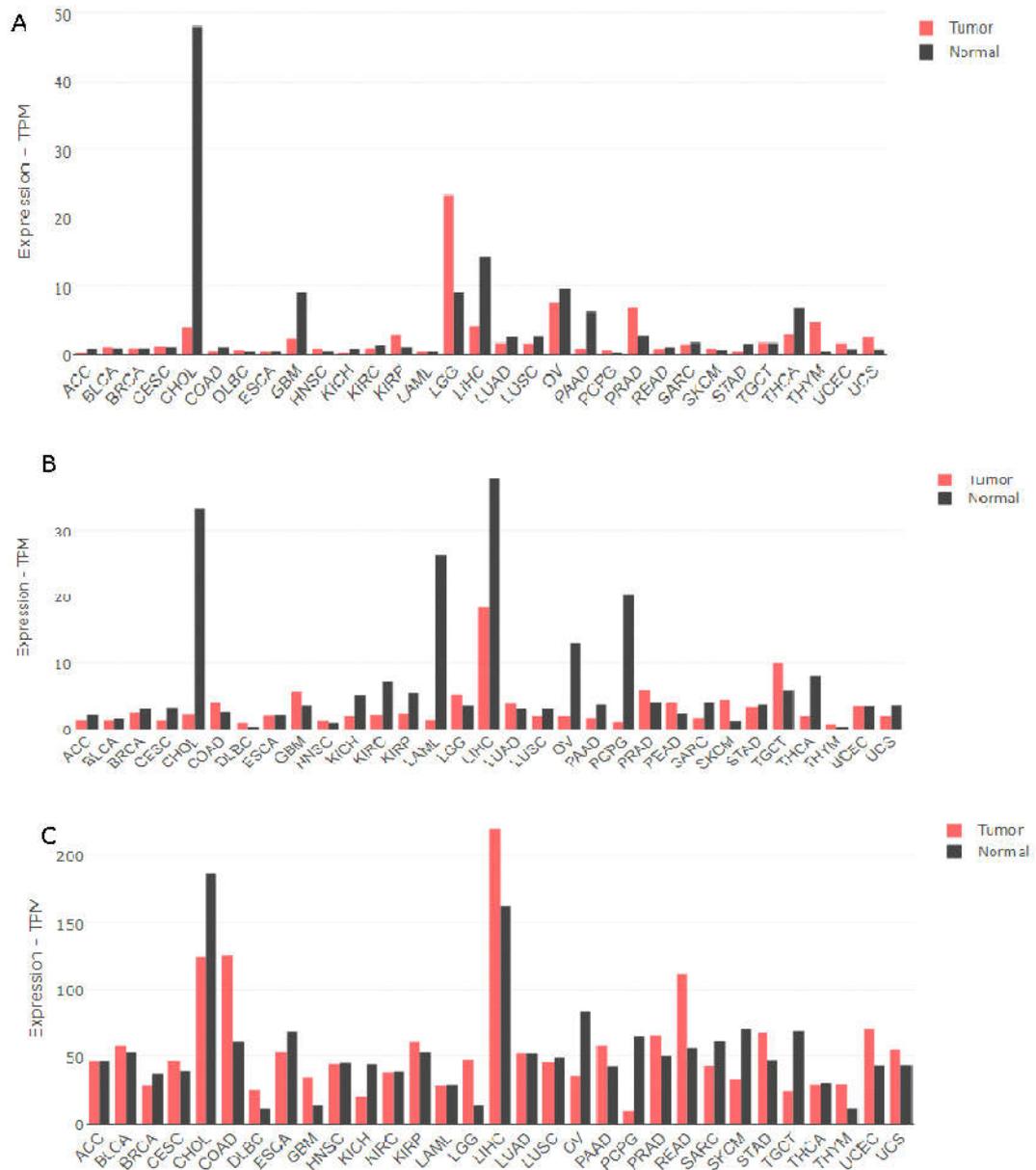


Figura VI.14. Expresión génica expresada en número de transcritos por millón de genes de A) CBS; B) CSE y C) 3MST. Las barras rojas corresponden al tejido tumoral y las negras al tejido no tumoral. Los datos y los gráficos fueron generados utilizando la herramienta *GEPIA* (<http://gepia.cancer-pku.cn/detail.php>). Referencias de los tumores: BRCA: mama; OV: ovario; COAD: colon; SKCM: piel; BLCA: vejiga; LUAD y LUSC: bronquios y pulmón; PRAD: próstata; SARC: sarcomas (huesos, tejido conectivo); STAD: estómago; ESCA: estómago, esófago; PCPG: feocromocitoma y paraganglioma; CHOL: colangiocarcinomas; THYM: timoma;

ACC: carcinoma adrenocortical; KICH: carcinoma renal de células cromóforas; KIRC: carcinoma renal de células claras; UCS: útero; CESC: cuello uterino; ESCA; HNSC: carcinoma de células escamosas cervical y adenocarcinoma endocervical; GMB: glioblastoma; READ: recto; THCA: tiroides; TGCT: células testiculares germinales; LIHC: hepatocarcinoma; LAML: leucemia mieloide aguda; LGG: glioma cerebral de bajo grado.

Como se observa en la Figura VI.14, la expresión de los genes presenta mucha variabilidad, y no se puede establecer un único patrón en cuanto a mayor o menor expresión de los genes y el tejido tumoral. Se observa que algunos tejidos presentan un aumento en la expresión de las enzimas cuando se vuelven tumorales, otros una disminución en la expresión de dichos genes, y otros presentan una combinación: mientras que para algunas enzimas aumenta la expresión con respecto al tejido no tumoral, para otras disminuye.

GEPIA permite también el análisis estadístico de la expresión génica entre tejido tumoral y no tumoral.

Los gráficos de caja que permiten realizar el *GEPIA* son una manera de representar los datos según su distribución en cuartiles. El borde inferior de la caja representa el valor del primer cuartil, y el borde superior, el tercer cuartil. Es decir, que en el interior de la caja se encuentran el 50 % de los valores de la muestra. La línea que cruza la caja representa la mediana. La mediana corta a la distribución en dos partes con igual cantidad de datos, por lo que da una idea de la simetría de los datos. Finalmente, los “bigotes”, que son las líneas que se extienden de los bordes superior e inferior de la caja, marcan los límites superior e inferior, respectivamente. Los valores que estén más allá de esos límites se consideran valores atípicos.

En las siguientes figuras se presenta el análisis de expresión diferencial para los tres genes estudiados, en una selección de tejidos. En la Figura VI.15 se incluyeron tejidos relevantes o citados en el desarrollo de esta tesis: mama (BCRA), ovario (OV), colon (COAD) y cerebro (glioblastomas, GBM).

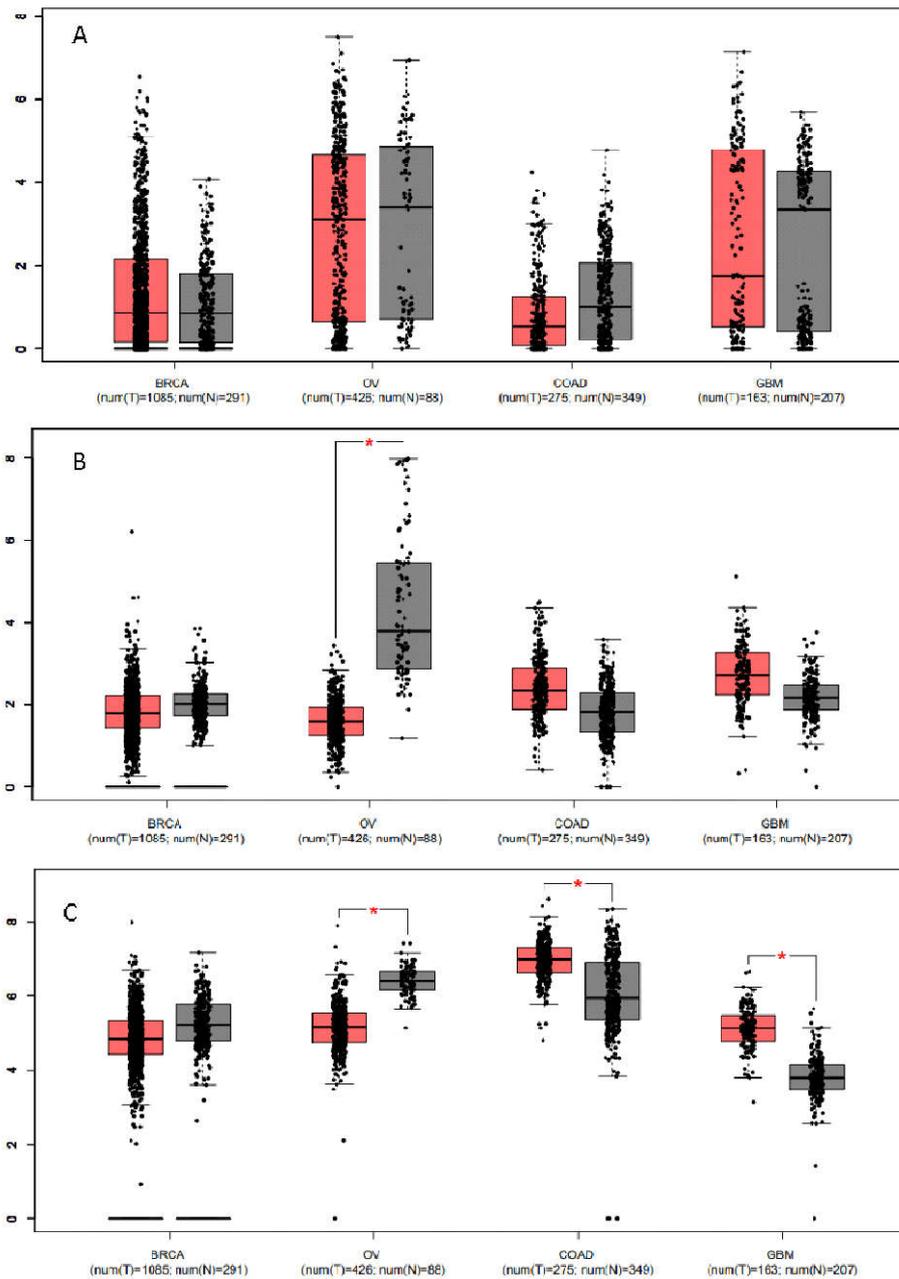


Figura VI.15. Análisis de expresión génica de tejido tumoral (rojo) y no tumoral (gris) de los genes que codifican para A) CBS; B) CSE y C) 3MST. De izquierda a derecha, los tejidos son (entre paréntesis se informa el n de la muestras analizadas para tejido tumoral (T) y no tumoral (N)): BRCA: mama (T= 1085, N= 291); OV: ovario (T= 426, N= 88); COAD: colon (T= 275, N= 349) y GBM: cerebro (glia) (T= 163, N= 207). Los datos y gráficos se obtuvieron de *GEPIA* (<http://gepia.cancer-pku.cn/detail.php>). La estadística es ANOVA de una vía, y corresponde al test ya incluido en *GEPIA*.

En la Figura VI.15 se observa que en los tejidos y enzimas estudiadas, sólo se registran diferencias significativas en la expresión de CSE en ovario, y en la de 3MST en ovario, colon y cerebro. En el caso del ovario, se observa que la transcripción tanto de CSE como de 3MST es menor en el tejido tumoral que en el tejido normal. Para el caso de colon y cerebro, se observa que hay un aumento en la transcripción de la enzima 3MST con respecto al tejido no tumoral. No se observan diferencias significativas en la expresión de ninguna de las tres enzimas analizadas en mama.

En la Figura VI.16 se compara la expresión de las enzimas en otros tejidos, la mayoría de ellos tratados o susceptibles de ser tratados con TFD: BLCA: vejiga; DLBC: linfoma difuso de células B; LAML: leucemia mieloide aguda; LUAD: adenocarcinoma de pulmón; LUSC: carcinoma de células escamosas de pulmón; SKCM: melanoma.

