



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural

Influencia de la disponibilidad de folatos, metionina, serina  
y glicina en el metabolismo y actividad de linfocitos T CD8+  
efectores

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Girón López, José Javier

Tutor/a: Jantus Lewintre, Eloisa

Cotutor/a externo: GARCIA CAÑAVÉRAS, JUAN CARLOS

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL (ETSEAMN)



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica  
i del Medi Natural



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Instituto de Investigación  
Sanitaria La Fe

---

## Influencia de la disponibilidad de folatos, metionina, serina y glicina en el metabolismo y actividad de linfocitos T CD8+ efectores

---

Trabajo Final de Grado en Biotecnología  
Curso Académico 2021-2022

**AUTOR:** José Javier Girón López

**TUTORA ACADÉMICA:** Eloísa Jantus Lewintre

**TUTOR EXTERNO:** Juan Carlos García Cañaveras



VALENCIA, JULIO DE 2022

## **TÍTULO**

Influencia de la disponibilidad de folatos, metionina, serina y glicina en el metabolismo y actividad de linfocitos T CD8<sup>+</sup> efectores.

## **RESUMEN**

El folato es un cofactor esencial que actúa como aceptor/dador de unidades de un carbono (1C). La serina es el principal donante de unidades de 1C para la biosíntesis de nucleótidos, así como de glicina para la síntesis de glutatión, esencial en el control del estrés oxidativo. De forma complementaria, el ciclo de la metionina/transmetilación, a través de la síntesis de S-adenosil-metionina, es la principal fuente de grupos metilo en la metilación de DNA, RNA y proteínas, con lo que juega un papel esencial en la regulación de la expresión génica, así como en la actividad de múltiples proteínas. El metabolismo del cofactor folato, cuya disponibilidad y estado químico determinan el correcto funcionamiento estas rutas, frecuentemente alteradas en cáncer debido tanto al metabolismo intrínseco de las células presentes, como a la disponibilidad de nutrientes y cofactores. La presencia de concentraciones no fisiológicas de estos metabolitos en los medios comerciales supone una limitación a la información que se puede obtener in vitro.

Nuestro objetivo es estudiar la influencia de las condiciones de cultivo en la proliferación, el metabolismo de serina-folato-1C y la sensibilidad a inhibidores de dicha ruta, SHIN2 (inhibidor de la enzima serina-hidroximetiltransferasa) y metotrexato (inhibidor de la dihidrofolato-reductasa), en linfocitos T CD8<sup>+</sup> efectores de ratón.

Para ello comparamos el medio estándar RPMI con el medio HPLM, que contiene concentraciones fisiológicas de aminoácidos y glucosa, y en ambos casos empleando concentraciones normales o fisiológicas de folato (1 mg/L de folato vs 0.1 mg/mL de 5-MeTHF). El estudio del metabolismo se realiza mediante el empleo de trazadores isotópicos estables (U-<sup>13</sup>C-glucosa, U-<sup>13</sup>C-serina, U-<sup>13</sup>C-glicina, <sup>2</sup>H<sub>1</sub>-glucosa) y su análisis mediante metabolómica basada en cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución.

En comparación con condiciones de cultivo estándar, tanto el medio HPLM como el uso de concentraciones fisiológicas de folatos limitan la proliferación de los linfocitos. El efecto de los folatos se debe a la limitación de las unidades de 1C disponibles mientras que la disponibilidad de serina y glutamina juegan un papel clave en HPLM. En comparación con RPMI, en el medio HPLM se observa una mayor síntesis de novo de serina a partir de glucosa, una relevancia mayor de la importación en las fuentes de glicina y una menor contribución relativa de la ruta de las pentosas fosfato a la síntesis de NADPH. En ambos medios, el uso de folatos fisiológicos limita la actividad SHMT. En relación con los inhibidores, tanto metotrexato como SHIN2 afectan a la ruta de biosíntesis de purinas. Sin embargo, mientras que el metotrexato no provoca variaciones en el perfil de origen de serina y glicina, SHIN2 sí lo hace. En ambos casos la fuente de folatos afecta a los efectos metabólicos de los inhibidores.

## **PALABRAS CLAVE**

Folatos; Serina; Glicina; Metionina; linfocitos T CD8<sup>+</sup>; fisiológico; metabolismo; transmetilación; SHIN2; metotrexato; cáncer

**AUTOR:** José Javier Girón López

**TUTORA ACADÉMICA:** Eloísa Jantus Lewintre

**TUTOR EXTERNO:** Juan Carlos García Cañaveras

**LOCALIDAD Y FECHA:** Valencia, Julio 2022

## **TITLE**

Influence of folate, methionine, serine and glycine availability on T CD8<sup>+</sup> effector lymphocyte metabolism and activity.

## **ABSTRACT**

Folate is an essential cofactor that acts as an acceptor/donor of one-carbon (1C) units. Serine is the main donor of 1C units for nucleotide biosynthesis, as well as glycine for glutathione synthesis, essential in the control of oxidative stress. Complementarily, the methionine/trans-methylation cycle, through the synthesis of S-adenosyl-methionine, is the main source of methyl groups in the methylation of DNA, RNA and proteins, thus playing an essential role in the regulation of gene expression, as well as in the activity of multiple proteins. The metabolism of the cofactor folate, whose availability and chemical status determine the correct functioning of these pathways, frequently altered in cancer due to both the intrinsic metabolism of the cells present, as well as the availability of nutrients and cofactors. The presence of non-physiological concentrations of these metabolites in commercial media limits the information that can be obtained in vitro.

Our aim is to study the influence of culture conditions on proliferation, serine-folate-1C metabolism and sensitivity to inhibitors of this pathway, SHIN2 (serine hydroxymethyltransferase inhibitor) and methotrexate (dihydrofolate reductase inhibitor), in mouse effector CD8<sup>+</sup> T lymphocytes.

We compared standard RPMI medium with HPLM medium containing physiological concentrations of amino acids and glucose, and in both cases using normal or physiological concentrations of folate (1 mg/L folate vs 0.1 mg/mL 5-MeTHF). Metabolism is studied using stable isotopic tracers (U-<sup>13</sup>C-glucose, U-<sup>13</sup>C-serine, U-<sup>13</sup>C-glycine, <sup>2</sup>H<sub>1</sub>-glucose) and their analysis by metabolomics based on liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry.

Compared to standard culture conditions, both HPLM medium and the use of physiological folate concentrations limit lymphocyte proliferation. The effect of folates is due to the limitation of available 1C units while the availability of serine and glutamine play a key role in HPLM. Compared to RPMI, HPLM medium shows a higher de novo synthesis of serine from glucose, a higher relevance of import in glycine sources and a lower relative contribution of the pentose phosphate pathway to NADPH synthesis. In both media, the use of physiological folates limits SHMT activity. With regard to inhibitors, both methotrexate and SHIN2 affect the purine biosynthesis pathway. However, while methotrexate does not cause variations in the serine and glycine origin profile, SHIN2 does. In both cases the source of folates affects the metabolic effects of the inhibitors.

## **KEY WORDS**

Folates; Serine; Glycine; Methionine; CD8<sup>+</sup> lymphocyte; physiological; metabolism; transmethylation; SHIN2; methotrexate; cancer

**AUTHOR:** José Javier Girón López

**ACADEMIC SUPERVISOR:** Eloísa Jantus Lewintre

**EXTERNAL SUPERVISOR:** Juan Carlos García Cañaveras

**LOCATION AND DATE:** Valencia, July 2022

## **AGRADECIMIENTOS**

*Con este proyecto concluye una de las etapas más bonitas de mi vida, en la que he podido cargar la mochila de experiencias que me han ayudado a crecer y madurar y donde he conocido a personas maravillosas que quedarán para siempre.*

*Nada de esto habría sido posible sin todos los compañeros de la Unidad de biomarcadores y medicina de precisión del instituto de investigación de la Fe donde hace ya casi 2 años, Agustín Lahoz me dio mi primera oportunidad en un laboratorio.*

*Juan Carlos ha sido mi tutor durante todo este tiempo y no podría haber tenido un mejor maestro ni un mejor compañero de ideas y trabajo. Gracias por cada minuto que has dedicado a formarme, me quedo con cada truco y cada detalle y sin ninguna duda siempre serás un gran referente para mí.*

*Este trabajo no habría sido posible sin Eloísa, a la cual agradezco su predisposición siempre para echarme una mano y la voluntad que ha tenido para que este proyecto concluya de una forma tan satisfactoria.*

*Gracias a todos los amigos que me han acompañado en este viaje. Me quiero acordar de todos, pero en especial agradecer a Paco y Xavi por aguantar mis manías día a día. Y sin duda me quiero acordar de todos los protagonistas con los que he compartido estos 4 años en cada clase, además de compañeros hemos formado una pequeña familia y con eso me quedo.*

*Quiero agradecer también a toda mi familia y en especial a mis padres porque sin su esfuerzo y dedicación en mí no sería quién soy hoy en día. Gracias por cada esfuerzo para que no me faltara de nada.*

*En último lugar, gracias a Sara por ser la persona más especial que me he encontrado en este camino, por quererme tanto y por haberme apoyado en cada momento complicado a lo largo de estos 4 años juntos. Estoy deseando seguir recorriendo camino a tu lado.*

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1.	<i>METABOLISMO DEL FOLATO .....</i>	<i>1</i>
1.1.1.	Estructura y actividad de las especies de folato .....	1
1.1.2.	Asimilación y activación del folato .....	2
1.1.3.	Metabolismo del folato-serina-1C.....	3
1.1.4.	Ciclo de la metionina.....	4
1.2.	<i>METABOLISMO DEL NADPH .....</i>	<i>5</i>
1.3.	<i>LINFOCITOS T CD8+ EFECTORES Y METABOLISMO DE 1 CARBONO.....</i>	<i>5</i>
1.4.	<i>ESTRATEGIAS DE INTERÉS PARA EL ESTUDIO DEL METABOLISMO DEL FOLATO.....</i>	<i>6</i>
1.4.1.	Metabólica .....	6
1.4.2.	Cromatografía líquida y espectrometría de masas como técnicas de análisis .....	7
1.4.3.	Uso de trazadores en metabólica .....	8
1.4.3.1.	<i>Trazadores en el estudio del metabolismo de 1 carbono .....</i>	<i>8</i>
1.4.3.2.	<i>Trazadores en el estudio del metabolismo del NADPH.....</i>	<i>10</i>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>10</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>11</b>
3.1.	<i>AISLAMIENTO, ACTIVACIÓN Y CULTIVO DE LINFOCITOS T CD8+ DE RATÓN.....</i>	<i>11</i>
3.1.1.	Aislamiento .....	11
3.1.2.	Activación.....	12
3.1.3.	Expansión.....	12
3.1.4.	Siembra con trazadores .....	13
3.1.5.	Estimación del número de divisiones en cada medio de cultivo .....	13
3.2.	<i>MEDIOS DE CULTIVO.....</i>	<i>13</i>
3.2.1.	Composición de los medios de cultivo utilizados .....	13
3.2.2.	Preparación de los medios de cultivo utilizados .....	14
3.3.	<i>DISEÑO EXPERIMENTAL .....</i>	<i>15</i>
3.3.1.	Metabolismo de 1 carbono, serina y glicina.....	15
3.3.2.	Metabolismo NADP/NADPH .....	15
3.4.	<i>PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS MEDIANTE LC-MS.....</i>	<i>16</i>
3.4.1.	Preparación de muestras para metabolismo de 1 carbono, serina y glicina. ....	16
3.4.2.	Preparación de muestras para metabolismo de NADPH.....	16
3.5.	<i>ANÁLISIS METABÓLICO MEDIANTE UPLC-MS.....</i>	<i>17</i>
3.6.	<i>ANÁLISIS DE DATOS.....</i>	<i>17</i>