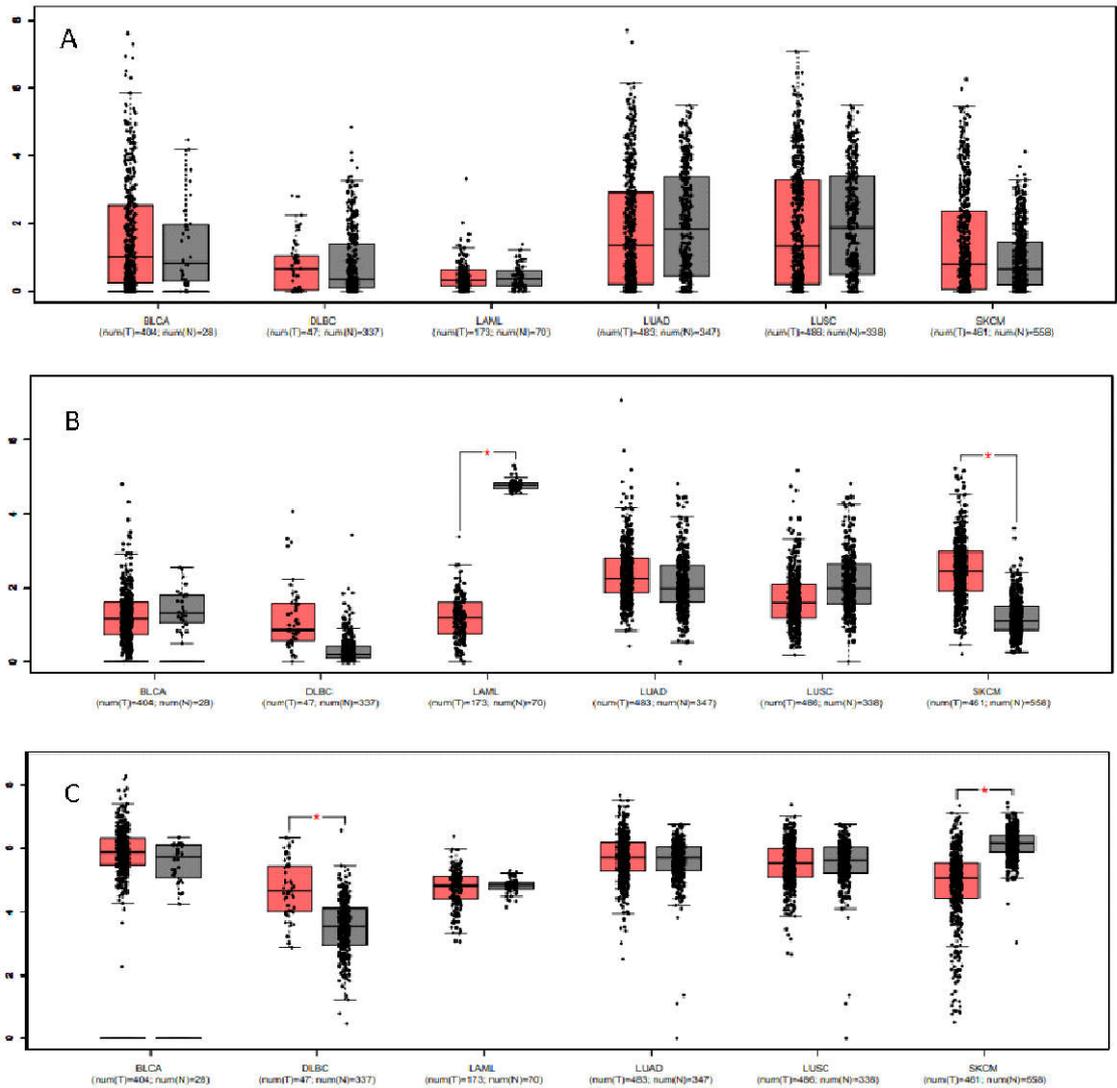


Figura VI.16 Análisis de expresión génica de tejido tumoral (rojo) y no tumoral (gris) de los genes que codifican para A) CBS, B) CSE y C) 3MST. De izquierda a derecha, los tejidos son (entre paréntesis se informa el n de la muestras analizadas para tejido tumoral (T) y no tumoral (N)): BLCA: vejiga (T= 404, N= 28); DLBC: linfoma difuso de células B (T= 47, N= 337); LAML: leucemia mieloide aguda (T= 173, N= 70); LUAD: adenocarcinoma de pulmón (T= 483, N= 347); LUSC: carcinoma de células escamosas de pulmón (T= 486, N= 338); SKCM: melanoma (T= 461, N= 558). Los datos y gráficos se obtuvieron de *GEPIA* (<http://gepia.cancer-pku.cn/detail.php>). La estadística es ANOVA de una vía, y corresponde al test ya incluido en *GEPIA*.

En la Figura VI.16, así como en la anterior, se observa que no necesariamente los genes están sobreexpresados en el tejido tumoral, y que en algunos casos, en el mismo tejido, el gen de una enzima puede estar sobre expresado y el de otra estar sub expresado con respecto al tejido no tumoral, como es el caso de los melanomas, en los cuales hay mayor expresión de CSE, menor de 3MST, y no hay diferencias en la expresión de CBS. Si bien los melanomas no se tratan habitualmente con TFD, porque al tener pigmentación se dificulta la penetración de la luz y por ende la excitación del FS, se los incluyó porque da cuenta de que en otros tumores derivados de la piel, podría haber desregulaciones en la producción de H₂S.

Cómo se mencionó previamente, la síntesis de H₂S no sólo es específica de tejido, sino que distintos tumores del mismo tejido pueden estar produciendo distintas cantidades de H₂S por diferentes motivos. Estos últimos resultados respaldan la importancia de la caracterización bioquímica/genética previa al tratamiento, a fin de poder realizar el tratamiento más adecuado posible.

VI.3. Discusión.

En el presente capítulo se han mostrado efectos del NaHS sobre algunas de las enzimas del camino biosintético del hemo, en modelos de tumores *ex vivo* generados a partir de las líneas celulares LM2 y LM3 en ratones BALB/c.

El NaHS es capaz de inhibir la actividad específica de las enzimas ALA-D y PBG-D, en homogenatos de tumores de ambas líneas celulares, en las condiciones estudiadas.

En el caso de la enzima ALA-D, la inhibición en tumores LM2 y LM3 se produce a la misma concentración de NaHS, 0,1 mM. Sin embargo, el grado de inhibición de las enzimas ALA-D en presencia de NaHS es diferente, siendo mayor en tumores LM2 a esta concentración. A 0,1 mM de NaHS, la actividad en tumores LM2 es del 68% respecto de su control, y en tumores LM3 es del 76 % respecto de su control. Además, comparando las dos líneas entre sí, la actividad específica de ALA-D en tumores LM3 es 3,5 veces mayor en esas condiciones. Al aumentar la concentración de NaHS a 1 mM, la actividad en tumores LM3 disminuye abruptamente al 5 % respecto del control, mientras que a las mismas condiciones, la de tumores LM2 disminuye al 26 % del su control. Sin embargo, esa diferencia no resultó significativa al comparar la actividad enzimática de las dos líneas entre sí.

Para la actividad de la enzima PBG-D en homogenatos de tumores provenientes de ambas líneas celulares, la inhibición se produce a NaHS 10 mM. El porcentaje de actividad enzimática a esa concentración de NaHS es de 36% y 60% del control, para tumores LM2 y LM3, respectivamente. Por otro lado, la actividad específica de la PBG-D de tumores LM3 es 1,6 veces mayor que la de tumores LM2 en condiciones control, y 2,7 veces mayor en presencia de 10 mM de NaHS. Es decir, que el NaHS afecta más a la enzima PBG-D de tumores LM2 que a la de tumores LM3.

Estas diferencias señaladas en los párrafos anteriores, podrían dar lugar a que la actividad remanente en las enzimas de la biosíntesis del hemo de las células LM3 en

presencia de NaHS, sea suficiente como para garantizar que la síntesis de porfirinas mantenga sus niveles totales.

Además, un factor que podría tomarse en cuenta y que podría estar influyendo en esta respuesta diferencial, son los niveles de GSH sintetizado en ambas líneas celulares. Las enzimas PBG-D y, especialmente, ALA-D, son dependientes del GSH para funcionar correctamente (Batlle et al., 1981), y una mayor disponibilidad del tripéptido podría estar propiciando una mayor actividad de las enzimas, aún en presencia de NaHS.

Como se ha mencionado en los capítulos anteriores, las células de la línea LM3 presentan un mayor nivel de GSH intracelular que las células LM2 y el GSH disponible en las células LM3 podría estar manteniendo los tioles de estas enzimas en estado reducido, o podría estar reaccionando con el H₂S, manteniendo así la funcionalidad de las enzimas, y este microambiente podría no estar siendo reflejado en la medición enzimática experimental.

Los resultados de la inhibición de las enzimas en los tumores con NaHS son consistentes con la disminución en la síntesis y acumulación de porfirinas observados para las células en cultivo LM2 en el capítulo IV y las producidas *ex vivo* por los explantes de tumor LM2, descritas en Figura VI.5. En el caso de LM3, a pesar de la inhibición de las enzimas ALA-D y PBG-D en los homogenatos de tumores, no se observa una disminución en la síntesis y acumulación de porfirinas intracelulares luego de la administración de NaHS y ALA en dichas células en cultivo (ver Figura IV.22 y Figura V.6) ni en las sintetizadas *ex vivo* por los explantes de tumores derivados de LM3 (Figura VI.6).

Esta diferencia de resultados observados entre lo que ocurre en los homogenatos de tumores y en las células podría estar indicando la importancia del entorno celular para garantizar la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis del hemo. Las enzimas presentes en los homogenatos tumorales estarían "más desprotegidas" de su microambiente celular. Por lo tanto, podrían ser más susceptibles de reaccionar con el

NaHS que las enzimas en el entorno de la célula "intacta", y esa podría ser una razón para que exista esta diferencia.

También es necesario tener en cuenta la compartimentalización celular de las enzimas. Las tres enzimas afectadas por el NaHS, ALA-D, PBG-D y URO-D son citoplasmáticas y el contenido de ciertas sustancias antioxidantes intracelulares, y también su vida media en el entorno celular, podrían estar modificándose y esto se evidenciaría en las diferencias observadas en dichos resultados.

Además de los anteriores, otros factores involucrados, tales como el porcentaje de suero en el medio de cultivo, podrían estar enmascarando el efecto del NaHS agregado al mismo, por su alto porcentaje en proteínas (alrededor de 4 g/100 mL, Natocor, Córdoba, Argentina).

En conclusión, la inhibición enzimática de ALA-D y PBG-D mediada por NaHS en un homogenato tumoral de LM3, no significa que inequívocamente esto se vea reflejado en una menor síntesis de porfirinas en un modelo de cultivo 2D, sino que indica que el mecanismo de inhibición es posible. Es importante recordar que las enzimas estudiadas son estructuralmente hemo-proteínas, y también son sulfhidríticas, es decir que poseen residuos tioles en su sitio catalítico (Batlle et al., 1981). Como se indicó en la introducción (Introducción, ítem I.2.2.2), tanto las hemo-proteínas como los tioles proteicos, son blancos del H₂S.

Por todos estos motivos, es probable que los resultados del RP-HPLC reflejen en mejor medida lo que sucede en la célula "intacta" en cultivo, que los experimentos en homogenatos de tumores. Por otra parte, se observa una correlación entre los análisis cuantitativos de síntesis de porfirinas, y los análisis cualitativos de los intermediarios porfirínicos a través del RP-HPLC.

Cuantitativamente, el efecto del NaHS sobre las células LM2 es el de reducir la cantidad de porfirinas totales, como se mostró en las determinaciones por espectrofluorimetría y microscopía de fluorescencia (Figuras IV.10 y IV.21). Teniendo

en cuenta el análisis de los intermediarios por RP-HPLC, se observa que las células LM2 presentan mayoritariamente Pp IX, y que en presencia de NaHS 10 mM, no sintetizan cantidades detectables de porfirinas.

Es posible resumir entonces, que en las células LM2, el efecto del NaHS es el de disminuir la síntesis de Pp IX generada a partir de ALA 1 mM.

En las células de la línea LM3, la presencia de NaHS no reduce la cantidad total de porfirinas, como también fue mostrado los capítulos IV y V (Figura IV.22 y Figuras V.6 y V.7).

En el análisis de los intermediarios de la síntesis de hemo por RP-HPLC generados a partir de ALA 1 mM en LM3, son mayoritariamente uroporfirina y Pp IX, y en menor medida heptaporfirina y coproporfirina. El patrón de síntesis de intermediarios que se obtuvo en el presente trabajo, coincide con el reportado previamente por Casas et al. (2006).

Sin embargo, cuando las células LM3 se co-incuban con ALA 1 mM y NaHS 10 mM, se observa una diferencia sustancial en el tipo de intermediarios sintetizados. Desaparece la señal correspondiente a coproporfirina y fundamentalmente el pico de Pp IX, y aumenta considerablemente la proporción de uroporfirina, hexaporfirina y heptaporfirina. Estos tres últimos intermediarios son los que representan prácticamente el total de las porfirinas sintetizadas en estas condiciones, y de esas tres, uroporfirina es la mayoritaria.

Es decir que, según estos resultados combinados, en presencia de NaHS 10 mM, las células LM3 producen porfirinas, pero con un diferente perfil de intermediarios.

Esta reportado que uroporfirina y coproporfirina poseen actividad fotosensibilizante (Casas, 1996; Redmond y Gamlin, 1999), por lo que, a pesar de que en las células LM3 no se sintetice Pp IX bajo estas condiciones, las porfirinas acumuladas podrían ser suficientes para mantener el efecto fotosensibilizante necesario para que la ALA-TFD

sea efectiva y las células se mantengan sensibles a dicha terapia aún en presencia de NaHS 10 mM.

Finalmente, los extractos porfirínicos analizados por RP-HPLC de la línea celular LM3, sugieren que la incubación con NaHS 10 mM produce la inhibición de la enzima URO-D, que es la encargada remover 4 carbonos del uroporfobilinógeno III. Estos carbonos se remueven de a uno a la vez, y por eso existen intermediarios de esta reacción que contienen 7, 6 y 5 grupos carboxilos, y que son la hepta, hexa y pentaporfirina, respectivamente.

Los resultados aquí descritos sugieren que el NaHS sería capaz de inhibir al menos tres de las enzimas del camino biosintético del hemo. Por un lado, a las enzimas ALA-D y PBG-D, sobre las cuales se determinó directamente la actividad específica; y por otro, a la enzima URO-D, a partir de los resultados del análisis de los intermediarios por RP-HPLC en las células LM3. En la línea LM2 prevalecería la inhibición de la primera enzima -ALA-D-, ya que es más sensible a la acción del NaHS que la PBG-D, por lo que no avanza la síntesis a Pp IX, provocando una disminución en la respuesta a la ALA-TFD en presencia de NaHS. En cuanto a la línea LM3, prevalecería el efecto de la inhibición de URO-D, modificando el perfil de intermediarios porfirínicos, los que tendrían suficiente capacidad fotosensibilizante, no modificando la respuesta a la ALA-TFD.

Con respecto al análisis bioinformático, se observó que existe una gran variabilidad en cuanto al *CNV* y la cantidad de transcritos de los genes que codifican para las enzimas productoras de H₂S. Si bien se observa que el *CNV* es altamente variable, éste no se traduce necesariamente en cantidad de transcritos del gen. Por ejemplo, en adenocarcinoma de colon (COAD), se observa que los genes que codifican para las enzimas CBS y CSE se ven mayormente afectados por una disminución del *CNV* (el 4,7 % de los casos de un total de 5,8 % en CBS; y el 4,9 % de un total de 5,5 % en CSE), lo que sugeriría que debería haber una menor cantidad de transcritos. Sin embargo, no se observan diferencias significativas en la cantidad de transcritos de ambos genes. En el caso del gen de 3MST del mismo tejido, se observa que la mayoría de los casos afectados, el número de copias está aumentado (1,3 % de los casos de un total de 2,2

% casos), y efectivamente esto se traduce en un aumento significativo de la cantidad de transcritos del gen.

De forma contraria, se puede observar en sarcomas que el gen de la CSE, cuando está afectado, tiene aumentado el *CNV* (9,2 % de casos de aumento de *CNV* de un total de 11,5 %). Pero esta característica no se traduce en un aumento del número de transcritos del tejido tumoral comparado con el no tumoral, y de hecho, no hay diferencias significativas entre ambos tejidos (datos no mostrados). Como se concluye con estos ejemplos, no se puede trazar una correspondencia directa entre *CNV* y cantidad de transcritos.

Es importante notar que los porcentajes de variación del número de copias (*CNV*) que se presentan en este trabajo en relación a los tumores de mama, ovario, y otros parecen bajos. Sin embargo, de acuerdo a otras publicaciones, las variaciones que se evalúan normalmente corresponden a porcentajes de ese orden (Girirajan et al., 2011; Spasova et al., 2021).

Los *CNV* comprenden regiones grandes del genoma, y pueden afectar a varios genes y/o zonas regulatorias, e incluso afectar la actividad de genes lejanos (Gamazon y Stranger, 2015), por lo que es difícil en esos casos adjudicar el fenotipo patológico al aumento o disminución del número de copias de un gen en particular. A pesar de las limitaciones actuales en la interpretación de los *CNV*, y su impacto en la aparición y desarrollo de una determinada enfermedad, su análisis se posiciona como una potente herramienta en el futuro próximo para estudiar la patogenia de ciertas enfermedades, entre ellas el cáncer.

En relación al número de transcritos, se ha reportado en un conjunto de líneas celulares tumorales y no tumorales de ovario, que 4 de las 6 líneas tumorales expresan más CBS que las líneas no tumorales, las cuales tienen una expresión muy baja de dicha enzima (Bhattacharyya et al., 2013). Sin embargo, *GEPIA* muestra que no hay diferencias significativas en la cantidad de transcritos del gen en este tejido tumoral (n = 426) y no tumoral (n = 88) en la enzima CBS. Los mismos autores (Bhattacharyya et

al., 2013), analizaron la expresión de la enzima en muestras de tejido tumoral de ovario provenientes de 210 pacientes, y encontraron una alta expresión de la enzima CBS, que aumentaba conforme avanzaba el grado tumoral.

En cuanto al tejido tumoral de mama, el principal modelo de estudio en esta tesis, no se observaron diferencias significativas en la cantidad de transcritos de los genes comparados con el tejido no tumoral, a pesar de que está reportado, que los tumores producen mayor cantidad de H₂S por un aumento de la enzima CBS que su contraparte no tumoral (Sen et al., 2015). Sen y colaboradores (2015) utilizaron 60 muestras de tumores de mama, cada una con su contraparte no tumoral.

Esta información permite tener en cuenta que el metabolismo del H₂S puede estar alterado en los tumores debido a distintas causas: aumento o disminución del número de copias del gen; aumento o disminución del número de transcritos; proteínas con mayor o menor actividad (fundamentalmente por modificaciones post transcripcionales), etc. Además hay que tener en cuenta que se ha descrito, en diferentes tipos de tumores, tanto el aumento en la producción de H₂S (Bhattacharyya et al., 2013; Chao et al., 2014; Szabo, 2016) como la disminución del mismo (Hellmich y Szabo, 2015).

En los resultados de *GEPIA*, no se tienen en cuenta las modificaciones post transcripcionales, que pueden cambiar la actividad de una enzima. Y si consideramos que todos los transmisores gaseosos, inclusive el H₂S actúan a nivel genómico o por modificaciones post transcripcionales (como se indicó en Introducción 1.2.2.2), esta base de datos, a pesar de suministrar información muy relevante, no brinda toda la información suficiente para predecir la actividad de las enzimas estudiadas (CBS, CSE y 3MST) tanto en tejido normal como tumoral.

Se observa también que los datos de los tejidos analizados muestran una altísima dispersión, con lo cual se dificulta conseguir resultados que sean estadísticamente robustos. En un trabajo reciente, Dennis y colaboradores (2022) analizaron 86.788 casos de cáncer de mama y 76.122 casos controles de ancestría europea, y

concluyeron que se requieren tamaños de muestra más grandes para alcanzar niveles sólidos de significación estadística. Esto sugiere que, si bien estos análisis son importantes y seguramente lo sean más a futuro, actualmente permiten obtener un panorama parcial de la situación, y nos invitan a pensar posibles asociaciones entre la variabilidad genética y la aparición y desarrollo de algunas enfermedades, y posibles caminos nuevos para investigarlas.

Por todo lo anteriormente mencionado, se vuelve primordial poder caracterizar el tumor individual que se va a tratar, conociendo que habrá características que lo asemejen a los tumores del mismo origen, pero otras en las que existe mucha variabilidad, como en el caso de la producción de H_2S , en los que si un tumor sintetiza muy baja o muy alta cantidad, podría mostrar una respuesta totalmente diferente a la TFD.

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, queda por recorrer un largo camino para poder mejorar el efecto de la TFD considerando las características particulares de cada tumor. Sin embargo, es importante destacar que esta tesis aporta conocimientos inéditos con respecto a los efectos que produce el H_2S sobre los tratamientos antitumorales, en particular la ALA-TFD.

VII. Discusión general.

A lo largo de este trabajo se ha estudiado mayoritariamente la influencia del dador inorgánico de H₂S, el NaHS, en cultivos celulares tratados con ALA-TFD.

El agregado de NaHS desencadena una serie de efectos relacionados con la defensa celular en la línea celular LM2. Entre estos efectos, en el presente trabajo se estudió el aumento de los niveles intracelulares de GSH. Como se describió en la introducción, el GSH es muy importante en las células, ya que participa de diferentes maneras en el mantenimiento del equilibrio redox: reaccionando directamente con agentes oxidantes, conjugándose con compuestos foráneos para facilitar su eliminación, siendo cofactor de enzimas detoxificantes como las peroxidases, y participando del mantenimiento de los residuos sulfhidrúlicos de las proteínas.

El NaHS también tiene el efecto de reducir la cantidad de EROs luego de la ALA-TFD, y en parte probablemente debido al aumento del GSH, pero también reaccionando directamente con EROs que son agentes oxidantes muy potentes, como se comprobó para los ensayos de capacidad oxidante total y para la generación del ¹O₂ *in vitro*.

Por otro lado, la síntesis de porfirinas, que actúan como FS durante la ALA-TFD, también se ve afectada por la presencia de NaHS. Esto redundaría en un menor número de moléculas FS, y en consecuencia en una menor generación de EROs.

Estos factores, entre otros que se esperan dilucidar en el futuro con la continuidad de esta tesis, podrían estar actuando para que la ALA-TFD sea menos efectiva.

Si bien los mismos efectos fueron observados en diferentes líneas celulares, en la línea celular LM3, no se comprobaron. En esta línea, el NaHS aumenta los niveles de GSH. Sin embargo, no se observó un descenso en la cantidad de porfirinas producidas, ni en las EROs generadas post ALA-TFD, ni la protección frente a la ALA-TFD.

Las líneas LM2 y LM3 presentan diferencias en sus niveles de GSH, y también en los niveles sintetizados de H₂S, siendo LM3 la que presenta mayores valores de ambos compuestos. En el caso de GSH, LM3 posee alrededor del 70 % más de este compuesto en comparación con LM2 en condiciones basales, y 140 % más cuando se incuban las células con NaHS 10 mM.

En cuanto al H₂S, LM3 produce 117 % más que LM2 en condiciones basales, y 46 % más cuando se agrega el sustrato L-cisteína.

Al analizar los perfiles de síntesis de porfirinas de las líneas LM2 y LM3, se observó que la línea LM2 reduce sus niveles de porfirinas cuando se la incubaba con NaHS y ALA. Sin embargo, la línea LM3 produce porfirinas cuando es incubada con los mismos compuestos, aunque no sintetiza los mismos intermediarios. Es decir, el perfil de síntesis se ve modificado. Como se citó anteriormente, los diferentes intermediarios de la síntesis del hemo, además de la Pp IX, tienen diferentes capacidades como FSs. Es probable que las porfirinas producidas por LM3 en presencia de NaHS, también tengan los niveles y la capacidad fotosensibilizante necesaria para mantener la efectividad de la ALA-TFD.

Las enzimas del camino biosintético del hemo ALA-D y PBG-D se ven inhibidas en su actividad por el NaHS, independientemente de si provienen de células de LM2 o de LM3, como se estudió a partir de modelos *ex vivo*. Además, el análisis de las porfirinas realizados por RP-HPLC sugiere que, al menos en LM3, la enzima URO-D también estaría inhibida por el NaHS. Es probable que tanto las condiciones intracelulares, como la disponibilidad de GSH para mantener los residuos sulfhidrúlicos reducidos de las proteínas, y la distribución y disponibilidad del H₂S en el interior de las células, sean determinantes para que dicha biosíntesis esté funcional o no. Los resultados antes presentados sugieren que la línea LM2 prevalecería la inhibición de ALA-D, mientras que en LM3 sería más importante la inhibición de la enzima URO-D.

Estos resultados llevan a pensar que la presencia de H₂S en el tejido tratado con ALA-TFD podría ser importante para el resultado de la misma, ya que podría disminuir su

efectividad. Dado que esta descrito que la síntesis de H₂S es tejido dependiente, esto podría ser más significativo en algunos órganos que en otros. No obstante, los resultados presentados indican que se pueden observar diferencias dentro de tumores que sean del mismo tipo, como se observó con las dos líneas de adenocarcinoma mamario murino, LM2 y LM3.

Por otro lado, existen situaciones fisiopatológicas que pueden desregular la síntesis endógena de H₂S, aumentando o disminuyendo su producción. Este es el caso de algunos tumores, como de ovario y colon, en los que se ha mostrado que el tejido tumoral produce mayor cantidad de H₂S que el no tumoral del mismo origen (Bhattacharyya et al., 2013; Szabo et al., 2013; Hellmich y Szabo, 2015; Hellmich et al., 2015). Se ha reportado también que algunos tumores como los gliomas poseen una sub producción de H₂S en comparación el mismo tejido no tumoral (Zhu et al., 2018), lo cual indica que cualquier desregulación en la síntesis de H₂S podría estar asociada al mantenimiento o progresión tumoral.