3.6.1.	Extracción de datos mediante EL-Maven .....	17
3.6.2.	Corrección de abundancia mediante AccuCor .....	18
3.6.3.	Representación de metabolitos de interés .....	18
3.6.4.	Cálculos para el análisis del metabolismo serina/glicina/ <sup>13</sup> C .....	18
3.6.5.	Cálculos para el análisis del metabolismo NAD(P)(H).....	20
3.6.6.	Herramientas de análisis estadístico.....	20
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>21</b>
4.1.	<i>PROLIFERACIÓN Y COMPOSICIÓN METABÓLICA DE LOS MEDIOS EN MUESTRAS CONTROL.</i>	21
4.2.	<i>RUTA DE BIOSÍNTESIS DE PURINAS EN MUESTRAS CONTROL .....</i>	22
4.2.1.	Evaluación a las 6 horas .....	23
4.2.2.	Evaluación a las 24 horas .....	25
4.3.	<i>MARCAJE Y VÍAS DE OBTENCIÓN DE SERINA Y GLICINA EN MUESTRAS CONTROL.....</i>	27
4.3.1.	Estudio del marcaje y origen de serina .....	27
4.3.2.	Estudio del marcaje y origen de glicina .....	28
4.4.	<i>RUTA DE BIOSÍNTESIS DE PURINAS EN MUESTRAS TRATAMIENTO.....</i>	29
4.4.1.	Evaluación del tratamiento con SHIN2.....	29
4.4.2.	Evaluación del tratamiento con MTX .....	30
4.5.	<i>MARCAJE DE ATP PARA LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS AL EMPLEAR U-<sup>13</sup>C-SERINA.....</i>	32
4.6.	<i>ORIGEN DE SERINA Y GLICINA EN MUESTRAS TRATAMIENTO .....</i>	33
4.6.1.	Estudio del origen de la serina .....	33
4.6.2.	Estudio del origen de la glicina.....	34
4.7.	<i>MARCAJE DEL NADPH Y RUTA <math>\alpha</math>PPP EN FUNCIÓN DEL MEDIO.....</i>	35
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO.....</b>	<b>37</b>
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>38</b>
<b>7.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>41</b>
	<i>ANEXO I. TABLAS SUPLEMENTARIAS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EVALUAR INFLUENCIA DEL MEDIO Y LA FUENTE DE FOLATO EN LAS FUENTES DE SERINA.....</i>	41
	<i>ANEXO II. TABLAS SUPLEMENTARIAS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EVALUAR INFLUENCIA DEL MEDIO Y LA FUENTE DE FOLATO EN LAS FUENTES DE GLICINA.....</i>	42
	<i>ANEXO III. TABLAS SUPLEMENTARIAS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EVALUAR INFLUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS EN LAS FUENTES DE SERINA.....</i>	43
	<i>ANEXO IV. TABLAS SUPLEMENTARIAS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EVALUAR INFLUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS EN LAS FUENTES DE GLICINA .....</i>	45
	<i>ANEXO V. TABLAS SUPLEMENTARIAS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EVALUAR INFLUENCIA DEL MEDIO Y LA FUENTE DE FOLATO EN EL MARCAJE DEL NADPH .....</i>	47

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura del tetrahidrofolato.....	1
Figura 2: Fuentes de folato asimiladas por las células y rutas de conversión a la forma activa THF. ....	2
Figura 3: Ciclo completo del metabolismo del folato. ....	3
Figura 4: Ciclo de la metionina. ....	5
Figura 5: Estructura y reacción de interconversión entre el NADP <sup>+</sup> y el NADPH. ....	5
Figura 6: Heatmap de variación en la expresión de genes involucrados en el metabolismo de la serina, glicina y folatos en linfocitos T CD8 <sup>+</sup> de ratón. ....	6
Figura 7: Flujo de trabajo de un experimento de metabolómica basado en análisis por cromatografía y espectrometría de masas. ....	7
Figura 8: Ajuste de resolución para provocar solapamiento entre picos por abundancia natural de isótopos.....	8
Figura 9: Trazadores de interés en el estudio del metabolismo de la serina y el folato, así como las rutas bioquímicas más importantes. ....	9
Figura 10: Proliferación celular en función del medio de cultivo en tratamiento control. ....	21
Figura 11: Variación de los metabolitos de interés en las distintas condiciones de cultivo a las 6 horas en base a los niveles del medio RPMI_Fol.....	21
Figura 12: Variación de los metabolitos de interés en las distintas condiciones de cultivo entre las 24 y las 6 horas iniciales.....	22
Figura 13: Ruta de biosíntesis de purinas y fuentes de carbono. ....	23
Figura 14: Heatmaps por fold change respecto a la condición RPMI_Fol_6h para las muestras control de los intermediarios y metabolitos de mayor interés en la ruta de biosíntesis de purinas y Marcaje de ATP y GTP respecto a las distintas condiciones en muestras control. ....	24
Figura 15: Heatmaps por <i>fold change</i> respecto a la condición RPMI_Fol_24h para las muestras control de los intermediarios y metabolitos de mayor interés en la ruta de biosíntesis de purinas y Marcaje de ATP y GTP respecto a las distintas condiciones en muestras control. ....	26
Figura 16: Marcaje y origen de la serina celular a 6 y 24 horas en muestras control. ....	28
Figura 17: Marcaje y origen de la glicina celular a 6 y 24 horas en muestras control.....	29
Figura 18: Heatmaps por <i>fold change</i> de las muestras tratadas con SHIN2 respecto a sus muestras control de los intermediarios y metabolitos de mayor interés en la ruta de biosíntesis de purinas a 6 y 24 horas. ....	30
Figura 19: Heatmaps por <i>fold change</i> de las muestras tratadas con MTX respecto a sus muestras control de los intermediarios y metabolitos de mayor interés en la ruta de biosíntesis de purinas a 6 y 24 horas. ....	31
Figura 20: Marcaje de ATP en base al trazador U- <sup>13</sup> C-Serina para todas las muestras tras 6 y 24 horas desde el inicio de los tratamientos.....	32
Figura 21: Origen de serina celular para todas las muestras en distintas condiciones y tiempos. ....	33
Figura 22: Origen de glicina celular para todas las muestras en distintas condiciones y tiempos.....	34
Figura 23: Marcaje NADP <sup>+</sup> y NADPH con <sup>2</sup> H <sub>2</sub> O y <sup>2</sup> H <sub>1</sub> -glucosa como trazadores. ....	35



## ÍNDICE DE TABLAS Y TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla 1: Composición de los medios de cultivo utilizados .....	14
Tabla 2: Masa atómica, abundancia relativa y diferencia de masa de los isótopos de hidrógeno y carbono .....	18
Tabla 3: Proporción de NADPH marcado en los distintos medios para cada trazador. ....	36
Tabla suplementaria 1: Resultados Two-Way ANOVA sobre las fuentes de serina para todas las muestras control a las 6 horas. ....	41
Tabla suplementaria 2: Resultados Two-Way ANOVA sobre las fuentes de serina para todas las muestras control a las 24 horas. ....	41
Tabla suplementaria 3: Resultados Two-Way ANOVA sobre las fuentes de glicina para todas las muestras control a las 6 horas. ....	42
Tabla suplementaria 4: Resultados Two-Way ANOVA sobre las fuentes de glicina para todas las muestras control a las 24 horas. ....	42
Tabla suplementaria 5: Resultados t test para condiciones RPMI_Fol_6h (serina) .....	43
Tabla suplementaria 6: Resultados t test para condiciones RPMI_MeTHF_6h (serina) .....	43
Tabla suplementaria 7: Resultados t test para condiciones HPLM_Fol_6h (serina) .....	43
Tabla suplementaria 8: Resultados t test para condiciones HPLM_MeTHF_6h (serina) .....	43
Tabla suplementaria 9: Resultados t test para condiciones RPMI_Fol_24h (serina) .....	44
Tabla suplementaria 10: Resultados t test para condiciones RPMI_MeTHF_24h (serina) .....	44
Tabla suplementaria 11: Resultados t test para condiciones HPLM_Fol_24h (serina) .....	44
Tabla suplementaria 12: Resultados t test para condiciones HPLM_MeTHF_24h (serina).....	44
Tabla suplementaria 13: Resultados t test para condiciones RPMI_Fol_6h (glicina).....	45
Tabla suplementaria 14: Resultados t test para condiciones RPMI_MeTHF_6h (glicina) .....	45
Tabla suplementaria 15: Resultados t test para condiciones HPLM_Fol_6h (glicina).....	45
Tabla suplementaria 16: Resultados t test para condiciones HPLM_MeTHF_6h (glicina) .....	45
Tabla suplementaria 17: Resultados t test para condiciones RPMI_Fol_24h (glicina).....	46
Tabla suplementaria 18: Resultados t test para condiciones RPMI_MeTHF_24h (glicina) .....	46
Tabla suplementaria 19: Resultados t test para condiciones HPLM_Fol_24h (glicina).....	46
Tabla suplementaria 20: Resultados t test para condiciones HPLM_MeTHF_24h (glicina) .....	46
Tabla suplementaria 21: Resultados Two-Way ANOVA sobre el marcaje del NADPH a causa de la enzima G6PDH .....	47

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

1C: un carbono

10-fTHF: 10-formiltetrahidrofolato

5-MeTHF: 5-metil-tetrahidrofolato

5,10-MeTHF: 5,10-metilentetrahidrofolato

AICAR: ribonucleótido de 5-aminoimidazol-4-carboxamida

ALDHL1: 10-formiltetrahidrofolato deshidrogenasa 1

ALDHL2: 10-formiltetrahidrofolato deshidrogenasa 2

ATP: adenosín trifosfato

BSA: albúmina de suero bovino

CD8: cúmulo de diferenciación 8

DHFR: dihidrofolato reductasa

dTMP: timidina monofosfato

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

FBS: suero bovino fetal

Fol: ácido fólico

FR $\alpha$ : receptor de folatos alpha

GAR: ribonucleótido de glicenamida

GC-MS: Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas

GSH: glutatión reducido

GTP: guanosín trifosfato

HILIC: cromatografía de interacción hidrofílica

IDH: isocitrato deshidrogenasa

IGly: importación de glicina

IMP: inosina monofosfato

ISer: importación de serina

LC-MS: Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas

m/z: relación masa/carga

MACS: Separación Magnética por Columnas de Anexina V

ME: enzima mítica

MTHFD1: C-1-tetrahidrofolato sintasa

MTHFD2L metilentetrahidrofolato deshidrogenasa 2

MTR: metionina sintasa

MTRR: metionina sintasa reductasa

N: síntesis de novo de serina

NAD(H): dinucleótido de nicotinamida y adenina

NADP(H): dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato

oxPPP: ruta de oxidación de las pentosas fosfato

PBS: tampón fosfato salino

PRPP: fosforribosilpirofosfato

R: Síntesis de serina por actividad SHMT reversa

R5P: ribosa-5-fosfato

RBC: glóbulos rojos

RFC1: transportador de folato reducido

RMN: resonancia magnética nuclear

RT: tiempo de retención

SAM: S-adenosil metionina

SHMT1: serina hidroximetiltransferasa 1

SHMT2: serina hidroximetiltransferasa 2

Sotros: Otras vías para la síntesis de glicina

TCR: receptor de linfocitos T

THF: tetrahidrofolato

TYMS: timidilato sintasa

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. METABOLISMO DEL FOLATO

El folato es un cofactor esencial en el metabolismo celular ya que actúa como intermediario en las reacciones en las que intervienen las unidades de un carbono (1C), esenciales para la síntesis de novo de nucleótidos y para las reacciones de metilación mediadas por el cofactor SAM. Consta de dos módulos distintos: el ciclo de folato-serina-1C y el ciclo de la metionina/transmetilación (Locasale, 2013; Sanderson et al., 2019). En el ciclo de folato-serina-1C, el folato actúa como aceptor de unidades de 1C de múltiples moléculas (serina, glicina, formilkinurenina, etc.) y las cede para la biosíntesis de nucleótidos. En el ciclo de la transmetilación, la metionina es convertida en S-adenosil metionina (SAM) que actúa como donante universal para las reacciones de metilación, que juegan un papel clave en la síntesis de fosfolípidos, en la regulación epigenética y en las modificaciones post-traduccionales de las proteínas (Sanderson et al., 2019). La reacción confluyente entre estos 2 ciclos consiste en la desmetilación de 5-MeTHF para recuperar el aceptor THF, en presencia de homocisteína y vitamina B12 (cobalamina) para sintetizar metionina. El NADPH es asimismo un factor clave en el metabolismo del folato ya que por un lado es esencial para la regeneración del folato y por otro lado puede ser un producto del metabolismo de 1C. Por todo ello, la importancia del metabolismo del folato es innegable al intervenir en procesos de biosíntesis esenciales y ha resultado de interés en campos como la oncología o la biología del desarrollo entre otros (Czeizel et al., 2013; Ducker & Rabinowitz, 2017; Newman & Maddocks, 2017).

#### 1.1.1. Estructura y actividad de las especies de folato

Folato es el término genérico para una familia de vitaminas hidrosolubles del complejo B. A diferencia de bacterias, levaduras o plantas, los animales son incapaces de sintetizar esta vitamina de manera que necesitan adquirirla mediante la dieta. Todas ellas comparten una estructura conjunta con 3 regiones químicamente diferenciables (Figura 1): un anillo de pteridina que se puede encontrar en forma oxidada o reducida, un ácido para-aminobenzoico y una cadena de glutamato variable en longitud. El anillo de pteridina y el ácido para-aminobenzoico son los capacitados y encargados de unir unidades 1C que van a permitir que las distintas moléculas de la familia de folatos se comporten como dadores o aceptores de estas (Ducker & Rabinowitz, 2017; Moll & Davis, 2017).