A través de los análisis de las bases de datos génicas de *TCGA* y *GTEX*, se ha corroborado que existe variabilidad tanto en el número de copias de los genes que codifican para las enzimas CBS, CSE y 3MST, como a su actividad transcripcional. Por la gran dispersión que muestran los datos, no se pudo encontrar un patrón de correlación entre dichos parámetros en tejido tumoral y no tumoral. Los resultados de los análisis bioinformáticos no se correlacionan con los reportes acerca de la producción de H₂S en ciertos tumores. Esto puede ocurrir porque no necesariamente la cantidad de transcritos de un gen se convierten en enzimas totalmente funcionales, fundamentalmente por no tener en cuenta más modificaciones postraduccionales que pueden sufrir las proteínas, pero también debido a "problemas técnicos" relacionados con la determinación de los niveles de H₂S *in vivo*, o por sesgos muestrales (debidos a la alta dispersión que muestran los datos).

Esto remarca la dificultad que implica el estudio de los efectos de los transmisores gaseosos en general, y del H₂S en particular. Como se mencionó, su naturaleza

química, sus mecanismos de acción, su efecto pleiotrópico y sus múltiples posibles interacciones, hacen muy difícil la tarea de diseñar experimentos controlados.

Por un lado, esto dificulta la posibilidad de predecir el comportamiento tumoral en función de la producción de H₂S; y deja ver la importancia que tiene la caracterización de los tumores individuales a la hora de aplicar el tratamiento más adecuado. Por otro lado, posiciona a las enzimas que sintetizan H₂S como posibles blancos de tratamientos antitumorales, solas o en tratamientos combinados con otros compuestos, tanto para aumentar como para disminuir su producción. Esto se podría lograr a través del desarrollo y uso de inhibidores específicos para dichas enzimas, o con la utilización de ARN de interferencia (siRNA), que impidan la síntesis de las enzimas que producen el H₂S, en el caso de la inhibición; y a través el uso de activadores enzimáticos, aumento de L-cisteína intracelular, o ingeniería genética en el caso del aumento de la producción de H₂S.

VIII. Conclusiones.

La administración de sulfuro de hidrógeno, como NaHS, tendría un efecto protector sobre la respuesta a la ALA-TFD, en la mayoría de las líneas celulares evaluadas.

Cuando ocurre, este efecto estaría dado por una contribución de múltiples factores, como aumento de GSH, disminución de la síntesis de porfirinas, disminución de EROs.

Es importante profundizar los estudios en la línea LM3 de adenocarcinoma mamario murino, ya que dicha línea celular presentó un comportamiento totalmente diferente frente al NaHS comparado con el resto de las líneas celulares estudiadas. Fundamentalmente para seguir conociendo los efectos del H₂S en las células, y los agentes o contextos celulares que puedan modular su acción. Ambas líneas celulares, LM2 y LM3, provienen de tumores espontáneos de mama en ratones BALB/c, y sin embargo, su comportamiento frente al agregado de NaHS y ALA-TFD es muy diferente, como se ha visto a lo largo de este trabajo. Esto ratifica la importancia de poder caracterizar al tumor que se quiere tratar, a fin de mejorar la eficiencia de la TFD.

Además, sabiendo que algunos órganos producen altas cantidades de H₂S, estos resultados son importantes, ya que dicha característica podría derivar en que respondan de manera diferente a la TFD.

La alta variabilidad de los datos proporcionados en los análisis bioinformáticos del CNV y cantidad de transcritos de las enzimas CBS, CSE y 3MST, ratifican la importancia de conocer lo mejor posible cada tumor, a la hora de seleccionar el tratamiento más adecuado.

Por otro lado, estos resultados ayudarían a generar estrategias que mejoren la eficacia de la TFD, por ejemplo disminuyendo los niveles endógenos de H₂S con inhibidores no tóxicos y más selectivos de las enzimas que están involucradas en la síntesis endógena del H₂S, o impidiendo la expresión de las mismas utilizando siRNA.

De igual modo, estos resultados podrían ser relevantes para otros tipos de terapias que involucren EROs, como por ejemplo doxorubicina. La doxorubicina es una poderosa droga antitumoral que entre otros efectos, aumenta la producción de EROs (Pilco-Ferreto y Calaf, 2016), y es uno de los agentes más utilizados para el tratamiento del cáncer de mama.

Es de destacar que los resultados obtenidos en esta tesis sobre el estudio del efecto en la TFD del compuesto exógeno o endógeno, H_2S , conlleva a conclusiones que pueden ser tenidas en cuenta inmediatamente en el uso clínico de la terapia y podría elucidar la razón de respuestas diferenciales del tratamiento fotodinámico de un mismo tipo de cáncer, incluso explicar posibles resistencias o respuestas menores a las esperadas, permitiendo también generar pronósticos de respuesta a la TFD.

IX. Resumen gráfico de resultados.

Se presenta a continuación, en la Figura IX.1, el resumen gráfico de los resultados de esta Tesis.

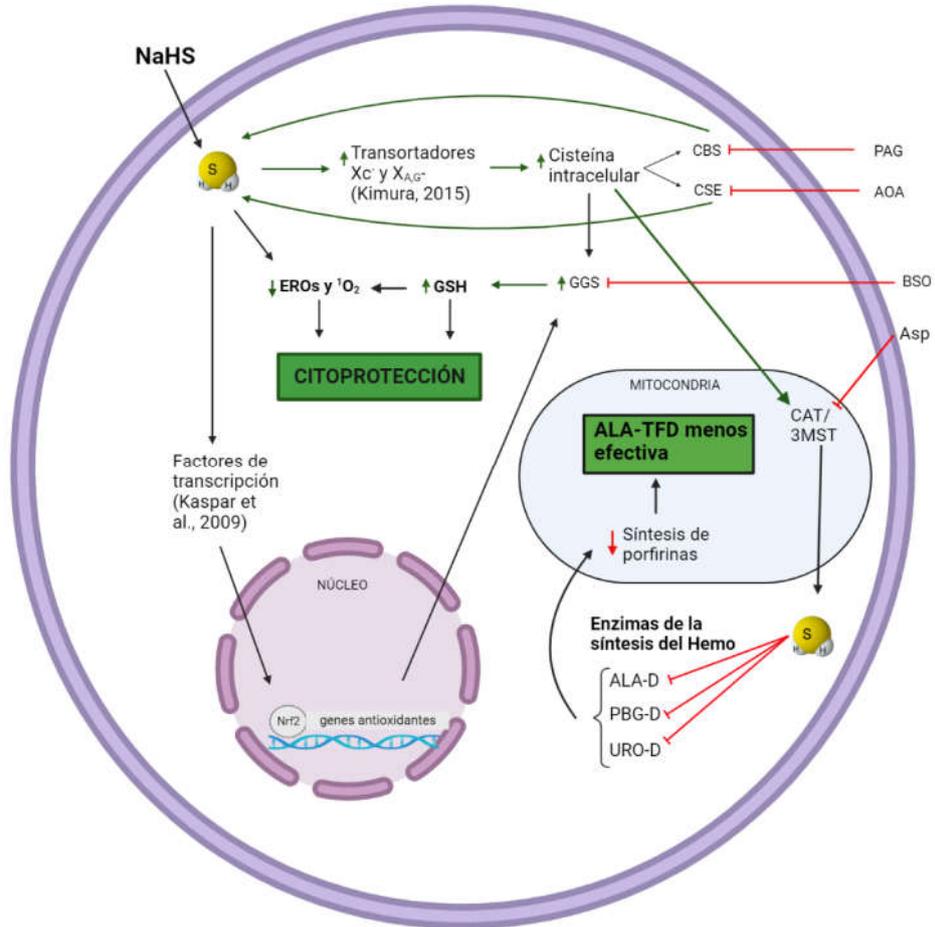


Figura IX.1. Resumen gráfico de resultados. Cuando el NaHS libera H₂S e ingresa a la célula, promueve la transcripción de la enzima γ -glutamilcisteína sintetasa y aumenta la cisteína intracelular, lo que aumenta la síntesis de GSH. El aumento de cisteína sirve como sustrato a las enzimas CBS, CSE y CAT/3MST, que generan a su vez H₂S. El GSH y el H₂S intracelulares hacen que disminuyan las EROs y el ¹O₂, lo que protege a las células frente al daño oxidativo, junto al GSH. Por otro lado, el H₂S inhibe las enzimas ALA-D, PBG-D y URO-D de la vía de biosíntesis del Hemo, lo que resulta en una menor síntesis de porfirinas a partir de ALA, y esto redundando en una ALA-TFD menos efectiva. Los resultados corresponden a los encontrados en todas las líneas celulares con excepción de LM3. Abreviaturas: NaHS: sulfuro ácido de sodio; H₂S: sulfuro de hidrógeno; EROs: especies reactivas de oxígeno; ¹O₂: oxígeno singlete; GSH; glutatión reducido; GGS: γ -glutamilcisteína sintetasa; CBS: cistationina β -sintasa; CSE: cistationina γ -liala; CAT/3MST: cisteína aminotransferasa/3-mercaptopiruvato sulfotransferasa; ALA-D: ácido 5-aminolevulínico deshidratasa; PBG-D: porfobilinógeno deaminasa; URO-D uroporfirinógeno III decarboxilasa; AOA: ácido amonooxoacético; PAG: propargilglicina; Asp: L-aspartico; BSO: DL-Butionina-[S, R]- sulfoximina, nrf2: Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2.

X. Referencias.

Abrahamse, H. and Hamblin, M. R. (2016). New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal*, 473(4), 347–364.

Ackroyd, R., Kelty, C., Brown, N. and Reed, M. (2001). The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 74(5), 656–669.

Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), disposición 1057-17, del 5 de enero de 2017.

http://www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/enero_2017/Dispo_1057-17.pdf

Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., Hahn S., Hamblin M., Juzeniene A., Kessel D. Korbek M., Moan J., Mroz P., Nowis D., Piette J., Wilson B. and Golab J. (2011). Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(4), 250–281.

Akimoto, J., Fukami, S., Ichikawa, M., Mohamed, A. and Kohno, M. (2019). Intraoperative photodiagnosis for malignant glioma using photosensitizer talaporfin sodium. *Frontiers in Surgery*, 6, 12.

Ali, R., Pal, H. A., Hameed, R., Nazir, A. and Verma, S. (2019). Controlled release of hydrogen sulfide significantly reduces ROS stress and increases dopamine levels in transgenic *C. elegans*. *Chemical Communications*, 55(68), 10142–10145.

Allain, J-P., Owusu-Ofori, A. K., Assennato, S. M., Marschner, S., Goodrich, R. P. and Owusu-Ofori, S. (2016). Effect of Plasmodium inactivation in whole blood on the incidence of blood transfusion-transmitted malaria in endemic regions: the African Investigation of the Mirasol System (AIMS) randomised controlled trial. *The Lancet*, 387(10029), 1753–1761.

Allegra, A., Pioggia, G., Tonacci, A., Musolino, C. and Gangemi, S. (2020). Oxidative Stress and Photodynamic Therapy of Skin Cancers: Mechanisms, Challenges and Promising Developments. *Antioxidants*, 9(5): 448.

Almeida, A., Cunha, Â., Gomes, N., Alves, E., Costa, L. and Faustino, M. A. F. (2009). Phage therapy and photodynamic therapy: low environmental impact approaches to inactivate microorganisms in fish farming plants. *Marine Drugs*, 7(3), 268–313.

Amoore, J. E. and Hautala, E. (1983). Odor as an aid to chemical safety: odor thresholds compared with threshold limit values and volatilities for 214 industrial chemicals in air and water dilution. *Journal of Applied Toxicology*, 3(6), 272–290.

Amos-Tautua, B. M., Songca, S. P. and Oluwafemi, O. S. (2019). Application of porphyrins in antibacterial photodynamic therapy. *Molecules*, 24(13), 2456.

Astort, F., Mercau, M., Giordanino, E., Degese, M. S., Caldarelli, L., Coso, O. and Cymeryng, C. B. (2014). Nitric oxide sets off an antioxidant response in adrenal cells: involvement of sGC and Nrf2 in HO-1 induction. *Nitric Oxide*, 15;37: 1-10.

- Athar, M., Elmetts, C. A., Bickers, D. R. and Mukhtar, H. (1989). A novel mechanism for the generation of superoxide anions in hematoporphyrin derivative-mediated cutaneous photosensitization. Activation of the xanthine oxidase pathway. *The Journal of Clinical Investigation*, 83(4), 1137–1143.
- Ballatori, N., Krance, S. M., Notenboom, S., Shi, S., Tieu, K. and Hammond, C. L. (2009). Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biological Chemistry*, 390(3), 191-214.
- Bartolomeu, M., Reis, S., Fontes, M., Neves, M. G. P. M. S., Faustino, M. A. F. and Almeida, A. (2017). Photodynamic action against wastewater microorganisms and chemical pollutants: an effective approach with low environmental impact. *Water*, 9(9), 630.
- Baskar, R. and Bian, J. (2011). Hydrogen sulfide gas has cell growth regulatory role. *European Journal of Pharmacology*, 656(1–3), 5–9.
- Baskaran, R., Lee, J. and Yang, S.-G. (2018). Clinical development of photodynamic agents and therapeutic applications. *Biomaterials Research*, 22(1), 1–8.
- Bates, M. N., Garrett, N. and Shoemack, P. (2002). Investigation of health effects of hydrogen sulfide from a geothermal source. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 57(5), 405–411.
- Battle, A. M. C. (1993). Porphyrins, porphyrias, cancer and photodynamic therapy—a model for carcinogenesis. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 20(1), 5–22.
- Battle, A. M. C., Llambias, E. B. C., de Xlfra, E. W. and Tigier, H. A. (1975). Porphyrin biosynthesis in the soybean callus tissue system—XV. The effect of growth conditions. *International Journal of Biochemistry*, 6(8), 591-606.
- Battle, A. M., Magnin, P. H. and Wider, E. A. (1981). Porfirinas y porfirias: etiopatogenia, clinica y tratamiento. Ed. Universidad de Buenos Aires.
- Baugh, C. L. and Clark, J. B. (1959). Photodynamic response in bacteria. *The Journal of General Physiology*, 42(5), 917–922.
- Beauchamp, R. O., Bus, J. S., Popp, J. A., Boreiko, C. J., Andjelkovich, D. A. and Leber, P. (1984). A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 13(1), 25–97.
- Benavides, G. A., Squadrito, G. L., Mills, R. W., Patel, H. D., Isbell, T. S., Patel, R. P., Darley-Usmar, V. M., Doeller, J. E. and Kraus, D. W. (2007). Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(46), 17977–17982.

Bhattacharyya, S., Saha, S., Giri, K., Lanza, I. R., Nair, K. S., Jennings, N. B., Rodriguez-Aguayo, C., Lopez-Berestein, G., Basel, E., Weaver, A.M., Visscher, D. W., Cliby, W., Sood, A.K., Bhattacharyya, R. and Mukherjee, P. (2013). Cystathionine beta-synthase (CBS) contributes to advanced ovarian cancer progression and drug resistance. *PLoS One*, 8(11), e79167. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079167>.

Blackstone, E., Morrison, M. and Roth, M. B. (2005). H₂S induces a suspended animation-like state in mice. *Science*, 308(5721), 518.

Blackstone, E. and Roth, M. B. (2007). Suspended animation-like state protects mice from lethal hypoxia. *Shock*, 27(4), 370-372.

Bos, E. M., Snijder, P. M., Jekel, H., Weij, M., Leemans, J. C., van Dijk, M. C. F., Hillebrands, J-L., Lisman, T., van Goor, H. and Leuvenink, H. G. D. (2012). Beneficial effects of gaseous hydrogen sulfide in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Transplant International*, 25(8), 897–908.

Bos, E. M., Wang, R., Snijder, P. M., Boersema, M., Damman, J., Fu, M., Moser, J., Hillebrands, J-L., Ploeg, R.J., Yang, G., Leuvenink H. G. D. and van Goor, H. (2013). Cystathionine γ -Lyase Protects against Renal Ischemia / Reperfusion by Modulating Oxidative Stress. *Journal of the American Society of Nephrology*, 24(5): 759–770.

Britten, R. A., Warenus, H. M., White, R. and Peacock, J. (1992). BSO-induced reduction of glutathione levels increases the cellular radiosensitivity of drug-resistant human tumor cells. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 22(4), 769-772.

Calvert, J. W., Jha, S., Gundewar, S., Elrod, J. W., Ramachandran, A., Pattillo, C., Kevil C.G and Lefer, D. J. (2009). Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling. *Circulation Research*, 105(4), 365–374.

Calvo, G., Sáenz, D., Simian, M., Sampayo, R., Mamone, L., Vallecorsa, P., Batlle, A. M. C., Casas, A. and Di Venosa, G. (2017). Reversal of the Migratory and Invasive Phenotype of Ras-Transfected Mammary Cells by Photodynamic Therapy Treatment. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(3), 464-477.

Cancelas, J. A., Rugg, N., Fletcher, D., Pratt, P. G., Worsham, D. N., Dunn, S. K., Marschner S., Reddy H.L. and Goodrich R.P. (2011). In vivo viability of stored red blood cells derived from riboflavin plus ultraviolet light-treated whole blood. *Transfusion*, 51(7), 1460–1468.

Carballal, S., Trujillo, M., Cuevasanta, E., Bartsaghi, S., Möller, M. N., Folkes, L. K., García-Bereguiaín, M.A., Gutiérrez-Merino, C., Wardman, P., Denicola, A., Radi, R. and Alvarez, B. (2011). Reactivity of hydrogen sulfide with peroxynitrite and other oxidants of biological interest. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(1), 196–205.

Casas, A. G. Metabolismo del hemo y neoplasias. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (1996).

Casas, A. (2020). Clinical uses of 5-aminolaevulinic acid in photodynamic treatment and photodetection of cancer: A review. *Cancer letters*, 490, 165–173.

Casas, A., Fukuda, H., Riley, P. and Batlle, A. M. del C. (1997) Enhancement of aminolevulinic acid based photodynamic therapy by adriamycin. *Cancer Letters*. 121(1),105-113.

Casas, A., Fukuda, H., Di Venosa, G. and Batlle, A. (2001). Photosensitization and mechanism of cytotoxicity induced by the use of ALA derivatives in photodynamic therapy. *British Journal of Cancer*, 85(2), 279–284.

Casas, A. and Batlle, A. (2006). Aminolevulinic acid derivatives and liposome delivery as strategies for improving 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. *Current Medicinal Chemistry*, 13(10), 1157–1168.

Casas, A., Sanz-Rodriguez, F., Di Venosa, G., Rodriguez, L., Mamone, L., Blázquez, A., Jaén, P., Batlle, A. M. C., Stockert, J. C. and Juarranz, A. (2008). Disorganisation of cytoskeleton in cells resistant to photodynamic treatment with decreased metastatic phenotype. *Cancer letters*, 270(1), 56-65.

Casas, A., Di Venosa, G., Hasan, T. and Batlle, A. (2011). Mechanisms of resistance to photodynamic therapy. *Current Medicinal Chemistry*, 18(16), 2486–2515.

Céspedes, M. A., Saénz, D. A., Calvo, G. H., Gonzalez, M., MacRobert, A. J., Battah, S., Casas, A.G. and Di Venosa, G. M. (2021). Apoptotic cell death induced by dendritic derivatives of aminolevulinic acid in endothelial and foam cells co-cultures. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 20(4), 489–499.

Chao, C., Bohannon, F. J., Mrazek, A., Coletta, C., Szabo, C. and Hellmich, M. R. (2014). P19 Cystathionine- β -synthetase inhibition in combination with standard-chemotherapy decreases colorectal cancer metastasis to the liver. *Nitric Oxide*, 39, S21–S22.

Chiarante, N. A. Propiedades antitumorales in vitro e in vivo de una ftalocianina de zinc (II) lipofílica para uso en terapia fotodinámica. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires (2019).

Cieplik, F., Deng, D., Crielaard, W., Buchalla, W., Hellwig, E., Al-Ahmad, A. and Maisch, T. (2018). Antimicrobial photodynamic therapy—what we know and what we don't. *Critical Reviews in Microbiology*, 44(5), 571–589.

Cirino, G., Vellecco, V. and Bucci, M. (2017). Nitric oxide and hydrogen sulfide: the gasotransmitter paradigm of the vascular system. *British Journal of Pharmacology*, 174(22), 4021–4031.

Comini, L. R., Vieyra, F. E. M., Mignone, R. A., Páez, P. L., Mugas, M. L., Konigheim, B. S., Cabrera, J.L., Núñez Montoya S.C. and Borsarelli, C.D. (2017). Parietin: an efficient photo-screening pigment in vivo with good photosensitizing and photodynamic antibacterial effects in vitro. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 16(2), 201–210.

Coppellotti, O., Fabris, C., Soncin, M., Magaraggia, M., Camerin, M., Jori, G. and Guidolin, L. (2012). Porphyrin photosensitised processes in the prevention and treatment of water-and vector-borne diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 19(6), 808–819.

Daneshmand, S., Schuckman, A. K., Bochner, B. H., Cookson, M. S., Downs, T. M., Gomella, L. G., Grossman, H. B., Kamat, A. M., Konety, B.R., Lee C. T., Pohar, K.S., Pruthi, R.S., Resnick, M. J., Smith, N. D., Witjes, J. A., Schoenberg, M. P. and Steinberg, G. D.(2014). Hexaminolevulinate blue-light cystoscopy in non-muscle-invasive bladder cancer: review of the clinical evidence and consensus statement on appropriate use in the USA. *Nature Reviews. Urology*, 11(10), 589-596.

Davel, L. E., Rimmaudo, L., Español, A., de la Torre, E., Jasnis, M. A., Ribeiro, M. L., Gotoh, T., de Lustig, E. S. and Sales, M. E. (2004). Different mechanisms lead to the angiogenic process induced by three adenocarcinoma cell lines. *Angiogenesis*, 7(1), 45-51.

Deng, J., Lei, C., Chen, Y., Fang, Z., Yang, Q., Zhang, H Cai, M., Shi, L. Dong, H. and Xiong, L. (2014). Neuroprotective gases—fantasy or reality for clinical use? *Progress in Neurobiology*, 115, 210–245.

Denizot, F. and Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*. 89(2): 271-277.

Dennis, J., Tyrer, J. P., Walker, L. C., Michailidou, K., Dorling, L., Bolla, M. K., Wang, Q., Ahearn, T. U., Andrulis, I. L., Anton-Culver, H., Antonenkova, N. N., Arndt, V., Aronson, K. J., Beane Freeman, L. E., Beckmann, M. W., Behrens, S., Benitez, J., Bermisheva, M., Bogdanova, N.V., Bojesen, S. E., Brenner, H., Castela, J. E., Chang-Claude, J., Chenevix-Trench, G., Clarke, C. L., NBCS Collaborators, Collée, J.M., CTS Consortium, Couch, F. J., Cox, A., Cross, S. S., Czene, K., Devilee, P., Dörk, T., Dossus, L., Eliassen, A. H., Eriksson, M., Evans, D. H., Fasching, P. A., Figueroa, J., Fletcher, O., Flyger, H., Fritschi, L. Gabrielson, M., Gago-Dominguez, M., García-Closas, M., Giles, G. G., González-Neira, A., Guénel, P., Hahnen, E., Haiman, C. A., Hall, O., Hollestelle, A., Hoppe, R., Hopper, J. L., Howell, A., ABCTB Investigators, kConFab/AOCS Investigators, Jager, A., Jakubowska, A., John, E. M., Johnson, N., Jones, M. E., Jung, A., Kaaks, R., Keeman, R., Khusnutdinova, E., Kitahara, C. M., Ko, Y., Kosma, V., Koutros, S., Kraft, P., Kristensen, V. N., Kubelka-Sabit, K., Kurian, A. W., Lacey, J. V., Lambrechts, D., Larson, N. L., Linet, M., Ogrodniczak, A., Mannermaa, A., Manoukian, S., Margolin, S., Mavroudis, D., Milne, R. L., Muranen, T. A., Murphy, R. A., Nevanlinna, H., Olson, J. E., Olsson, H., Park-Simon, T., Perou, C. M., Peterlongo, P., Plaseska-Karanfilska, D., Pylkäs, K., Rennert, G., Saloustros, E., Sandler, D. P., Sawyer, E. J., Schmidt, M. K., Schmutzler, R. K., Shibli, R., Smeets, A., Soucy, P., Southey, M. C., Swerdlow, A. J., Tamimi, R. M., Taylor, J. A., Teras, L. R., Terry, M. B., Tomlinson, I., Troester, M. A., Truong, T., Vachon, C. M., Wendt, C., Winqvist, R., Wolk, A., Yang, X. R., Zheng, W., Ziogas, A., Simard, J., Dunning, A. M., Pharoah, P. D. P., and Easton, D. F. (2022). Rare germline copy number variants (CNVs) and breast cancer risk. *Communications Biology*, 5(1), 1-15.

di Masi, A. and Ascenzi, P. (2013). H₂S: a “double face” molecule in health and disease. *Biofactors*, 39(2), 186–196.