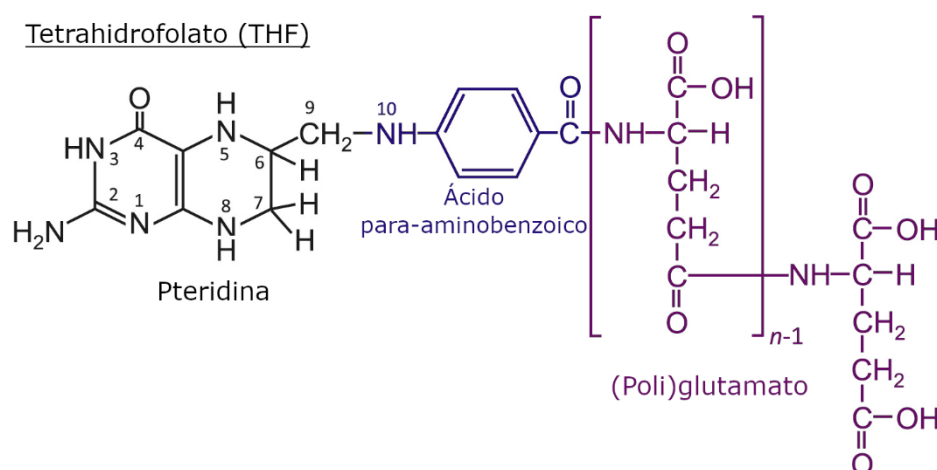


Figura 1: **Estructura del tetrahidrofolato.** Se observa el anillo de pteridina (negro), el ácido para-aminobenzoico (azul) y la cadena de glutamato (morado), partes comunes a todas las especies de folatos

La especie biológicamente activa, representada en la Figura 1, es el tetrahidrofolato (THF), cuya estructura presenta la reducción completa del anillo de pteridina. Sin embargo, la especie más habitual en la dieta y en circulación es el 5-metil-tetrahidrofolato (5-MeTHF), caracterizado por la metilación en el carbono 5 del anillo de pteridina. Esta especie es más estable y sencilla de transportar en sangre (Scaglione & Panzavolta, 2014). Otra especie importante es el ácido fólico (Fol) o vitamina B9, que no es más que una especie sintética de folato caracterizada por su oxidación en el anillo de pteridina. Esta especie se emplea como aditivo alimentario y debe ser doblemente reducida hasta tetrahidrofolato para ser biológicamente activa (Czeizel et al., 2013). Además de estas, existen otras formas del THF caracterizadas por portar unidades de 1C entre las que se incluyen 5,10-metilentetrahidrofolato, 5-formiltetrahidrofolato o 10-formiltetrahidrofolato, entre otros (Ducker & Rabinowitz, 2017).

### 1.1.2. Asimilación y activación del folato

El ciclo del folato se inicia con la captación celular de las especies presentes en el medio y su posterior conversión hasta obtener como resultado la especie biológicamente activa, THF, aceptor de unidades de carbono.

Los receptores y transportadores que intervienen en su incorporación a la célula presentan distinta afinidad por las especies en función de su estado de oxidación. Los mejor caracterizados son el transportador de folato 1, (RFC1, codificado por Slc19a1), de baja afinidad y con preferencia por especies reducidas, el receptor de folato  $\alpha$  (FR $\alpha$ , codificado por FOLR1), de alta afinidad y con preferencia por especies oxidadas y el transportador de folato acoplado a protones (codificado por Slc46a1) (Figueiredo et al., 2010; Frigerio et al., 2019; Nawaz & Kipreos, 2022). La célula es capaz de internalizar dos especies distintas: por un lado, puede asimilar Fol, el cual debe ser reducido en 2 ocasiones por DHFR, una enzima reductasa dependiente de NADPH, hasta dar lugar al THF, o bien, puede asimilar 5-MeTHF que debe ser desmetilado mediante la metionina sintasa en presencia de homocisteína, para obtener THF y metionina.

Evidentemente, las dos vías posibles no son equivalentes y presentan unos requerimientos energéticos y moleculares distintos (Figura 2). El ácido fólico es la forma más habitual en preparados comerciales ya que se emplea como aditivo nutricional, sin embargo, el 5-MeTHF es el más común en la dieta y mayoritario en el sistema circulatorio.

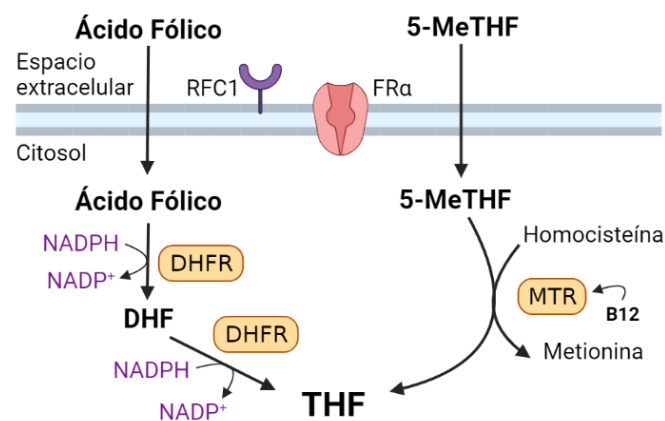


Figura 2: Fuentes de folato asimiladas por las células y rutas de conversión a la forma activa THF. Se representan las 2 especies de folato que pueden ser asimiladas por las células (ácido fólico y 5-MeTHF), los receptores más importantes en dicho proceso, así como las reacciones bioquímicas que deben ocurrir para dar lugar a la forma biológicamente activa y aceptor de unidades de carbono, THF.

Algunos estudios han hecho hincapié en la importancia de adecuar la experimentación a las condiciones que más se asemejan al ambiente fisiológico, tanto en concentración como en especie, con el objetivo de obtener resultados más acordes con la actividad en el organismo (Scaglione & Panzavolta, 2014; Sullivan et al., 2021). Las condiciones no fisiológicas in vitro pueden influir en estudios asociados a preferencias de rutas metabólicas, así como a la sensibilidad celular frente a ciertos fármacos y a la traslación de los estudios a modelos in vivo.

### 1.1.3. Metabolismo del folato-serina-1C

La serina es una de las principales fuentes de unidades de 1C para el metabolismo del folato y especialmente es así en células con alta tasa de proliferación (Geeraerts et al., 2021; Locasale, 2013; Pan et al., 2021).

El metabolismo de la serina presenta dos rutas análogas en la mitocondria y en el citosol. Mientras que en el citosol se encuentran las enzimas SHMT1 y MTHFD1, en la mitocondria se encuentran las enzimas SHMT2, MTHFD2 y MTHFD2L. Estas enzimas se caracterizan por presentar actividad reversible, de tal forma que las 2 rutas pueden actuar en ambas direcciones. La ruta predominante va a depender de la concentración de folatos y de los ratios NAD/NADH y NADP/NADPH, de manera que cuando la concentración de folatos es alta, la ruta principal es la mitocondrial y la vía citosólica actúa en sentido reverso (García-Cañaveras et al., 2021) (Figura 3).

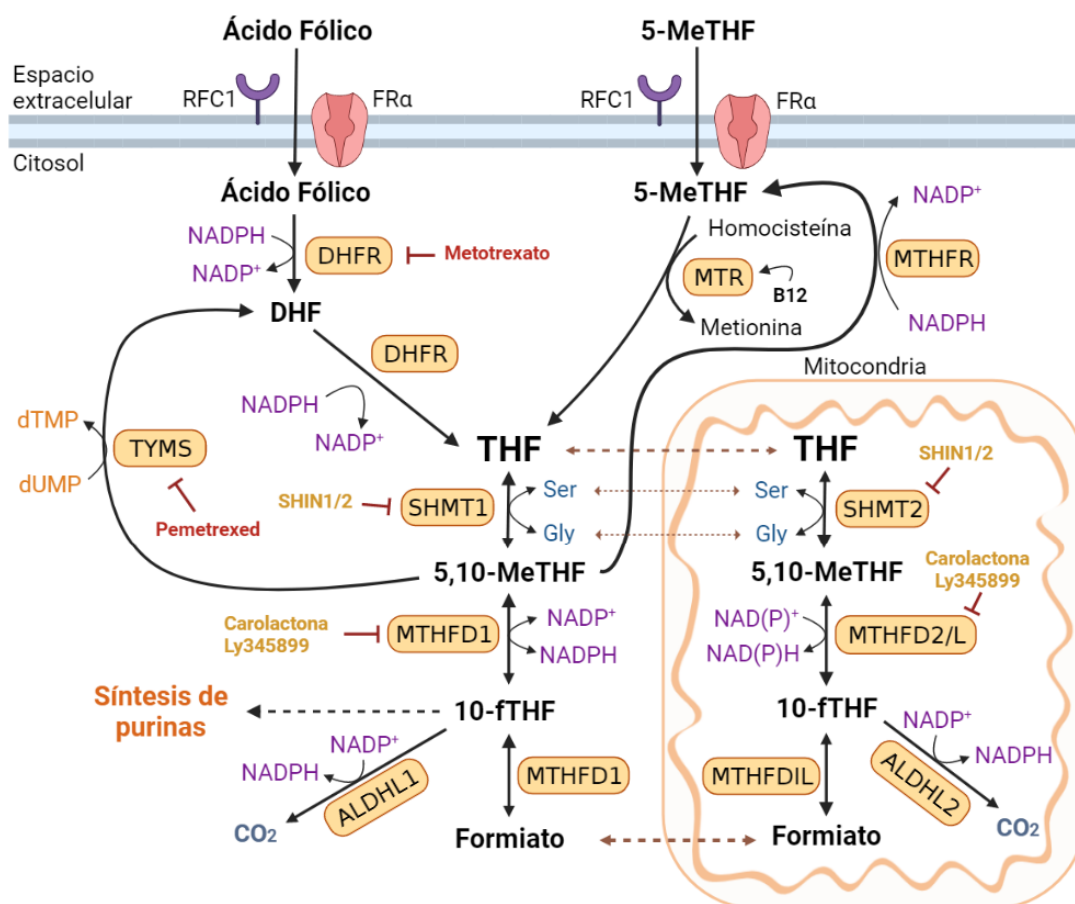


Figura 3: Ciclo completo del metabolismo del folato-serina-1C. Se representan todas las reacciones biosintéticas de mayor importancia en las que intervienen las especies de folato y serina. La vía THF → 10-fTHM se representa en el espacio citosólico y en el espacio mitocondrial. Las enzimas que participan se enmarcan en rectángulos amarillos. Además, algunos de los fármacos aprobados por las agencias regulatorias (rojo), así como algunos de los inhibidores enzimáticos más prometedores en fases preclínicas (amarillo).

El primer paso de la ruta, catalizado por las enzimas SHMT1/2 es la conversión de la serina en glicina con la cesión de una unidad de 1C al THF para obtener el 5,10-MeTHF. Las múltiples enzimas y transportadores implicados en el ciclo de la serina/folato/1C se encargan de la interconversión de las múltiples especies disponibles de unidades de 1C asociadas a folato, así como de conectar las rutas citosólica y mitocondrial (Figura 3). Los principales productos del metabolismo de la serina asociado a folatos son el 5,10-metilentetrahidrofolato (5,10-MeTHF), esencial para la síntesis de dTMP mediada por la actividad de la enzima timidilato sintasa (TYMS), y el 10-formiltetrahidrofolato (10-fTHF), esencial en distintos pasos del metabolismo de biosíntesis de purinas (Figura 3). Además de las especies útiles de 1C, la glicina es otro de los productos finales de la ruta. La glicina no solamente es necesaria para la síntesis de proteínas, sino que interviene en la síntesis de purinas y de glutatión (GSH,  $\gamma$ -glutamil-cisteinil-glicina).

Debido a su papel clave en la síntesis de nucleótidos, necesarios para la proliferación celular, múltiples enzimas del ciclo son dianas de fármacos utilizados en oncología, enfermedades autoinmunes y en inmunoterapia entre otros, ya que se encuentran sobreexpresadas (Ducker & Rabinowitz, 2017; García-Cañaveras et al., 2021). Algunos de ellos están aprobados por las agencias regulatorias y en uso, como es el caso del metotrexato (MTX) (Chan & Cronstein, 2010), inhibidor de la enzima DHFR o el pemetrexed (Chattopadhyay et al., 2007), inhibidor de DHFR y TYMS, siendo además compatibles con inmunoterapia. Además, en los últimos años, otras enzimas implicadas están resultando de interés como es el caso de SHMT o MTHFD. Estas últimas ya cuentan con inhibidores en fases preclínicas (Cuthbertson et al., 2021; García-Cañaveras et al., 2021).

#### 1.1.4. Ciclo de la metionina

El ciclo de la metionina es otra parte importante del metabolismo de 1 carbono. Una de sus actividades más importantes se asocia a los procesos de metilación de biomoléculas gracias a la especie SAM, que es capaz de donar un grupo metilo en presencia de enzimas metil-transferasas, permitiendo la correcta regulación epigenética (Figura 4) (Sanderson et al., 2019). Además, mediante la vía de la transulfuración, también juega un papel esencial en el control redox de la célula, siendo esencial para la síntesis de GSH (Pan et al., 2021).

La actividad de la enzima metionina sintasa (MTR) es la parte esencial de esta ruta metabólica. Se encarga de convertir homocisteína y 5-MeTHF en metionina y THF, en presencia de vitamina B12 (cofactor). Si bien se pensaba que su principal función era la síntesis de metionina, se ha observado in vivo, cómo su función más importante no es otra que contribuir en la obtención de THF cuando la fuente de folato es 5-MeTHF (Ghergurovich et al., 2021; Sullivan et al., 2021). MTR es la única enzima descrita que de forma eficiente metaboliza el 5-MeTHF para regenerar el pool de THF.