Di Venosa, G., Perotti, C., Fukuda, H., Batlle, A. M. C. and Casas, A. (2005). Sensitivity to ALA-PDT of cell lines with different nitric oxide production and resistance to NO cytotoxicity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 80(3), 195-202.

Di Venosa, G., Rodriguez, L., Mamone, L., Gándara, L., Rossetti, M. V., Batlle, A. M. C. and Casas, A. (2012). Changes in actin and E-cadherin expression induced by 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy in normal and Ras-transfected human mammary cell lines. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 106, 47-52.

Dickinson, B. C., & Chang, C. J. (2011). Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nature Chemical Biology*, 7(8), 504-511.

Dirkes, M. C., Milstein, D. M. J., Heger, M. and van Gulik, T. M. (2015). Absence of hydrogen sulfide-induced hypometabolism in pigs: a mechanistic explanation in relation to small nonhibernating mammals. *European Surgical Research*, 54(3–4), 178–191.

Dirschka, T., Radny, P., Dominicus, R., Mensing, H., Brüning, H., Jenne, L., Karl, M., Sebastian, C., Oster-Schmidt, W., Klövekorn, U., Reinhold, M., Tanner, D., Gröne, M., Deichmann, M., Simon, F., Hübinger, G., Hofbauer, G., Krähn-Senftleben, F., Borrosch, K., Reich, C., Berking, P., Wolf, P., Lehmann, M., Moers-Carpi, H., Hönigsmann, K., Wernicke-Panten, C., Helwig, M., Foguet, B., Schmitz, H., Lübbert, R., Szeimies M. and The AK-CT002 Study Group. (2012). Photodynamic therapy with BF-200 ALA for the treatment of actinic keratosis: results of a multicentre, randomized, observer-blind phase III study in comparison with a registered methyl-5-aminolaevulinate cream and placebo. *British Journal of Dermatology*, 166(1), 137–146.

Dong, Y., Liu, D., Hu, Y. and Ma, X. (2015). NaHS protects cochlear hair cells from gentamicin-induced ototoxicity by inhibiting the mitochondrial apoptosis pathway. *PLoS One*, 10(8), e0136051.

Dougherty, T. J. (1984). Photodynamic therapy (PDT) of malignant tumors. *Critical Reviews in Oncology/hematology*, 2(2), 83–116.

Du, J-T., Wei, L. I., Yang, J-Y., Tang, C-s., Qi, L. I. and Jin, H-f. (2013). Hydrogen sulfide is endogenously generated in rat skeletal muscle and exerts a protective effect against oxidative stress. *Chinese Medical Journal*, 126(5), 930–936.

Duska, L. R., Wimberly, J., Deutsch, T. F., Ortel, B., Haas, J., Houck, K. and Hasan, T. (2002). Detection of female lower genital tract dysplasia using orally administered 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX: a preliminary study. *Gynecologic Oncology*, 85(1), 125–128.

- Eijan, A. M., Davel, L. E., Rueda, H. A., Rozenberg, de Lustig, E. S., and Jasnis, M. A. (1998). Differential nitric oxide release and sensitivity to injury in different murine mammary tumor cell lines. *International Journal of Molecular Medicine*, 2(5), 625-630.
- Elrod, J. W., Calvert, J. W., Morrison, J., Doeller, J. E., Kraus, D. W., Tao, L., Jiao, X., Scalia, R., Kiss, L., Szabo, C., Kimura, H., Chow, C-W. and Lefer, D.J.. (2007). Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(39), 15560–15565.
- Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*, 38(12), 1103-1111.
- Esechie, A., Kiss, L., Olah, G., Horváth, E. M., Hawkins, H., Szabo, C. and Traber, D. L. (2008). Protective effect of hydrogen sulfide in a murine model of acute lung injury induced by combined burn and smoke inhalation. *Clinical Science*, 115(3), 91-97.
- Español, A., Eijan, A. M., Mazzoni, E., Davel, L., Jasnis, M. A., de Lustig, E.S. and Sales, M. E. (2002). Nitric oxide synthase, arginase and cyclooxygenase are involved in muscarinic receptor activation in different murine mammary adenocarcinoma cell lines. *International Journal of Molecular Medicine*, 9(6), 651-657.
- Evans P., Whiteman M., Tredger M. and Halliwell, B. (1997). Antioxidant properties of Sadenosyl-L-methionine: a proposed addition to organ storage fluids, *Free Radicals Biological and Medicine*, 23(7),1002-1008.
- Fahey, J. M. and Girotti, A. W. (2019). Nitric oxide antagonism to anti-glioblastoma photodynamic therapy: Mitigation by inhibitors of nitric oxide generation. *Cancers (Basel)*, 11(2), 231.
- Feng, A., Ling, C., Xin-duo, L., Bing, W., San-wu, W., Yu, Z., Yu-lan, H. and You-en, Z. (2018). Hydrogen sulfide protects human cardiac fibroblasts against H₂O₂-induced injury through regulating autophagy-related proteins. *Cell Transplantation*, 27(8), 1222–1234.
- Ferguson, D., Perry, A., Wood, M. E., Winyard, P. G. and Whiteman, M. (2014). Potentiation of methyl aminolevulinate (MAL)-induced photodynamic therapy (PDT) killing of skin cancer cells by mitochondria-targeted hydrogen sulfide (H₂S) donors. *Free Radical Biology and Medicine*, (76), S135.
- Florian, B., Vintilescu, R., Balseanu, A. T., Buga, A.-M., Grisk, O., Walker, L. C., Kessler, C. and Popa-Wagner, A. (2008). Long-term hypothermia reduces infarct volume in aged rats after focal ischemia. *Neuroscience Letters*, 438(2), 180–185.
- Forman, H. J., Zhang, H. and Rinna, A. (2009). Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(1-2), 1-12.

Fowler, B. (2005). Homocysteine: overview of biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Seminars in Vascular Medicine* (Vol. 5, pp. 77–86).

Fox, B., Schantz, J., Haigh, R., Wood, M. E., Moore, P. K., Viner, N., Spencer J. P. E., Winyard, P.G. and Whiteman, M. (2012). Inducible hydrogen sulfide synthesis in chondrocytes and mesenchymal progenitor cells: is H₂S a novel cytoprotective mediator in the inflamed joint?. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16(4), 896–910.

Fukuto, J. M., Carrington, S. J., Tantillo, D. J., Harrison, J. G., Ignarro, L. J., Freeman, B. A., Chent, A. and Wink, D. A. (2012). Small molecule signaling agents: the integrated chemistry and biochemistry of nitrogen oxides, oxides of carbon, dioxygen, hydrogen sulfide, and their derived species. *Chemical Research in Toxicology*, 25(4), 769–793.

Gallardo-Villagrán, M., Leger, D. Y., Liagre, B. and Therrien, B. (2019). Photosensitizers used in the photodynamic therapy of rheumatoid arthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 3339.

Galli, S., Colombo, L., Vanzuli, S., Daroqui, M. C., Vidal, M.C., Jasnis, M. A., de Lustig, E.S. and Eijan, A. M. (2000). Characterization of a fibroblastoid mammary carcinoma cell line (LM2) originated from a mouse adenocarcinoma. *International Journal of Oncology*, 17(6), 1259-1324.

Gamazon, E. R., and Stranger, B. E. (2015). The impact of human copy number variation on gene expression. *Briefings in functional genomics*, 14(5), 352-357.

Geiser, C. F. and Efron, M. L. (1968). Cystathioninuria in patients with neuroblastoma or ganglioneuroblastoma. Its correlation to vanilmandelic acid excretion and its value in diagnosis and therapy. *Cancer*, 22(4), 856–860.

Geiser, C. F. and Shih, V. E. (1980). Cystathioninuria and its origin in children with hepatoblastoma. *The Journal of Pediatrics*, 96(1), 72–75.

Girirajan, S., Campbell, C. D., Eichler, E. E. (2011). Human copy number variation and complex genetic disease. *Annual review of genetics*, 45, 203-226.

Giuffrè, A. and Vicente, J. B. (2018). Hydrogen sulfide biochemistry and interplay with other gaseous mediators in mammalian physiology. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. 6290931.

Gjessing, L. (1963). Cystathioninuria and vanil-lactic-acid-uria in neuroblastoma and argentaaffinoma. *The Lancet*, 282(7320), 1281–1282.

Gonzales, J. C., Brancini, G. T. P., Rodrigues, G. B., Silva-Junior, G. J., Bachmann, L., Wainwright, M. and Braga, G. Ú. L. (2017). Photodynamic inactivation of conidia of the fungus *Colletotrichum abscissum* on Citrus sinensis plants with methylene blue under solar radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 176, 54–61.

Gross-Amat, O., Guillen, M., Gimeno, J.-P., Salzet, M., Lebonvallet, N., Misery, L., Auxefans, C. and Nataf, S. (2020). Molecular Mapping of Hydrogen Sulfide Targets in Normal Human Keratinocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(13), 4648.

Hadjipanayis, C. G. and Stummer, W. (2019). 5-ALA and FDA approval for glioma surgery. *Journal of Neuro-Oncology*, 141(3), 479–486.

Hamblin, M. R. and Newman, E. L. (1994). On the mechanism of the tumour-localising effect in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 23(1), 3–8.

Haouzi, P., Notet, V., Chenuel, B., Chalon, B., Sponne, I., Ogier, V. and Bihain, B. (2008). H₂S induced hypometabolism in mice is missing in sedated sheep. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 160(1), 109–115.

Haouzi, P. (2012). Ventilatory and metabolic effects of exogenous hydrogen sulfide. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 184(2), 170–177.

Haouzi, P., Tubbs, N., Cheung, J. and Judenherc-Haouzi, A. (2019). Methylene blue administration during and after life-threatening intoxication by hydrogen sulfide: efficacy studies in adult sheep and mechanisms of action. *Toxicological Sciences*, 168(2), 443-459.

Hara, M. R., Agrawal, N., Kim, S. F., Cascio, M. B., Fujimuro, M., Ozeki, Y., Takahashi, M., Cheah, J.H., Tankou, S.K., Hester, L.D., Ferris, C.D., Hayward, S.D., Snyder S.H. and Sawa, A. (2005). S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nature Cell Biology*, 7(7), 665–674.

Hellmich, M. R. and Szabo, C. (2015). Hydrogen sulfide and cancer. En Moore, P, Whiteman, N. (Eds) Chemistry, Biochemistry and Pharmacology of Hydrogen Sulfide. Handbook of Experimental Pharmacology (vol 230, pp 233–241). Springer, Cham.

Hellmich, M. R., Coletta, C., Chao, C. and Szabo, C. (2015). The therapeutic potential of cystathionine β-synthetase/hydrogen sulfide inhibition in cancer. *Antioxidants & Redox Signaling*, 22(5), 424–448.

Hemelrijk, S. D., Dirkes, M. C., van Velzen, M. H. N., Bezemer, R., van Gulik, T. M. and Heger, M. (2018). Exogenous hydrogen sulfide gas does not induce hypothermia in normoxic mice. *Scientific Reports*, 8(1), 3855.

Henderson, P. W., Weinstein, A. L., Sohn, A. M., Jimenez, N., Krijgh, D. D. and Spector, J. A. (2010). Hydrogen sulfide attenuates intestinal ischemia-reperfusion injury when delivered in the post-ischemic period. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 25(10), 1642–1647.

Houihan, J. M., Kenna, J. G. and Hayes, J. D. (2013). The gasotransmitter hydrogen sulfide induces nrf2-target genes by inactivating the keap1 ubiquitin ligase substrate adaptor through formation of a disulfide bond between cys-226 and cys-613. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(5), 465–481.

Hua, W., Zhou, S. and Gong, F. (2013). Biphasic regulation of hydrogen sulfide in inflammation. *Chinese Medical Journal*, 126(7), 1360–1363.

Hughes, M. N., Centelles, M. N. and Moore, K. P. (2009). Making and working with hydrogen sulfide: the chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: a review. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(10), 1346–1353.

IVHHN. International Volcanic Health Hazard Network, *Hydrogen Sulfide (H₂S)*. <https://www.ivhhn.org/information/information-different-volcanic-gases/hydrogen-sulphide>

Iyer, A. K., Khaled, G., Fang, J. and Maeda, H. (2006). Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discovery Today*, 11(17–18), 812–818.

Jain, S. K., Huning, L. and Micinski, D. (2014). Hydrogen sulfide upregulates glutamate–cysteine ligase catalytic subunit, glutamate–cysteine ligase modifier subunit, and glutathione and inhibits interleukin-1 β secretion in monocytes exposed to high glucose levels. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 12(5), 299–302.

Jori, G., Fabris, C., Soncin, M., Ferro, S., Coppellotti, O., Dei, D., Fantetti, L., Chiti, G. and Roncucci, G. (2006). Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*, 38(5), 468–481.

Ju, E., Dong, K., Chen, Z., Liu, Z., Liu, C., Huang, Y., Wang, Z., Pu, F., Ren, J. and Qu, X. (2016). Copper (II)–graphitic carbon nitride triggered synergy: improved ROS generation and reduced glutathione levels for enhanced photodynamic therapy. *Angewandte Chemie International Edition*, 55(38), 11467–11471.

Jung, K. and Stephan, C. (2013). Thiosulfate in urine: new hope or new failure of a biomarker for prostate cancer? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 51(9), 1695–1697.

Kajimura, M., Fukuda, R., Bateman, R. M., Yamamoto, T. and Suematsu, M. (2010). Interactions of multiple gas-transducing systems: hallmarks and uncertainties of CO, NO, and H₂S gas biology. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(2), 157–192.

Kalyanaraman, B., Darley-Usmar, V., Davies, K. J. A., Dennery, P. A., Forman, H. J., Grisham, M. B., Mann, G.E., Moore, K., Roberts 2nd, L.J. and Ischiropoulos, H. (2012). Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(1), 1–6.

Kaneko, S. and Kaneko, S. (2016). Fluorescence-guided resection of malignant glioma with 5-ALA. *International Journal of Biomedical Imaging*, 2016. 6135293.

Kartha, R. V., Zhou, J., Hovde, L. B., Cheung, B. W. Y. and Schröder, H. (2012). Enhanced detection of hydrogen sulfide generated in cell culture using an agar trap method. *Analytical Biochemistry*, 423(1), 102-108.

Kaspar, J. W., Niture, S. K. and Jaiswal, A. K. (2009). Nrf2: INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(9), 1304–1309.

Kaya, C., Ashraf, M. and Akram, N. A. (2018). Hydrogen sulfide regulates the levels of key metabolites and antioxidant defense system to counteract oxidative stress in pepper (*Capsicum annuum L.*) plants exposed to high zinc regime. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(13), 12612–12618.

Kennedy, J. C. (2006). Introduction. En Pottier, R., Kramer, B., Baumgartner, R., Stepp, H. (Eds), *Photodynamic Therapy with ALA. A Clinical Handbook* (vol 6, pp 1-14). Royal Society of Chemistry.

Kessel, D. (1992). The role of low-density lipoprotein in the biodistribution of photosensitizing agents. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 14(3), 261–266.

Khan, M. N., Mobin, M., Abbas, Z. K. and Siddiqui, M. H. (2017). Nitric oxide-induced synthesis of hydrogen sulfide alleviates osmotic stress in wheat seedlings through sustaining antioxidant enzymes, osmolyte accumulation and cysteine homeostasis. *Nitric Oxide*, 68, 91–102.

Kim, J., Kim, H., Roh, H. and Kwon, Y. (2018). Causes of hyperhomocysteinemia and its pathological significance. *Archives of Pharmacal Research*, 41(4), 372–383.

Kimura, H. (2010). Hydrogen sulfide: from brain to gut. *Antioxidants & Redox Signaling*, 12(9), 1111-1123.

Kimura, H. (2015). Hydrogen sulfide and polysulfides as signaling molecules. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 91(4), 131–159.

Kimura, H., Nagai, Y., Umemura, K. and Kimura, Y. (2005). Physiological roles of hydrogen sulfide: synaptic modulation, neuroprotection, and smooth muscle relaxation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7(5–6), 795–803.

Kimura, Y., Dargusch, R., Schubert, D. and Kimura, H. (2006). Hydrogen sulfide protects HT22 neuronal cells from oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(3–4), 661–670.

Kubo, S., Kurokawa, Y., Doe, I., Masuko, T., Sekiguchi, F. and Kawabata, A. (2007). Hydrogen sulfide inhibits activity of three isoforms of recombinant nitric oxide synthase. *Toxicology*, 241(1-2), 92-97.

Lauer, S. and Gresham, D. (2019). An evolving view of copy number variants. *Current Genetics*, 65(6), 1287-1295.

- Lee, M., Tazzari, V., Giustarini, D., Rossi, R., Sparatore, A., Del Soldato, P., McGeer, E. and McGeer, P. L. (2010). Effects of hydrogen sulfide-releasing L-DOPA derivatives on glial activation: potential for treating Parkinson disease. *Journal of Biological Chemistry*, 285(23), 17318–17328.
- Lee, S. R., Nilius, B. and Han, J. (2018). Gaseous signaling molecules in cardiovascular function: from mechanisms to clinical translation. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 174, 81–156.
- Legator, M. S., Singleton, C. R., Morris, D. L. and Philips, D. L. (2001). Health effects from chronic low-level exposure to hydrogen sulfide. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 56(2), 123–131.
- Levinn, C. M., Cerda, M. M. and Pluth, M. D. (2020). Activatable small-molecule hydrogen sulfide donors. *Antioxidants & Redox Signaling*, 32(2), 96–109.
- Levitt, M. D., Springfield, J., Furne, J., Koenig, T. and Suarez, F. L. (2002). Physiology of sulfide in the rat colon: use of bismuth to assess colonic sulfide production. *Journal of Applied Physiology*, 92(4), 1655–1660.
- Li, J., Shi, C., Wang, X., Liu, C., Ding, X., Ma, P., Wang, X. and Jia, H. (2020). Hydrogen sulfide regulates the activity of antioxidant enzymes through persulfidation and improves the resistance of tomato seedling to Copper Oxide nanoparticles (CuO NPs)-induced oxidative stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 156, 257–266.
- Li, L., Whiteman, M., Guan, Y. Y., Neo, K. L., Cheng, Y., Lee, S. W., Zhao, Y., Baskar, R., Tan, C-H. and Moore, P.K. (2008). Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137) new insights into the biology of hydrogen sulfide. *Circulation*, 117(18), 2351–2360.
- Liu L., Cui J., Song C-J., Bian J-S., Sparatore A., Del Soldato P., Wang, X-Y. and Yan, C-D. (2012). H₂S -Releasing Aspirin Protects against Aspirin-Induced Gastric Injury via Reducing Oxidative Stress. *PLoS One* 7(9): e46301.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1): 265-275.
- Magee, E. A., Richardson, C. J., Hughes, R. and Cummings, J. H. (2000). Contribution of dietary protein to sulfide production in the large intestine: an in vitro and a controlled feeding study in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72(6), 1488–1494.
- Marshall, T., Dorman, D., Gardner, D. and Adeshina, F. (2009). Provisional advisory levels (PALs) for hydrogen sulfide (H₂S). *Inhalation Toxicology*, 21(sup3), 56–72.
- Mauzerall, D. and Granick, S. (1956). The occurrence and determination of δ-aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. *Journal of Biological Chemistry*, 219(1), 435-446.

Mesquita, C. S., Oliveira, R., Bento, F., Geraldo, D., Rodrigues, J. V. and Marcos, J. C. (2014). Simplified 2, 4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Analytical Biochemistry*, 458, 69-71.

Middelburg, T. A., Van Zaane, F., De Bruijn, H. S., van Der Ploeg-van den Heuvel, A., Sterenborg, H. J. C. M., Neumann, H. A. M., De Haas, E. R. M. and Robinson D. J. (2010). Fractionated illumination at low fluence rate photodynamic therapy in mice. *Photochemistry and Photobiology*, 86(5), 1140–1146.

Miranda, K. M., Espey, M. G. and Wink, D. A. (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, 5(1), 62-71.

Mishanina, T. V., Libiad, M. and Banerjee, R. (2015). Biogenesis of reactive sulfur species for signaling by hydrogen sulfide oxidation pathways. *Nature Chemical Biology*, 11(7), 457-464.

Módis, K., Coletta, C., Asimakopoulou, A., Szczesny, B., Chao, C., Papapetropoulos, A., Hellmich, M. R. and Szabo, C. (2014). Effect of S-adenosyl-L-methionine (SAM), an allosteric activator of cystathionine- β -synthase (CBS) on colorectal cancer cell proliferation and bioenergetics in vitro. *Nitric Oxide*, 41, 146–156.

Morikawa, T., Kajimura, M., Nakamura, T., Hishiki, T., Nakanishi, T., Yukutake, Y., Nagahata, Y., Ishikawa, M., Hattori, K., Takenouchi, T., Takahashi, T., Ishii, I., Matsubara, K., Kabe, Y., Uchiyama, S., Nagata, E., Gadalla, M.M., Snyder, S.H. and Suematsu, M. (2012). Hypoxic regulation of the cerebral microcirculation is mediated by a carbon monoxide-sensitive hydrogen sulfide pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(4), 1293–1298.

Motl N., Yadav, P., Banerjee, R. Enzymology of Hydrogen Sulfide Turnover, En: Hydrogen sulfide and its therapeutic applications, editado por Kimura H. Springer-Verlag, 2013, pp. 83.107.

Murphy, B., Bhattacharya, R. and Mukherjee, P. (2019). Hydrogen sulfide signaling in mitochondria and disease. *The FASEB Journal*, 33(12), 13098–13125.

Mustafa, A. K., Gadalla, M. M. and Snyder, S. H. (2009a). Signaling by gasotransmitters. *Science Signaling*, 2(68), re2.

Mustafa, A. K., Gadalla, M. M., Sen, N., Kim, S., Mu, W., Gazi, S. K., Barrow, R.K., Yang, G., Wang, R. and Snyder, S.H. (2009b). H₂S signals through protein S-sulfhydration. *Science Signaling*, 2(96), ra72.

Mustafa, A. K., Sikka, G., Gazi, S. K., Steppan, J., Jung, S. M., Bhunia, A. K., Barodka, V.M., Gazi, F.K., Barrow, R.K., Wang, R., Amzel, L.M., Berkowitz, D.E. and Snyder, S.H.. (2011). Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels. *Circulation Research*, 109(11), 1259–1268.

Nagpure, B. V and Bian, J.-S. (2016). Interaction of hydrogen sulfide with nitric oxide in the cardiovascular system. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.6904327.

Nathan, C. (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB Journal*, 6(12), 3051-3064.

Naushad, S. M., Reddy, C. A., Kumaraswami, K., Divyaa, S., Kotamraju, S., Gottumukkala, S. R., Digumarti, R.R. and Kutala, V. K. (2014). Impact of hyperhomocysteinemia on breast cancer initiation and progression: epigenetic perspective. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 68(2), 397–406.

O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. Government of the United Kingdom, 19 May 2016.
https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf

Olson, K. R. (2012). A practical look at the chemistry and biology of hydrogen sulfide. *Antioxidants & Redox Signaling*, 17(1), 32–44.

Olson, K. R. and Straub, K. D. (2015). The role of hydrogen sulfide in evolution and the evolution of hydrogen sulfide in metabolism and signaling. *Physiology*. 31(1):60-72.

Ormond, A. B. and Freeman, H. S. (2013). Dye sensitizers for photodynamic therapy. *Materials*, 6(3), 817–840.

Pae, H-O., Lee, Y. C., Jo, E.-K. and Chung, H.-T. (2009). Subtle interplay of endogenous bioactive gases (NO, CO and H₂S) in inflammation. *Archives of Pharmacal Research*, 32(8), 1155–1162.

Pan, T-T., Neo, K. L., Hu, L-F., Yong, Q. C. and Bian, J-S. (2008). H₂S preconditioning-induced PKC activation regulates intracellular calcium handling in rat cardiomyocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 294(1), C169–C177.

Parsanathan, R. and Jain, S. K. (2018). Hydrogen sulfide increases glutathione biosynthesis, and glucose uptake and utilisation in C₂C₁₂ mouse myotubes. *Free Radical Research*, 52(2), 288-303.

Parsanathan, R. and Jain, S. K. (2019). Hydrogen sulfide regulates circadian-clock genes in C₂C₁₂ myotubes and the muscle of high-fat-diet-fed mice. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 672, 108054.

Paul, B. D. and Snyder, S. H. (2015). H₂S: a novel gasotransmitter that signals by sulfhydration. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(11), 687–700.

Perotti, C., Casas, A. and Batlle, A. M. C. (2002). Scavengers protection of cells against ALA-based photodynamic therapy-induced damage. *Lasers in Medical Science*, 17(4), 222-229.

Pilco-Ferreto, N. and Calaf, G. M. (2016). Influence of doxorubicin on apoptosis and oxidative stress in breast cancer cell lines. *International Journal of Oncology*, 49(2), 753-762.