Las alteraciones asociadas a esta enzima o a la metionina sintasa reductasa (MTRR), encargada de mantener la vitamina B12 asociada a la MTR reducida, provocan una acumulación de 5-MeTHF que no puede ser metabolizado a THF bloqueando el metabolismo de 1C. Letalidad neonatal y malformaciones en el tubo neural son algunas de las consecuencias asociadas (Ducker & Rabinowitz, 2017; Frigerio et al., 2019). De forma preventiva, se recomienda suplementar con ácido fólico la dieta durante el embarazo para evitar las consecuencias asociadas a alteraciones en esa ruta (Lassi et al., 2013).

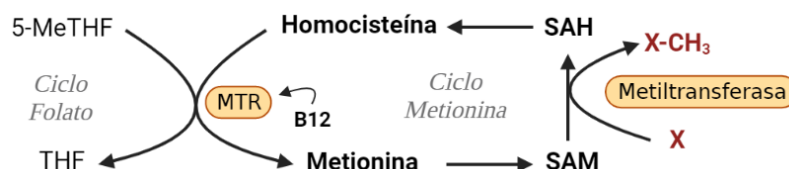


Figura 4: **Ciclo de la metionina.** Asociado al ciclo del folato ocurre la biosíntesis de THF, especie activa capaz de captar unidades de carbono que serán empleadas en otras rutas de biosíntesis y de forma independiente, ocurre la transferencia de metilos mediante metiltransferasas para inducir cambios epigenéticos.

## 1.2. METABOLISMO DEL NADPH

El NADPH es el principal cofactor que proporciona poder reductor a nivel celular. Es esencial en la biosíntesis de aminoácidos, desoxirribonucleótidos, ácidos grasos, así como en la regeneración del THF y en el control del estado redox de la célula mediante el mantenimiento de un correcto balance entre GSH y GSSG (Zhang et al., 2017).

Existen múltiples rutas capaces de proporcionar los electrones necesarios para llevar a cabo la reducción del NADP a NADPH (ej. actividad de la enzima málica (ME) o de la isocitrato deshidrogenasa (IDH)) (Figura 5). No obstante, una de las principales vías en células con alta tasa de proliferación es la oxidación de las pentosas fosfato (oxPPP), que no solamente proporciona 2 moléculas de NADPH por cada moléculas de glucosa, sino que además proporciona la ribosa/desoxirribosa necesaria para la posterior síntesis de nucleótidos.

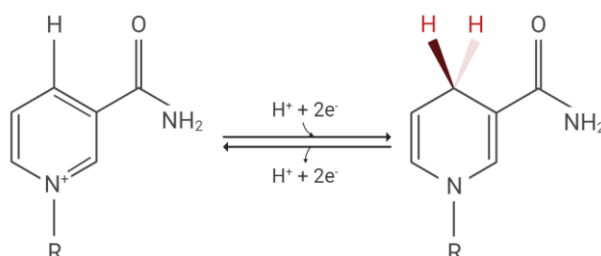


Figura 5: **Estructura y reacción de interconversión entre el NADP<sup>+</sup> (izquierda) y el NADPH (derecha).**

El metabolismo de serina-folato-1C es principalmente un consumidor de NADPH, al reducir el ácido fólico desde la dieta o tras la actividad de la enzima TYMS (Figura 3), sin embargo, en determinados contextos también puedes sintetizarlo. Si bien las enzima MTHFD1/MTHFD2L, pueden producir NADPH al oxidar 5,10-MeTHF en 10-fTHF, la principal reacción de producción de NADPH dentro del ciclo del folato/1C esta catalizada por las enzimas ALDHL1/2 que oxidan el 10-fTHF para dar THF y CO<sub>2</sub>.

## 1.3. LINFOCITOS T CD8+ EFECTORES Y METABOLISMO DE 1 CARBONO

Los linfocitos T conforman un amplio grupo celular perteneciente al sistema inmune adaptativo y cuya principal función es responder frente a la presencia de antígenos anómalos en el organismo bien sean de origen propio (debido a mutaciones) o debido a patógenos. Se originan en los órganos linfoides primarios y su maduración se completa en el timo donde son liberados en su forma naive. En respuesta a señales antígeno-específicas reconocidas por el receptor de célula T (TCR), junto a estimulación de coactivación, los linfocitos T naive se activan, transformándose en linfocitos T efectores.

Esta activación conlleva una expansión del linfocito T activado por lo que se produce una reprogramación metabólica que permite mantener la demanda proliferativa, los requisitos en la síntesis de citocinas, así como los requerimientos asociados a la respuesta celular que deben ofrecer.



Dentro de esta reprogramación destaca el aumento del metabolismo de 1 carbono, donde aumenta la expresión de la mayoría de las enzimas que intervienen en la biosíntesis de serina, así como en el propio metabolismo del folato y de las unidades de carbono (Figura 6). Tras la reprogramación se produce una primera fase de expansión que incrementa el pool de células T CD8+ efectoras, sin embargo, la respuesta inmunitaria adaptativa debe cesar y por ello a partir de las 72 horas comienza a decaer la expresión de las enzimas asociadas al metabolismo proliferativo, dando lugar a nuevos fenotipos como las efectoras tardías o las de memoria.

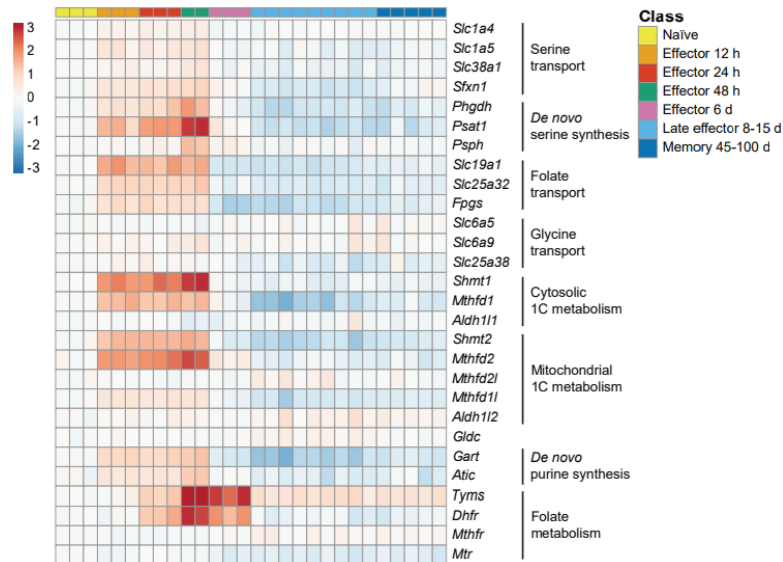


Figura 6: Heatmap de variación en la expresión de genes involucrados en el metabolismo de la serina, glicina y folatos en linfocitos T CD8+ de ratón. Se representa la variación genética con respecto a las células naïve, de linfocitos efectoras tempranos (0.5, 1, 2 y 6 días), tardíos (8-15 días) y de memoria (45 y 100 días). (Datos extraídos de ImmGEN datasets).

La inhibición del metabolismo serina-folato-1C influye en la respuesta inmunitaria. Por un lado, puede limitar la proliferación, y por tanto es una diana de interés en enfermedades autoinmunes, y por otro, cuando se hace de forma limitada en el tiempo, puede conllevar un aumento en la capacidad de respuesta efectora (García-Cañaveras et al., 2021; Ma et al., 2017).

## 1.4. ESTRATEGIAS DE INTERÉS PARA EL ESTUDIO DEL METABOLISMO DEL FOLATO

### 1.4.1. Metabolómica

La metabolómica consiste en el estudio de los procesos bioquímicos en los que intervienen los metabolitos dentro de un sistema biológico y su medida cualitativa y/o cuantitativa con el objetivo de adquirir una amplia visión del estado bioquímico de dicho organismo.

Para trabajar con metabolómica el flujo de trabajo siempre va a dar comienzo en el paso más esencial en ciencia, definir la hipótesis de trabajo y las cuestiones que se desean resolver. Una vez comprendida la hipótesis se debe definir la muestra más adecuada, así como seleccionar la plataforma de estudio más adecuada (RMN, LC-MS, GC-MS, MS-MS) para resolver las cuestiones asociadas a la hipótesis planteada. La plataforma seleccionada condicionará en gran medida el procesamiento de las muestras ya que se requieren protocolos específicos en función del equipo y del tipo de muestra, por lo que será esencial comprender cómo se debe preparar la muestra para que el análisis sea satisfactorio. Finalmente, se realiza el análisis de las muestras y se evalúan los datos obtenidos tratando de correlacionar los resultados con las cuestiones planteadas con el objetivo final de obtener conclusiones con implicaciones biológicas (Figura 7).

La metabolómica presenta diversas aproximaciones, asociados a la identificación y cuantificación de metabolitos concretos, a la detección de biomarcadores concretos o a la valoración de alteraciones en los flujos metabólicos de rutas biológicas entre otros (Jang et al., 2018; Zhou et al., 2012).

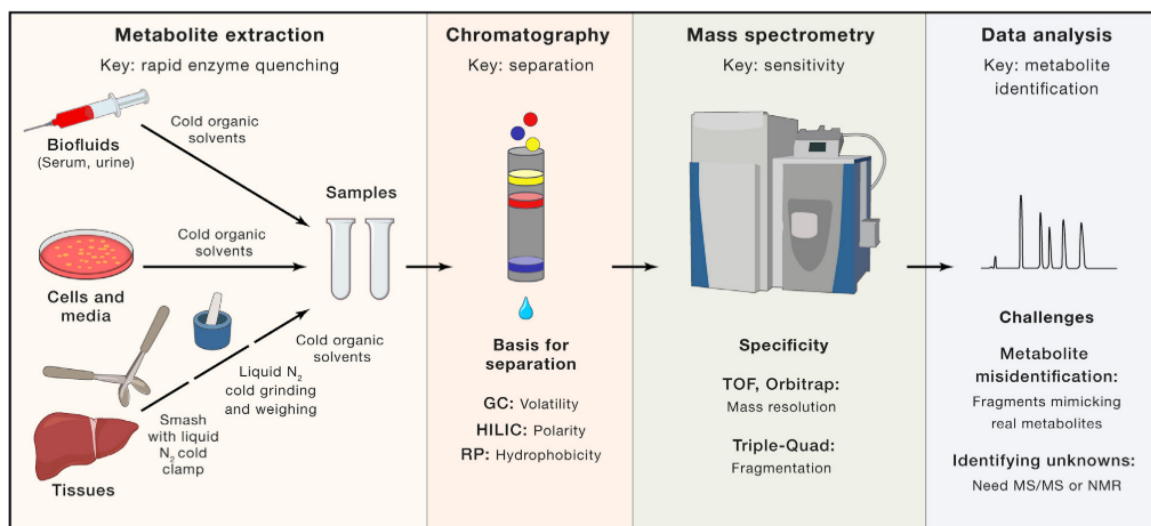


Figura 7: Flujo de trabajo de un experimento de metabolómica basado en análisis por cromatografía y espectrometría de masas. (Jang et al., 2018)

#### 1.4.2. Cromatografía líquida y espectrometría de masas como técnicas de análisis

La cromatografía líquida junto a la espectrometría de masas (LC-MS) representa una de las mejores técnicas analíticas para estudiar el metaboloma de los sistemas biológicos (Roca et al., 2021). Al emplear esta técnica de análisis ortogonal se consigue en primer lugar separar los metabolitos en base a sus características fisicoquímicas para posteriormente hacerlo en base a su relación masa-carga ( $m/z$ ). Además, mediante el uso de MS/MS se puede obtener información estructural de los metabolitos de interés. Si bien la identificación inequívoca de un metabolito requiere del uso de estándares químicos, la identificación en base a la información proporcionada por la combinación de RT, MS y MS/MS suele ser suficiente en la mayoría de los casos. En comparación con la resonancia magnética de protón (RMN), LC-MS proporciona una mayor resolución, un incremento de la sensibilidad y mejores resultados al analizar mezclas altamente complejas (Zhou et al., 2012).

Para la realización de este proyecto se ha utilizado un “Q Exactive™ Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ Mass Spectrometer” (ThermoFisher) que se caracteriza por una elevada resolución (140k), un bajo error de masa (<2ppm), la capacidad de acumular iones en un determinado rango de interés y la capacidad de hacer experimentos en MS/MS (Su et al., 2017; Zhou et al., 2012). Sin embargo, una elevada resolución no siempre va a permitir discernir picos cuya diferencia  $m/z$  sea muy baja. Un claro ejemplo de esto sucede al emplear el  $^2\text{H}$  como trazador. Cuando se da esta situación el pico M+1 se encuentra definido por 2 picos. Por un lado, el pico provocado por el trazador  $^2\text{H}$  y por otro la fracción perteneciente al  $^{13}\text{C}$  presente de forma natural. En estas situaciones suele ser más conveniente reducir la resolución con el objetivo de que ambos picos solapen y corregir posteriormente teniendo en cuenta la abundancia natural del  $^{13}\text{C}$  (Su et al., 2017) (Figura 8).