- Ponka, P. (1999). Cell biology of heme. *The American Journal of the Medical Sciences*, 318(4), 241–256.
- Powell, C. R., Dillon, K. M. and Matson, J. B. (2018). A review of hydrogen sulfide (H₂S) donors: Chemistry and potential therapeutic applications. *Biochemical Pharmacology*, 149, 110–123.
- Predmore, B. L., Lefer, D. J. and Gojon, G. (2012). Hydrogen sulfide in biochemistry and medicine. *Antioxidants & Redox Signaling*, 17(1), 119–140.
- Redmond, R. W. and Gamlin, J. N. (1999). A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochemistry and Photobiology*, 70(4), 391–475.
- Reiffenstein, R. J., Hulbert, W. C. and Roth, S. H. (1992). Toxicology of hydrogen sulfide. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 32, 109.
- Rockson, S. G., Lorenz, D. P., Cheong, W.-F. and Woodburn, K. W. (2000). Photoangioplasty: an emerging clinical cardiovascular role for photodynamic therapy. *Circulation*, 102(5), 591–596.
- Rossi, R., Lotti, T. and Bruscolo, N. (2011). Photodynamic therapy/assisted photorejuvenation. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*, 1(2), 30.
- Sáenz, D. A., Bari, S. E., Salido, E., Chianelli, M. and Rosenstein, R. E. (2007). Effect of nitroxyl on the hamster retinal nitridergic pathway. *Neurochemistry International*, 51(6–7), 424–432.
- Scheele, C. W. (1782). *Chemische Abhandlung von Luft und Feuer*. Crusius.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. and Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682.
- Searcy, D. G. and Lee, S. H. (1998). Sulfur reduction by human erythrocytes. *Journal of Experimental Zoology*, 282(3), 310–322.
- Sen, S., Kawahara, B., Gupta, D., Tsai, R., Khachatryan, M., Roy-Chowdhuri, S Bose, S., Yoon, A., Faull, K., Farias-Eisner, R. and Chaudhuri, G. (2015). Role of cystathionine β-synthase in human breast Cancer. *Free Radical Biology and Medicine*, 86, 228–238.
- Sharkey, S. M., Wilson, B. C., Moorehead, R. and Singh, G. (1993). Mitochondrial alterations in photodynamic therapy-resistant cells. *Cancer Research*, 53(20), 4994–4999.
- Shatalin, K., Shatalina, E., Mironov, A. and Nudler, E. (2011). H₂S: a universal defense against antibiotics in bacteria. *Science*, 334(6058), 986–990.

Shefa, U., Kim, M., Jeong, N. Y. and Jung, J. (2018). Antioxidant and Cell-Signaling Functions of Hydrogen Sulfide in the Central Nervous System. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018. 1873962.

Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*, 215(2), 213–219.

Sivarajah, A., McDonald, M. C. and Thiemermann, C. (2006). The production of hydrogen sulfide limits myocardial ischemia and reperfusion injury and contributes to the cardioprotective effects of preconditioning with endotoxin, but not ischemia in the rat. *Shock*, 26(2), 154–161.

Sparatore, A., Perrino, E., Tazzari, V., Giustarini, D., Rossi, R., Rossoni, G., Erdman, K., Schröder, H. and Del Soldato, P. (2009). Pharmacological profile of a novel H₂S-releasing aspirin. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(5), 586–592.

Spasova, V., Mladenov, B., Rangelov, S., Hammoudeh, Z., Nesheva, D., Serbezov, D., Staneva, R., Hadjidekova, S., Ganev, M., Balabanski, L., Vazharova, R., Slavov, C., Toncheva, D. and Antonova, O. (2021). Clinical impact of copy number variation changes in bladder cancer samples. *Experimental and therapeutic medicine*, 22(2), 1-15.

Stabler, S., Koyama, T., Zhao, Z., Martinez-Ferrer, M., Allen, R. H., Luka, Z., Loukachevitch, L.V., Clark, P.E., Wagner, C. and Bhowmick, N.A. (2011). Serum methionine metabolites are risk factors for metastatic prostate cancer progression. *PLoS One*, 6(8), e22486.

Stenzl, A., Burger, M., Fradet, Y., Mynderse, L. A., Soloway, M. S., Witjes, J. A., Kriegmair, M., Karl, A., Shen, Y. and Grossman, H. B. (2010). Hexaminolevulinic acid guided fluorescence cystoscopy reduces recurrence in patients with nonmuscle invasive bladder cancer. *The Journal of Urology*, 184(5), 1907–1914.

Stipanuk, M. H. and Beck, P. W. (1982). Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochemical Journal*, 206(2), 267–277.

Streeter, E., Hart, J. and Badoer, E. (2012). An investigation of the mechanisms of hydrogen sulfide-induced vasorelaxation in rat middle cerebral arteries. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 385(10), 991–1002.

Stummer, W., Pichlmeier, U., Meinel, T., Wiestler, O. D., Zanella, F., Reulen, H-J. and Group, A.-G. S. (2006). Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *The Lancet Oncology*, 7(5), 392–401.

Sulaieva, O. and Wallace, J. L. (2015). Gaseous mediator-based anti-inflammatory drugs. *Current Opinion in Pharmacology*, 25, 1–6.

Sun, F., Cheng, Y. and Chen, C. (2015). Regulation of heme biosynthesis and transport in metazoa. *Science China Life Sciences*, 58(8), 757–764.

- Sun, W-H., Liu, F., Chen, Y. and Zhu, Y-C. (2012). Hydrogen sulfide decreases the levels of ROS by inhibiting mitochondrial complex IV and increasing SOD activities in cardiomyocytes under ischemia/reperfusion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 421(2), 164–169.
- Sun, Y-G., Cao, Y-X., Wang, W-W., Ma, S-F., Yao, T. and Zhu, Y-C. (2008). Hydrogen sulphide is an inhibitor of L-type calcium channels and mechanical contraction in rat cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*, 79(4), 632–641.
- Szabo, C. (2016). Gasotransmitters in cancer: from pathophysiology to experimental therapy. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 15(3), 185.
- Szabo, C. and Papapetropoulos, A. (2011). Hydrogen sulphide and angiogenesis: mechanisms and applications. *British Journal of Pharmacology*, 164(3), 853–865.
- Szabo, C., Coletta, C., Chao, C., Módis, K., Szczesny, B., Papapetropoulos, A. and Hellmich, M. R. (2013). Tumor-derived hydrogen sulfide, produced by cystathionine- β -synthase, stimulates bioenergetics, cell proliferation, and angiogenesis in colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(30), 12474–12479.
- Szabo, C. and Papapetropoulos, A. (2017). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CII : Pharmacological Modulation of H₂S Levels : H₂S Donors and H₂S Biosynthesis Inhibitors, (October), 497–564.
- Tang, G., Wu, L. and Wang, R. (2010). Interaction of hydrogen sulfide with ion channels. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 37(7), 753–763.
- Taub, A. F. (2007). Photodynamic therapy: other uses. *Dermatologic Clinics*, 25(1), 101–109.
- Taverne, Y. J. H. J., Bogers, A. J. J. C., Duncker, D. J. and Merkus, D. (2013). Reactive oxygen species and the cardiovascular system. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013. 862423.
- Tian, X. Y., Wong, W. T., Sayed, N., Luo, J., Tsang, S. Y., Bian, Z. X., Lu, Y., Cheang, W.S., Yao, X., Chen, Z.Y. and Huang, Y. (2012). NaHS relaxes rat cerebral artery in vitro via inhibition of I-type voltage-sensitive Ca²⁺ channel. *Pharmacological Research*, 65(2), 239–246.
- Toombs, C. F., Insko, M. A., Wintner, E. A., Deckwerth, T. L., Usansky, H., Jamil, K., Goldstein, B., Cooreman, M. and Szabo, C. (2010). Detection of exhaled hydrogen sulphide gas in healthy human volunteers during intravenous administration of sodium sulphide. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 69(6), 626–636.
- Uhlig, S. and Wendel, A. (1992). The physiological consequences of glutathione variations. *Life Sciences*, 51(14), 1083–1094.
- Urtreger, A., Ladeda, V., Puricelli, L., Rivelli, A., Vidal, M., de lustig, E.S. and Joffe, E. (1997). Modulation of fibronectin expression and proteolytic activity associated with the invasive and metastatic phenotype in two new murine mammary tumor cell lines. *International Journal of Oncology*, 11(3), 489-496.

- Vallecorsa, P. D. Nuevos fotosensibilizantes en el tratamiento fotodinámico del cáncer. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires (2019)
- van Gemert, J. C., Berenbaum, M. C. and Gijsbers, G. H. (1985). Wavelength and light-dose dependence in tumour phototherapy with haematoporphyrin derivative. *British Journal of Cancer*, 52(1), 43–49.
- van Steveninck, J., Tijssen, K., Boegheim, J. P. J., van Der Zee, J., & Dubbelman, T. (1986). Photodynamic generation of hydroxyl radicals by hematoporphyrin derivative and light. *Photochemistry and Photobiology*, 44(6), 711–716.
- Voûte, P. A. and Wadman, S. K. (1968). Cystathioninuria in hepatoblastoma. *Clinica Chimica Acta*, 22(3), 373–378.
- Wainwright, M. and Baptista, M. S. (2011). The application of photosensitisers to tropical pathogens in the blood supply. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 8(3), 240–248.
- Wang, L., Han, H., Liu, Y., Zhang, X., Shi, X. and Wang, T. (2018). Cystathionine β -synthase Induces Multidrug Resistance and Metastasis in Hepatocellular Carcinoma. *Current Molecular Medicine*, 18(7), 496–506.
- Wang, R. (2002). Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *The FASEB Journal*, 16(13), 1792–1798.
- Wang, R. (2003). The gasotransmitter role of hydrogen sulfide. *Antioxidants and Redox Signaling*, 5(4), 493–501.
- Weishaupt, K. R., Gomer, C. J. and Dougherty, T. J. (1976). Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo-inactivation of a murine tumor. *Cancer research*, 36(7 Parte 1), 2326-2329.
- Wen, Y.-D., Wang, H., Kho, S.-H., Rinkiko, S., Sheng, X., Shen, H.-M. and Zhu, Y.-Z. (2013). Hydrogen sulfide protects HUVECs against hydrogen peroxide induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *PloS One*, 8(2), e53147.
- WMA Declaration of Helsinki-Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. World Medical Association: July 9, 2018.
<https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>.
- Wu, L. L. and Wu, J. T. (2002). Hyperhomocysteinemia is a risk factor for cancer and a new potential tumor marker. *Clinica Chimica Acta*, 322(1–2), 21–28.
- Xiao, Q., Ying, J., Xiang, L. and Zhang, C. (2018). The biologic effect of hydrogen sulfide and its function in various diseases. *Medicine*, 97(44).e13065.
- Xie, L., Gu, Y., Wen, M., Zhao, S., Wang, W., Ma, Y., Meng, G., Han, Y., Wang, Y., Liu, G., Moore, P.K., Wang, X., Wang, H., Zhang, Z., Yu, Y., Ferro, A., Huang, Z. and Ji, Y. (2016). Hydrogen sulfide induces Keap1 S-sulfhydration and suppresses diabetes-accelerated atherosclerosis via Nrf2 activation. *Diabetes*, 65(10), 3171–3184.

Yamasaki, H. and Cohen, M. F. (2016). Biological consilience of hydrogen sulfide and nitric oxide in plants: gases of primordial earth linking plant, microbial and animal physiologies. *Nitric Oxide*, 55, 91–100.

Yan, S., Tang, C., Du, J. and Jin, H. (2011). Hydrogen sulfide and vascular relaxation. *Chinese Medical Journal*, 124(22), 3816–3819.

Yao, C. K., Rotbart, A., Ou, J. Z., Kalantar-Zadeh, K., Muir, J. G. and Gibson, P. R. (2018). Modulation of colonic hydrogen sulfide production by diet and mesalazine utilizing a novel gas-profiling technology. *Gut Microbes*, 9(6), 510–522.

Zaorska, E., Tomasova, L., Koszelewski, D., Ostaszewski, R. and Ufnal, M. (2020). Hydrogen sulfide in pharmacotherapy, beyond the hydrogen sulfide-donors. *Biomolecules*, 10(2), 323.

Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y. and Wang, R. (2001). The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K_{ATP} channel opener. *The EMBO Journal*, 20(21), 6008–6016.

Zhu, H., Blake, S., Chan, K. T., Pearson, R. B. and Kang, J. (2018). Cystathionine β-synthase in physiology and cancer. *BioMed Research International*, 2018. 3205125.

Zhu., Y-C. (2013) Signaling Mechanisms Underlying the Hydrogen Sulfide Effects: Identification of Hydrogen Sulfide “Receptors”. En: Hydrogen sulfide and its therapeutic applications, editado por Kimura H. Springer-Verlag, 2013, pp. 83.107.



Lic. Gustavo H. Calvo
Tesista



Dr. Daniel A. Sáenz
Director de tesis



Dra. Gabriela Di Venosa
Directora Adjunta