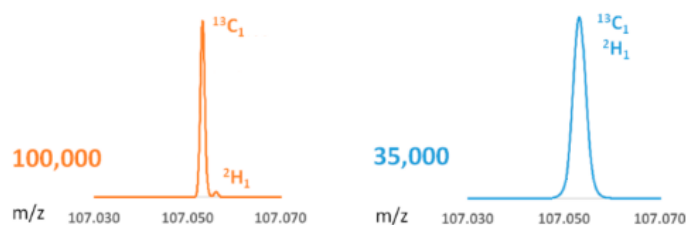


Figura 8: Ajuste de resolución para provocar solapamiento entre picos por abundancia natural de isótopos (Su et al., 2017)

En cuanto a la parte cromatográfica, existen distintas estrategias de separación, como fase reversa o fase normal. Sin embargo, la que mejores resultados genera para el análisis de metabolitos polares es la cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC), cuya principal característica es el uso de fases estacionarias con elevada capacidad para adsorber el agua u otro disolvente polar. En esta estrategia es esencial el uso de gradientes, partiendo habitualmente de una elevada proporción del disolvente apolar u orgánico (Roca et al., 2021).

### 1.4.3. Uso de trazadores en metabolómica

La medición de la concentración de los metabolitos en un sistema biológico puede resultar de importancia en algunos casos, sin embargo, puede no llegar a ser suficiente. Comprender las rutas metabólicas que están siendo fuente u origen de los metabolitos cuantificados resulta frecuentemente tan importante como la propia cuantificación ya que, en ciertos ámbitos, como por ejemplo la oncología, permite evaluar qué rutas se encuentran alteradas y de qué forma la célula tumoral genera resistencias frente a la aplicación de fármacos (Jang et al., 2018).

Un ejemplo más sencillo, que permite comprender definitivamente la importancia del uso de trazadores, consiste en retirar la glucosa del medio de cultivo de una levadura. Tras esto, es comprensible esperar que la glicólisis disminuya, por lo que la concentración de los intermediarios de esta también debería hacerlo. Sin embargo, es posible observar cómo ciertos intermediarios aumentan su concentración. En este caso, el uso de trazadores sobre hipotéticas fuentes del intermediario en cuestión, permiten inferir cual es la influencia del resto de fuentes (Jang et al., 2018).

El uso de trazadores en metabolómica permite encontrar soluciones a distintos retos, ya que la información que se recoge no es una imagen estática de lo que está sucediendo en la célula. El análisis del origen y destino de los metabolitos junto a su variación de concentración permite evaluar los flujos metabólicos y comprobar qué rutas tienen un mayor peso en distintos contextos (Jang et al., 2018). Además, el marcaje obtenido en base a experimentos con trazadores supone una información adicional que ayuda en la identificación de metabolitos mediante técnicas alternativas al uso de estándares o a la proporcionada por MS/MS.

#### 1.4.3.1. Trazadores en el estudio del metabolismo de 1 carbono

Una de las herramientas más empleada en el estudio del metabolismo de 1C es el isótopo del carbono  $^{13}\text{C}$ . Este isótopo se emplea en los metabolitos que actúan como fuentes para el metabolismo de 1C, como es el caso de la glucosa ( $\text{U-}^{13}\text{C}$ -Glucosa), la serina ( $\text{U-}^{13}\text{C}$ -Serina) o la glicina ( $\text{U-}^{13}\text{C}$ -Glicina).

La serina puede ser importada del medio extracelular o sintetizada de novo en la célula a partir de glucosa. Del mismo modo la glicina puede ser importada o sintetizada a partir de serina a través de la reacción catalizada por la enzima SHMT1/2.

Mediante el uso individualizado de los distintos trazadores, se puede evaluar la importancia de cada fuente de serina y glicina, así como la contribución relativa de cada una de dichas fuentes en la obtención de unidades de carbono marcadas (Figura 9).

Si se realiza un experimento con U-<sup>13</sup>C-Glucosa, la serina puede presentar en su relación de masa M+0, M+1, M+2 o M+3. Por un lado, la serina sin marcar propia del medio de cultivo se incorporaría a la célula. Además, mediante la ruta de transformación del 3PG en serina, es posible encontrar serina totalmente marcada (M+3). De forma complementaria, la actividad SHMT puede dar lugar a glicina y a 5,10-MeTHF, de tal forma que, dependiendo del marcaje de la serina empleada como sustrato, los productos estarán tanto uniformemente marcados como sin marca alguna. La actividad SHMT es reversible y por lo tanto a partir de glicina y 5,10-MeTHF es posible sintetizar serina. En este caso, si los sustratos están sin marcar, se obtendrá serina sin marcar (M), mientras que, si ambos sustratos se encuentran marcados, se obtendrá serina uniformemente marcada (M+3). Sin embargo, también es posible que los sustratos sean glicina marcada y 5,10-MeTHF sin marcar o viceversa, obteniendo de esta forma serina M+2 o M+1 respectivamente.

Pese a que U-<sup>13</sup>C-Glucosa y U-<sup>13</sup>C-Serina nos dan información acerca de las unidades de un carbono que provienen de serina y por tanto de la actividad directa SHMT, una fuente alternativa de unidades de un carbono podría ser la glicina, mediante la enzima glicina deshidrogenasa (GDLC). La actividad GDLC metaboliza glicina para dar lugar a CO<sub>2</sub> y una unidad de carbono que es captada por el THF para formar 5,10-MeTHF (Figura 9). La evaluación de esta fuente concreta requiere del uso de U-<sup>13</sup>C-Glicina como trazador ya que en el caso del resto de trazadores no podríamos discriminar las unidades de 1C directamente procedentes de serina mediante la actividad SHMT de las procedentes de la actividad GDLC que usen como sustrato glicina marcada procedente de serina marcada. De esta forma en función de los resultados del marcaje es posible evaluar la importancia de cada vía asociada al metabolismo de la serina y folatos (Figura 9).

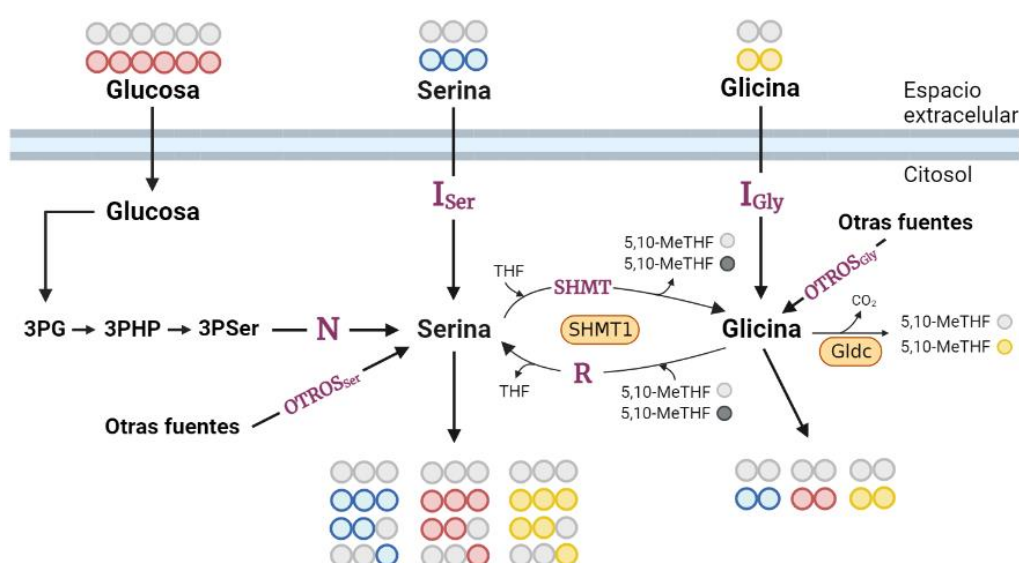


Figura 9: Trazadores de interés en el estudio del metabolismo de la serina y el folato, así como las rutas bioquímicas más importantes. Las posibilidades de marcaje se presentan en función del trazador utilizado, que será único en cada experimento. En rojo <sup>13</sup>C en glucosa, en azul <sup>13</sup>C en serina, en amarillo <sup>13</sup>C en glicina y en gris oscuro se presenta el 5,10-MeTHF portando <sup>13</sup>C de uno de los trazadores empleados.

### 1.4.3.2. Trazadores en el estudio del metabolismo del NADPH

La síntesis de NADPH a partir de NADP requiere de dos e<sup>-</sup> y un H<sup>+</sup>. Puesto que ambos se transfieren simultáneamente del mismo sustrato, el estudio de las fuentes de poder reductor para la síntesis de NADPH se realiza mediante el uso de trazadores que contengan <sup>2</sup>H en las posiciones concretas a transferir al NADP<sup>+</sup>. Debido a la importancia de la oxPPP, los trazadores más habitualmente utilizados son la <sup>2</sup>H<sub>1</sub>-Glucosa y <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-Glucosa.

Sin embargo, existe un inconveniente a la hora de emplear <sup>2</sup>H como trazador para NADPH y es el hecho de que en la célula se produce un intercambio entre <sup>1</sup>H y <sup>2</sup>H mediado por ciertas enzimas, provocando que el marcaje obtenido sea consistentemente menor que el esperado. Realizar una corrección en base al intercambio <sup>1</sup>H-<sup>2</sup>H para cada célula es esencial para ser capaces de valorar de forma efectiva la proporción de NADPH que se sintetiza desde las distintas vías posibles.

La mejor estrategia planteada para solventar este problema consiste en emplear agua deuterada (<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O) como trazador, de forma paralela al trazador deseado. De esta forma, si no se produjera ningún tipo de intercambio, sería esperable observar como el NADPH no se encuentra marcado. Sin embargo, la detección de NADPH marcado, permite valorar el rendimiento del intercambio <sup>1</sup>H-<sup>2</sup>H, para posteriormente tenerlo en cuenta en el experimento con el trazador de interés.

## 2. OBJETIVOS

El metabolismo del folato-serina-1C es esencial en tipos celulares con elevada proliferación como es el caso de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Sin embargo, la mayoría de los estudios in vitro con células tumorales o con células sanas con alta proliferación no tienen en cuenta que los medios de cultivo empleados no se ajustan a las condiciones fisiológicas, pudiendo condicionar en gran medida los resultados obtenidos.

El objetivo principal de este proyecto es evaluar la importancia de adecuar las condiciones del medio de cultivo a condiciones fisiológicas para facilitar y optimizar el posterior traslado a modelos in vivo de estudios asociados a preferencias de rutas metabólicas o a sensibilidad celular frente a ciertos fármacos. Para valorar la hipótesis planteada los aspectos a valorar son:

- 1) Comparar la proliferación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en distintas condiciones de cultivo caracterizadas por una mayor o menor aproximación a las condiciones fisiológicas.
- 2) Correlacionar las distintas condiciones de cultivo con las fuentes de serina y glicina que emplean los linfocitos T CD8<sup>+</sup>
- 3) Estudiar el efecto asociado a la proliferación y biosíntesis de purinas de linfocitos T CD8<sup>+</sup> del uso de inhibidores del metabolismo del folato-serina-1C
- 4) Analizar la correlación entre el uso de inhibidores del metabolismo del folato-serina-1C con las fuentes de serina y glicina que emplean los linfocitos T CD8<sup>+</sup>
- 5) Valorar el efecto del medio de cultivo y la fuente de folato sobre la síntesis de NADPH.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. AISLAMIENTO, ACTIVACIÓN Y CULTIVO DE LINFOCITOS T CD8+ DE RATÓN

##### 3.1.1. Aislamiento

Para la realización de este trabajo experimental, se utilizaron los linfocitos T CD8+ naive aislados del bazo de hembras de ratón, que fueron sacrificados por eutanasia por dislocación cervical de acuerdo con los protocolos aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia (*Protocol number 2020/VSC/PEA/0048*).

Los ratones C57BL/6 de 6 semanas de edad fueron obtenidos de los laboratorios *Charles River* y mantenidos en la plataforma de experimentación animal del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia. Los ratones se mantuvieron en un ciclo de luz normal (8:00-20:00) y disponían de acceso libre a dieta estándar y agua, hasta que fueron sacrificados a las 8 semanas de vida.

Tras el aislamiento quirúrgico de los bazos de ratón se procesaron mecánicamente sobre una malla de Nylon de 70  $\mu\text{m}$  para posteriormente recuperar la suspensión celular mediante tampón MACS (separación magnética por columnas de anexina v) (PBS, 2 mM EDTA, 0,5% BSA) y sobre un tubo falcon de 50 mL. Tras obtener la suspensión celular es necesario llevar a cabo un protocolo de aislamiento para linfocitos T naive CD8+, con el objetivo de purificar la suspensión celular y eliminar todos los tipos celulares no deseados. Para ello, se realizó una separación con *beads* magnéticas, empleando un kit comercial de selección negativa (naive CD8a+ T Cell Isolation Kit mouse, Milteny Biotec Inc.) y siguiendo las indicaciones del fabricante.

En primer lugar, se centrifuga la suspensión celular a 500 g, 4°C, durante 5 minutos para posteriormente aspirar el sobrenadante. Seguidamente se añaden 5 mL de tampón de lisis RBC (00-4300-54; Invitrogen) y se resuspende el pellet para, a continuación, incubar en hielo durante 5 minutos, este paso permite lisar los eritrocitos de una forma sencilla, eliminando la población más abundante sin recurrir a métodos complejos. A continuación, se añaden 25 mL de tampón MACS para inactivar el tampón de lisis RBC y volver a centrifugar en las mismas condiciones. Tras centrifugar se aspira el sobrenadante y se resuspende en 1 mL de tampón MACS y se añaden 120  $\mu\text{L}$  del mix de anticuerpos de monoclonales conjugados a biotina y se incuba durante 10 minutos. Tras este tiempo, se añaden 120  $\mu\text{L}$  de anticuerpos anti-CD44 conjugados a *microbeads* y 240  $\mu\text{L}$  de anticuerpos anti-biotina conjugados a *microbeads* y se incuba durante 5 minutos. De esta manera, se marcan todas las células residuales que serán retenidas en la posterior purificación en columna MACS. Tras esta última incubación se añaden 25 mL de MACS tampón para evitar el reconocimiento inespecífico y se centrifuga en las condiciones ya establecidas. El último paso previo a la purificación consiste en aspirar el medio y resuspender en 2 mL de tampón MACS.

Una vez las células han sido marcadas se preacondiciona la columna de tipo LS (130-042-401; Milteny Biotec) con 3 mL de tampón MACS, cabe recordar que este método es de selección negativa, de tal forma que la población celular de interés eluirá de forma directa mientras que el resto de las células marcadas quedarán retenidas en la columna. Una vez la columna está preacondicionada, se coloca un tubo de recuperación y se añade todo el contenido de la preparación (2 mL). Para facilitar la elución se añaden, en dos ocasiones, 4 mL de MACS tampón esperando recuperar un total de 10 mL.

Tras ello, resulta interesante eluir forzosamente el contenido restante de la columna, con el objetivo de recuperar la fracción celular retenida y valorar tras su centrifugación el precipitado como un primer parámetro de calidad de la purificación, teniendo en cuenta que aproximadamente los linfocitos T CD8+ naive representan un 10% de la suspensión celular (Miltenyi Biotec, Spleen (Mouse), s. f.)

A continuación, los tubos recuperados se centrifugan en las mismas condiciones ya establecidas en pasos previos. Es en este momento en el que mediante un análisis del pellet se puede valorar el éxito estimado del aislamiento, tras comprobarlo, se desecha el tubo con los tipos celulares no deseados. Del tubo de interés, se aspira el sobrenadante y se resuspende todo el contenido celular en 10 mL de medio de cultivo RPMI 1640 completo.

Finalmente, tras recuperar los linfocitos T CD8+ naive, se valora la concentración y la viabilidad empleando el dispositivo Countess system (Invitrogen). Para ello, se realiza una dilución 1:1 con trypan blue y se colocan 20  $\mu$ L en la cámara de recuento del portaobjetos. Este dispositivo, permite valorar la concentración, el tamaño, que debe ser en torno a 7  $\mu$ m y la viabilidad gracias a la tinción con trypan blue.

### 3.1.2. Activación

Tras comprobar que el aislamiento es satisfactorio se procede a realizar la siembra en placas de 12 pocillos. Dichas placas se deben preparar con al menos 12 horas de antelación, ya que deben ser sometidas a coating con 600  $\mu$ L de disolución de anti-CD3 (10  $\mu$ g/mL) y anti-CD28 (5  $\mu$ g/mL) conservadas a 4°C, previamente a realizar la siembra (Ghergurovich et al., 2020). Este recubrimiento permite estimular los correceptores del TCR induciendo la activación de los linfocitos T CD8+ naive.

En cada pocillo se deben añadir 2 mL de suspensión celular a una concentración inicial de  $1 \times 10^6$  células/mL. Tras 48 horas incubando las placas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en aire se debe valorar la activación de los linfocitos T CD8+ naive. Para ello, en primer lugar, se debe observar una acidificación del medio de cultivo, ya que el proceso de activación estimula la glicólisis y la producción de lactato es considerablemente mayor. Además, se recogen todas las células y se realiza un nuevo recuento con el dispositivo Countess system, donde se debe observar una viabilidad elevada, un aumento del tamaño medio de la población, en torno a 12  $\mu$ m, y un aumento de la concentración de aproximadamente el doble de lo sembrado.

### 3.1.3. Expansión

Una vez obtenida la cantidad total de células, se preparan tantas alícuotas como condiciones de cultivo se deseen evaluar, para a continuación, centrifugar a 500 g durante 5 minutos y aspirar el medio. Cada alícuota se debe ajustar a una concentración de  $8 \times 10^5$  células / mL con el medio de cultivo adecuado completo y suplementar con IL-2 (100 U/mL) para facilitar la expansión. Tras preparar cada alícuota se estima el frasco de cultivo adecuado para su siembra y expansión. Esto se puede realizar mediante una estimación por volumen o mediante valoración de la superficie necesaria según el número de células, como se indica en la ecuación 1:

$$\text{Superficie (cm}^2\text{)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ células}}{0.35} \quad (\text{ec. 1})$$

La expansión comienza a las 48 horas tras la activación y es conveniente ir valorando la concentración cada 24 horas para evitar que lleguen a una densidad elevada, donde el agotamiento de nutrientes puede provocar el cese de la fase proliferativa. Si la concentración es elevada, se añade el medio adecuado fresco, para recuperar la densidad inicial, y de ser necesario se ajusta el tamaño del recipiente de cultivo. El inicio del experimento con trazadores no debe exceder más allá del día 5 tras la activación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, de esta forma evitamos la aparición de un fenotipo no deseado.

#### 3.1.4. Siembra con trazadores

En el día 5, se recupera todo el contenido celular de cada condición y se realiza un nuevo recuento con el dispositivo Countess system. Una vez obtenida la cantidad total de células, se preparan tantas alícuotas como trazadores se vayan a utilizar, para a continuación, centrifugar a 500 g durante 5 minutos y aspirar el medio. Cada alícuota se debe ajustar a una concentración de  $1 \times 10^6$  células / mL con el medio completo adecuado para cada condición experimental, sustituyendo en cada caso el trazador deseado por su forma no marcada en el medio de cultivo. Finalmente, se siembra en placa de 24 pocillos 3 réplicas con 1 mL por pocillo para cada condición experimental. Las condiciones experimentales de este proyecto se presentan en el apartado de diseño experimental.

#### 3.1.5. Estimación del número de divisiones en cada medio de cultivo

Tras las 48 horas de activación en medio estándar RPMI suplementado con FBS, las células se comienzan a incubar en el medio de cultivo deseado. Un parámetro de interés en cada condición es el número de divisiones que experimentan las células en cada medio de cultivo, siendo posible valorar así la eficiencia del medio en la proliferación celular. Para ello es necesario realizar un seguimiento cada cierto tiempo, anotando la concentración y el volumen de células siendo de esta forma posible obtener el número de células totales y, estimar el número de divisiones respecto a las condiciones iniciales mediante la siguiente ecuación (ecuación 2):

$$n^{\circ} \text{ divisiones} = \log_2 \left( \frac{n^{\circ} \text{ células}_{(t)}}{n^{\circ} \text{ células}_{(t_0)}} \right) \quad (\text{ec. 2})$$

### 3.2. MEDIOS DE CULTIVO

#### 3.2.1. Composición de los medios de cultivo utilizados

Para el desarrollo experimental se emplearon 4 medios de cultivos base, que se diferenciaban en 3 aspectos principales: la fuente de folato utilizada, la concentración de glucosa y la concentración de aminoácidos.

El uso del medio RPMI (11875; Gibco) pretende valorar el comportamiento metabólico de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> cuando la concentración de aminoácidos y de glucosa se asemeja a la empleada en la mayoría de los cultivos in vitro. De esta forma servirá de control para valorar las diferencias con el resto de las condiciones planteadas.

El uso del medio HPLM (A4899; Gibco) pretende valorar el comportamiento metabólico de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> cuando la concentración de aminoácidos y de glucosa se asemeja en mayor medida a la existente en el plasma humano.



La composición de los medios se presenta en la siguiente tabla (Tabla 1):

Tabla 1: *Composición de los medios de cultivo utilizados: basados en el medio RPMI 1640 y en el medio HPLM.*

Medio	RPMI Fol	RPMI MeTHF	HPLM Fol	HPLM MeTHF
<b>Aminoácidos</b>	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
L-Alanina	0	0	38	38
Glicina	10	10	23	23
L-Arginina	200	200	23	23
L-Asparagina	50	50	7	7
L-Ácido aspártico	20	20	3	3
L-Cisteína 2HCl	65	65	31	31
L-Ácido glutámico	20	20	12	12
L-Glutamina	300	300	80	80
L-Histidina	15	15	23	23
L-Hidroxiprolina	20	20	0	0
L-Isoleucina	50	50	9	9
L-Leucina	50	50	21	21
L-Lisina HCl	40	40	37	37
L-Metionina	15	15	4.5	4.5
L-Fenilalanina	15	15	13	13
L-Prolina	20	20	23	23
L-Serina	30	30	15	15
L-Treonina	20	20	17	17
L-Triptófano	5	5	12	12
Sal disódica L-Tirosina	29	29	14	14
L-Valina	20	20	26	26
<b>Otros componentes</b>	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
D-Glucosa	2000	2000	901	901
Ácido Fólico	1	0	1	0
5-metiltetrahidrofolato	0	0.1	0	0.1
L-Homocisteína	0	1	0	1
Vitamina B12	0.005	0.005	0.005	0.005
Rojo fenol	5	5	5	5

### 3.2.2. Preparación de los medios de cultivo utilizados

Para el ensayo se prepararon 6 medios de cultivos distintos todos ellos basados en el medio en polvo "RPMI 1640 w/o L-Glutamine, Glucose, Vitamin B12, Amino Acids, Folic Acid, Phenol Red" (R9010-06; USBIO).

Para la preparación de los distintos medios se disuelve 4.6 g por cada 500 mL de H<sub>2</sub>O estéril y se completa con 1 g de bicarbonato de sodio. A continuación, se añaden todos los componentes a su concentración adecuada a excepción de serina, glicina y glucosa.

Una vez los 6 medios base están preparados, es esencial filtrarlos. Para ello se emplea un sistema de filtración por aspiración (596-3320; Thermo Scientific) de 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Tras realizar esta operación los medios se deben conservar en frío hasta su utilización.

Para la fase de expansión, se obtienen alícuotas de cada medio y se completan con los componentes de interés sin trazadores. Además, se suplementan con 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomina y 10 % de FBS. Finalmente, es necesario filtrar de nuevo, en esta ocasión se hace uso del sistema steriflip (SCGP00525; Millipore) ya que el volumen es menor.

Para el experimento con trazadores, de nuevo se obtienen alícuotas de cada medio y se completan con serina, glicina y glucosa añadiendo en cada caso el trazador oportuno marcado. Además, estos medios también deben ser suplementados con 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomina y, en este caso, con 10 % de FBS dializado. Resulta esencial que el suero sea dializado evitando de esta manera añadir metabolitos que alteren la composición y la concentración de interés, así como evitar un descenso en la proporción del metabolito marcado.

En el caso de que el trazador sea agua deuterada ( $^2\text{H}_2\text{O}$ ), es posible añadirla una vez el medio ya está preparado con  $\text{H}_2\text{O}$  estéril. El  $^2\text{H}_2\text{O}$  debe representar un 20% del volumen total por lo que se diluyen los componentes del medio. Sin embargo, el tiempo de incubación será lo suficientemente breve como para que no ocurra un agotamiento de nutrientes y las células se vean afectadas

### 3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

#### 3.3.1. Metabolismo de 1 carbono, serina y glicina.

Para el estudio del metabolismo de 1 carbono se planteó el uso de 3 trazadores distintos, de tal forma que cada uno de los 4 medios diseñados se complementarían de la forma correspondiente, añadiendo uno de los 3 trazadores en cada caso. ( $\text{U-}^{13}\text{C}$ -serina,  $\text{U-}^{13}\text{C}$ -glucosa,  $\text{U-}^{13}\text{C}$ -glicina).

De forma complementaria, cada una de las condiciones fue sometida a 3 posibilidades de tratamiento. Tratamiento control, sin adición de moléculas complementarias; tratamiento con el inhibidor SHIN2, inhibidor de la enzima serina hidroximetiltransferasa, a una concentración 1  $\mu\text{M}$ ; tratamiento con el inhibidor metotrexato, inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa, a una concentración 50 nM.

Todas las condiciones planteadas, con sus respectivos tratamientos incluidos, contaron con 3 réplicas experimentales con el objetivo de obtener consistencia en los resultados.

Todo ello representa un total de 108 muestras que fueron preparadas en duplicado con el objetivo de realizar la extracción metabólica en dos tiempos distintos, 6 y 24 horas tras el comienzo del tratamiento.

#### 3.3.2. Metabolismo NADP/NADPH

Para el estudio del metabolismo de NADP se plantea el uso de 2 trazadores distintos, de tal forma que cada uno de los 4 medios diseñados, se complementarían de la forma correspondiente, añadiendo uno de los 2 trazadores en cada caso. ( $1\text{-}^2\text{H}$ -glucosa,  $^2\text{H}_2\text{O}$ ).

Todas las condiciones planteadas, contaron con 3 réplicas experimentales con el objetivo de obtener consistencia en los resultados.

### 3.4. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS MEDIANTE LC-MS

#### 3.4.1. Preparación de muestras para metabolismo de 1 carbono, serina y glicina.

Una vez completada la incubación se recupera todo el volumen de cada pocillo y se pasa a un Eppendorf limpio. A continuación, se centrifuga durante 3 minutos a 300 g y se recuperan 500 µL de medio que se conserva a -80°C en tubos limpios y el resto de sobrenadante se aspira. Tras ello, se realiza un lavado añadiendo 500 µL de PBS, ya que resulta esencial retirar cualquier resto de medio que pueda contaminar el pool metabólico celular, se mezcla bien con el vórtex, se centrifuga durante 1 minuto a 6000 g y se aspira rápidamente el sobrenadante para evitar alteraciones en el metabolismo (García-Cañaveras et al., 2021).

Para realizar la extracción metabólica se emplea un tampón de extracción específico para metabolitos polares (40:40:20 acetonitrilo:metanol:agua + 0,5% de ácido fórmico) y se trabaja en hielo. Se añaden 100 µL del tampón de extracción y se resuspende el pellet celular dejando actuar durante 5 minutos, para a continuación, neutralizar el ácido mediante la adición de 13,2 µL de bicarbonato de amonio (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>). Finalmente, se debe incubar a -80°C durante al menos 20 minutos, previamente a la preparación de las muestras para su análisis por LC-MS

Para la preparación de las muestras celulares se centrifuga a 16000 g durante 10-15 minutos con la centrifuga trabajando en frío y se transfiere el sobrenadante a un nuevo Eppendorf limpio. Este Eppendorf se vuelve a centrifugar a 16000 g durante 5 minutos y el volumen de sobrenadante deseado se transfiere a una placa de 96 pocillos adaptada para LC.

Para la preparación de los medios se toman 20 µL del Eppendorf guardado en la extracción y se añaden 180 µL de metanol frío. Tras homogeneizar la mezcla se incuba durante al menos 20 minutos a -80°C. Una vez transcurre ese tiempo, las muestras se centrifugan a 16000 g durante 10-15 minutos con la centrifuga trabajando en frío y se transfiere el sobrenadante a un nuevo Eppendorf limpio. Este Eppendorf se vuelve a centrifugar a 16000 g durante 5 minutos y el volumen de sobrenadante deseado se transfiere a una placa de 96 pocillos adaptada para LC.

#### 3.4.2. Preparación de muestras para metabolismo de NADPH

La preparación de las muestras para la evaluación del metabolismo del NADPH debe ser más rápida y sin pasos de lavado ya que los metabolitos de interés son exclusivamente intracelulares y altamente inestables con lo que podrían degradarse en caso de añadir pasos extra innecesarios (Ghergurovich et al., 2020).

Una vez recuperado el volumen de cada pocillo, se centrifuga 1 minuto a 6000 g y se aspira rápidamente el sobrenadante. A continuación, se añaden rápidamente 100 µL del tampón de extracción y se resuspende el pellet celular dejando actuar durante 5 minutos, para a continuación, neutralizar el ácido mediante la adición de 13,2 µL de bicarbonato de amonio (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>).

Finalmente, se centrifuga a 16000 g durante 10-15 minutos con la centrifuga trabajando en frío y se transfiere el sobrenadante a un nuevo Eppendorf limpio. Este Eppendorf se vuelve a centrifugar a 16000 g durante 5 minutos y el volumen de sobrenadante deseado se transfiere a una placa de 96 pocillos adaptada para LC.

### 3.5. ANÁLISIS METABÓLICO MEDIANTE UPLC-MS

Para el análisis de las muestras se realizó un estudio no dirigido de metabolitos polares mediante espectrometría de masas con ionización negativa. Las muestras fueron analizadas empleando un espectrómetro de masas cuadrupolo-orbitrap (Q Exactive; Thermo Fisher) acoplado a una cromatografía de interacción hidrofílica inducida por electrospray. Para la separación cromatográfica se empleó una columna específica para HPLC de alquilo amida (XBridge BEH; Waters) y se realizó mediante gradiente de 2 solventes (A: 95:5 agua:acetonitrilo + 20 mM hidróxido de amonio + 20 mM de acetato de amonio y B: acetonitrilo).

Para el análisis de las muestras de  $^{13}\text{C}$  los parámetros empleados fueron: flujo de 150  $\mu\text{L}/\text{min}$ , volumen de inyección de 10  $\mu\text{L}$  y temperatura de la columna de 25°C. Además, se realizó un único escaneo desde 70 hasta 1000 m/z con una resolución de 140000.

El gradiente de la cromatografía líquida fue el siguiente: 0 min, 90% B; 2 min, 85% B; 3 min, 75% B; 7 min, 75% B; 8 min, 70% B; 9 min, 70% B; 10 min, 50% B; 12 min, 50% B; 13 min, 25% B; 14 min, 25% B; 16 min, 0% B; 21 min, 0% B; 22 min, 90% B; 25 min, 90% B (García-Cañaveras et al., 2021).

Para el análisis de las muestras de  $^2\text{H}$  los parámetros empleados fueron: flujo de 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ , volumen de inyección de 10  $\mu\text{L}$  y temperatura de la columna de 25°C. Además, se realizaron 2 escaneos. El primero de ellos, desde 50 hasta 700 m/z con una resolución de 140000. El segundo, desde 700 hasta 1000 m/z con una resolución de 70000, siendo este el de mayor interés ya que es donde se espera detectar las especies derivadas de NAD.

La resolución se reduce con el objetivo de que los picos de  $^2\text{H}$  acoplen con los de  $^{13}\text{C}$  presentes por abundancia natural, ya que la diferencia de m/z es tan baja que si se tratan de discernir con la resolución que permite el equipo el error sería elevado. Para solventar este problema se adquiere toda la información como un único pico y se corrige posteriormente como se explica en la introducción.

El gradiente de la cromatografía líquida fue el siguiente: 0 min, 85% B; 2 min, 85% B; 3 min, 60% B; 9 min, 60% B; 9.5 min, 35% B; 13 min, 5% B; 15.5 min, 5% B; 16 min, 85% B; 20 min, 85% B (Hermans et al., 2020).

### 3.6. ANÁLISIS DE DATOS

#### 3.6.1. Extracción de datos mediante EL-Maven

Para procesar toda la información volcada desde el espectrómetro de masas se empleó el software EL-MAVEN (v.0.12.1, Elucidata), el cual te permite cargar cada muestra procesada por el espectrómetro de masas y te agrupa todas ellas en función de cada pico detectado. La identificación de los metabolitos de interés en este caso se hizo gracias a una base de datos generada mediante la inyección de estándares químicos de unos 500 metabolitos y mediante la interpretación de los patrones de marcaje.

Además, el software también es capaz de detectar los distintos isótopos para un mismo metabolito, permitiendo de esta forma analizar las abundancias de los metabolitos y su marcaje.

Las muestras marcadas con  $^{13}\text{C}$  fueron analizadas de forma independiente a la muestras marcadas con  $^2\text{H}$ , y en cada caso, se registró la intensidad de los picos que presentaban una forma definida y sin elevado ruido de fondo de aquellos metabolitos de interés para cada experimento.

### 3.6.2. Corrección de abundancia mediante AccuCor

Al emplear isótopos resulta necesario corregir la abundancia natural que se espera en cualquier muestra debido a la propia presencia de cada isótopo en la naturaleza (Tabla 2). Para ello se recurre a *AccuCor*, un script diseñado en software R y cuyo acceso es libre (Su et al., 2017)

Este script requiere como input el listado de los metabolitos analizados, con información acerca de sus respectivas fórmulas moleculares. Además, el usuario puede ajustar la resolución empleada para que la corrección sea más precisa.

Tabla 2: Masa atómica, abundancia relativa y diferencia de masa de los isótopos de hidrógeno y carbono

Elemento	Isótopo	Masa atómica	Abundancia relativa (%)	Diferencia relativa de masa
Hidrógeno	1H	1.0078	99.984	2H/1H 100%
	2H	2.0141	0.0156	
Carbono	12C	12	98.892	13C/12C 8.3%
	13C	13.0034	1.108	

El script ha sido diseñado para que el output de EL-MAVEN pueda ser utilizado de forma directa como input, esto supone una ventaja en tiempo y reproducibilidad.

El output es un archivo de tipo csv que contiene la información original, así como los datos corregidos en base a la abundancia isotópica natural, normalizados en base a 1 e información del pool total para cada metabolito independientemente de los isótopos.

### 3.6.3. Representación de metabolitos de interés

La representación de los metabolitos de interés se realiza empleando Prism 8.0 (GraphPad). Cabe destacar que no se pretenden detectar diferencias significativas, sino variaciones cualitativas entre las distintas condiciones experimentales con el objetivo de descubrir los componentes más influyentes en el metabolismo de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de ratón.

La herramienta de cálculo empleada para valorar las variaciones de los metabolitos de interés es el fold change (ecuación 3). Este método es sencillo e intuitivo, por un lado, los valores entre -1 y 0 ejemplificarán el consumo de los metabolitos, mientras que los valores superiores a 0 mostrarán la acumulación de este. Todo ello, en base a unos niveles de referencia que habitualmente se asignan a las condiciones control.

$$FC = \frac{\text{caso-referencia}}{\text{referencia}} \quad (\text{ec. 3})$$

### 3.6.4. Cálculos para el análisis del metabolismo serina/glicina/1C

Para el análisis del metabolismo de 1C se recurre a otro script diseñado en software R. En este se tiene en cuenta las distintas rutas por las que los distintos trazadores empleados pueden aportar unidades de carbono marcadas, es decir como isótopos, en relación con las moléculas de serina y glicina detectadas. Para ello, se ha diseñado un sistema de ecuaciones (ecuación 4-19) que permite estimar la importancia de las vías más importantes en base a la información obtenida tras obtener los datos normalizados y corregidos de las muestras de medios y de las muestras de las células.

$$Ser(0)_{[SerTracer]} = I_{Ser} \cdot SerExt(0) + N \cdot Glc(0) + R \cdot Gly(0) \cdot C1(0)_{[SerTracer]} \quad (ec. 4)$$

$$Ser(1)_{[SerTracer]} = I_{Ser} \cdot SerExt(1) + R \cdot Gly(0) \cdot C1(1)_{[SerTracer]} \quad (ec. 5)$$

$$Ser(2)_{[SerTracer]} = I_{Ser} \cdot SerExt(2) + R \cdot Gly(2) \cdot C1(0)_{[SerTracer]} \quad (ec. 6)$$

$$Ser(3)_{[SerTracer]} = I_{Ser} \cdot SerExt(3) + N \cdot Glc(6) + R \cdot Gly(2) \cdot C1(1)_{[SerTracer]} \quad (ec. 7)$$

$$Ser(0)_{[GlcTracer]} = I_{Ser} \cdot SerExt(0) + N \cdot Glc(0) + R \cdot Gly(0) \cdot C1(0)_{[GlcTracer]} \quad (ec. 8)$$

$$Ser(1)_{[GlcTracer]} = I_{Ser} \cdot SerExt(1) + R \cdot Gly(0) \cdot C1(1)_{[GlcTracer]} \quad (ec. 9)$$

$$Ser(2)_{[GlcTracer]} = I_{Ser} \cdot SerExt(2) + R \cdot Gly(2) \cdot C1(0)_{[GlcTracer]} \quad (ec. 10)$$

$$Ser(3)_{[GlcTracer]} = I_{Ser} \cdot SerExt(3) + N \cdot Glc(6) + R \cdot Gly(2) \cdot C1(1)_{[GlcTracer]} \quad (ec. 11)$$

$$Ser(0)_{[GlyTracer]} = I_{Ser} \cdot SerExt(0) + N \cdot Glc(0) + R \cdot Gly(0) \cdot C1(0)_{[GlyTracer]} \quad (ec. 12)$$

$$Ser(1)_{[GlyTracer]} = I_{Ser} \cdot SerExt(1) + R \cdot Gly(0) \cdot C1(1)_{[GlyTracer]} \quad (ec. 13)$$

$$Ser(2)_{[GlyTracer]} = I_{Ser} \cdot SerExt(2) + R \cdot Gly(2) \cdot C1(0)_{[GlyTracer]} \quad (ec. 14)$$

$$Ser(3)_{[GlyTracer]} = I_{Ser} \cdot SerExt(3) + N \cdot Glc(6) + R \cdot Gly(2) \cdot C1(1)_{[GlyTracer]} \quad (ec. 15)$$

$$Gly(0)_{[GlyTracer]} = I_{Gly} \cdot GlyExt(0) + SHMT \cdot (Ser(0)_{[GlyTracer]} + Ser(1)_{[GlyTracer]}) \quad (ec.16)$$

$$Gly(2)_{[GlyTracer]} = I_{Gly} \cdot GlyExt(2) + SHMT \cdot (Ser(2)_{[GlyTracer]} + Ser(3)_{[GlyTracer]}) \quad (ec.17)$$

$$Gly(0)_{[SerTracer]} = I_{Gly} \cdot GlyExt(0) + SHMT \cdot (Ser(0)_{[SerTracer]} + Ser(1)_{[SerTracer]}) \quad (ec.18)$$

$$Gly(2)_{[SerTracer]} = I_{Gly} \cdot GlyExt(2) + SHMT \cdot (Ser(2)_{[SerTracer]} + Ser(3)_{[SerTracer]}) \quad (ec.19)$$

El script trata de resolver de forma iterativa todas las ecuaciones teniendo en cuenta que  $I_{Ser}$ , es la proporción de serina que capta la célula;  $N$ , es la proporción de serina sintetizada desde glucosa;  $R$ , es la proporción de serina sintetizada desde glicina y unidades libres de 1 carbono;  $I_{Gly}$ , es la proporción de glicina que capta la célula;  $SHMT$ , es la proporción de glicina metabolizada desde serina. Esta estimación se realiza de forma independiente para condición de cultivo y tratamiento.

Además, el script es también capaz de estimar en función de cada trazador, la relación entre unidades de 1 carbono marcadas ( $C1(1)$ ) y la unidades de 1 carbono sin marcar ( $C1(0)$ ), para cada condición de cultivo y tratamiento.

### 3.6.5. Cálculos para el análisis del metabolismo NAD(P)(H)

Para el análisis del metabolismo de NADPH se recurre a otro script diseñado en R (Zhang et al., 2017). Este script requiere como input 2 archivos csv distintos, por un lado, uno con la información de los picos detectados de NADP y, por otro lado, uno con los picos detectados de NADPH.

En este caso se quiere analizar la influencia que tiene cada trazador en el marcaje del hidrógeno activo de la molécula, de tal forma que la corrección se debe llevar a cabo comparando la estructura sin el hidrógeno activo y la estructura con el hidrógeno activo. La relación proporcional de marcaje entre las 2 matrices presenta una diferencia que se ajusta a la influencia del hidrógeno activo, según la ecuación 20:

$$[NADP +] * [Active - H] = [NADPH] \quad (\text{ec. 20})$$

$$\begin{bmatrix} M + 0 & 0 \\ M + 1 & M + 0 \\ 0 & M + 1 \end{bmatrix} * \begin{bmatrix} x \\ 1 - x \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} M + 0 \\ M + 1 \\ M + 2 \end{bmatrix}$$

Posteriormente, los resultados de marcaje deben ser corregidos en base a la fracción de intercambio del  $^2\text{H}_2\text{O}$ .

### 3.6.6. Herramientas de análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó utilizando la herramienta GraphPad Prism 8.0 y se limita a la valoración de diferencias en los perfiles de origen para serina y glicina.

Mediante un análisis *two-way* ANOVA, con alfa ajustada en 0.01 y considerando como factores el medio (RPMI o HPLM) y la especie de folato (Fol o 5-MeTHF) es posible evaluar la significación estadística de la influencia del medio y la especie de folato en los perfiles de origen de serina y glicina para muestras control, según el modelo de ecuaciones planteado.

Por otro lado, mediante un análisis t test no pareado, con el intervalo de confianza ajustado al 99%, en el que se compara de forma independiente muestras control frente a muestras tratadas con uno de los inhibidores (SHIN2 o MTX), es posible valorar la significación estadística de la influencia de cada tratamiento sobre los perfiles de origen de serina y glicina para muestras control, según el modelo de ecuaciones planteado.

En ambos casos también se estima la variación para cada comparativa. Por un lado, en el *two-way* ANOVA se estima el porcentaje de variación explicada, mientras que en los t test se estudia la variación entre las medias. Se consideran estadísticamente significativos los p-valores inferiores a 0.01.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. PROLIFERACIÓN Y COMPOSICIÓN METABÓLICA DE LOS MEDIOS EN MUESTRAS CONTROL.

En primer lugar, decidimos evaluar la influencia de la composición del medio en la proliferación celular (Figura 10). Aquellas condiciones experimentales que portan ácido fólico (RPMI\_Fol y HPLM\_Fol) presentan una mayor proliferación que las condiciones que portan 5-MeTHF (RPMI\_MeTHF y HPLM\_MeTHF), lo cual se puede deber tanto a la especie de folato, como a su concentración inicial en el medio (ya que el ácido fólico está a 1 mg/L mientras que el 5-MeTHF está a 0.1 mg/L). Por otra parte, se observa como en ambos casos, los medios HPLM permiten un menor número de divisiones que los medios RPMI en las mismas condiciones de folato.

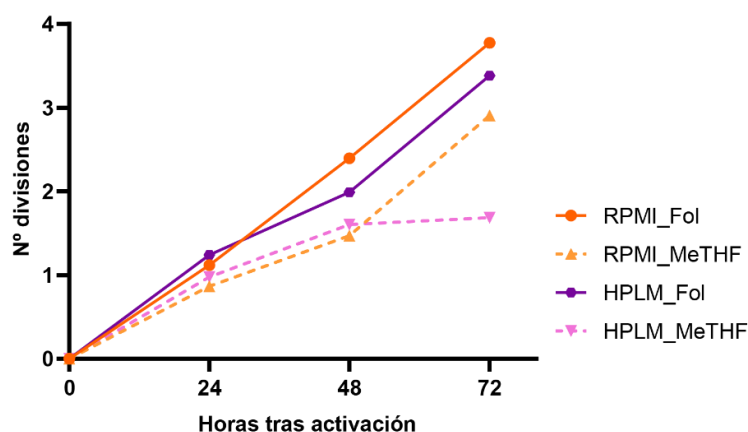


Figura 10: Proliferación celular en función del medio de cultivo en tratamiento control. Se representa el número de divisiones que experimentan los linfocitos sometidos a tratamiento control en función del medio de cultivo tras la activación. Los valores del número de divisiones se estiman mediante la ecuación 2 tras medir directamente la concentración en cada caso.

Para evaluar los posibles motivos y confirmar las condiciones de cultivo se valoran los niveles de glucosa, serina, glicina, glutamina, glutamato y aspartato en los distintos medios. Por un lado, se comprueban y comparan los niveles de los metabolitos tras las 6 primeras horas una vez se aplican los tratamientos. En este caso para aplicar el *fold change*, se toman como referencia los valores para RPMI\_Fol (Figura 11). Los resultados confirman que los medios HPLM se adecúan a las condiciones fisiológicas planteadas en la tabla 1 con niveles de glicina más altos que los medios RPMI y con niveles más bajos para el resto de los componentes a excepción del glutamato que se mantiene estable.

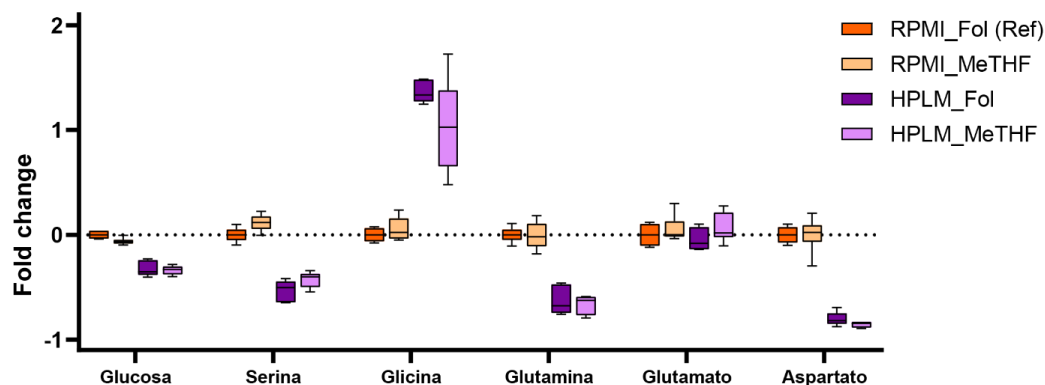


Figura 11: Variación de los metabolitos de interés en las distintas condiciones de cultivo a las 6 horas en base a los niveles del medio RPMI\_Fol. En gráfico de cajas y bigotes se representa la distribución de glucosa, serina, glicina, glutamina, glutamato y aspartato para los distintos medios de cultivo empleados en base a 6 réplicas de muestras control (2 por cada trazador)



Tras ello, se comparan todos los medios a las 24 horas con respecto a los mismos medios a las 6 horas, pudiendo evaluar de esta forma el consumo/producción en ese intervalo de tiempo (Figura 12).

En todos los casos existe un consumo de glucosa, serina, glutamina y aspartato, en consonancia con el papel esencial de estos nutrientes en rutas metabólicas asociadas con la obtención de energía y la síntesis de moléculas claves en proliferación celular como son nucleótidos, proteínas o lípidos.

En los medios HPLM se observa un descenso muy acusado de los niveles de glutamina y aspartato. Este agotamiento de nutrientes esenciales podría llegar a comprometer la proliferación celular y provocar alteraciones metabólicas considerables. Concretamente, para la condición HPLM\_Fol, la glucosa y la serina también presentan niveles muy pobres.

Por otro lado, se observa una diferencia considerable relacionada con la glicina entre RPMI y HPLM ya que mientras en RPMI los niveles aumentan en HPLM disminuyen. Esto actúa en consonancia con los niveles relativos de serina y glicina en cada medio, que favorecen la conversión de serina en glicina en medios RPMI, mientras que en HPLM predomina el consumo de glicina extracelular.

Por último, sucede algo similar con los niveles de glutamato. Mientras que en los medios RPMI se produce una gran conversión de glutamina a glutamato, en el caso de los medios HPLM el destino final de la glutamina debe ser otro. Por una parte, la menor concentración de glucosa en el medio puede sugerir el uso del esqueleto de carbono de la glutamina para la obtención de energía o para reacciones biosintéticas, incluyendo no solo la síntesis de otros aminoácidos o ácidos grasos, sino también de proteínas (Hosios et al., 2016).

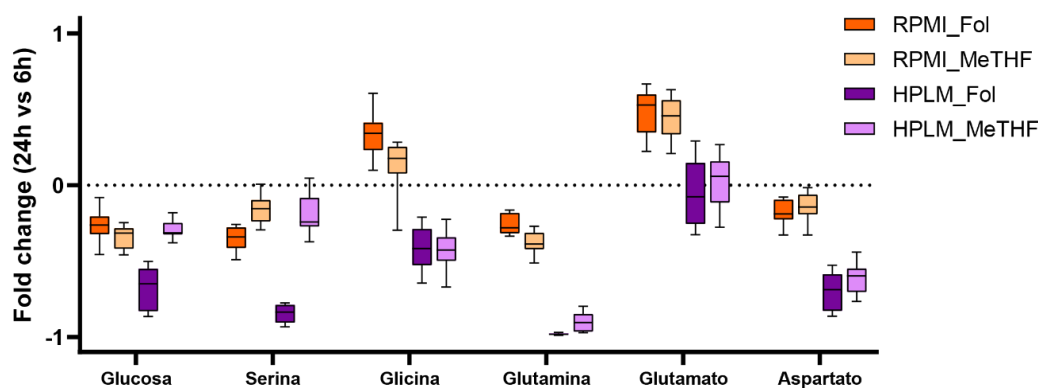


Figura 12: Variación de los metabolitos de interés en las distintas condiciones de cultivo entre las 24 y las 6 horas iniciales. En gráfico de cajas y bigotes se representan los niveles de glucosa, serina, glicina, glutamina, glutamato y aspartato para los distintos medio de cultivo en base a 6 réplicas de muestras control (2 por cada trazador).

#### 4.2. RUTA DE BIOSÍNTESIS DE PURINAS EN MUESTRAS CONTROL

La ruta de biosíntesis de purinas es una vía esencial ya que permite la síntesis de novo de nucleótidos para la proliferación. La ruta del folato/serina/1C interviene de forma importante en la biosíntesis de purinas, es por ello por lo que resulta esencial valorar la concentración de los metabolitos intermediarios en ella para evaluar el efecto de la especie y concentración de la fuente de folato, así como del resto de componentes del medio, sobre el funcionamiento de la ruta.

La ruta de biosíntesis de purinas se inicia con una ribosa activada (ribosa-5-fosfato, R5P) y tras una serie de reacciones donde, además de la especie 10-fTHF, intervienen ciertos aminoácidos como glutamina, glicina o aspartato, se obtiene como producto final inosina monofosfato (IMP), desde el cual se sintetizan el resto de las purinas (Figura 13).

Tanto la acumulación de intermediarios clave de la ruta como la incorporación de marca procedente de U-<sup>13</sup>C-glucosa, U-<sup>13</sup>C-serina o U-<sup>13</sup>C-glicina a los productos finales de la ruta, ATP y GTP, nos permiten su estudio detallado (Ducker & Rabinowitz, 2017; García-Cañaveras et al., 2021)

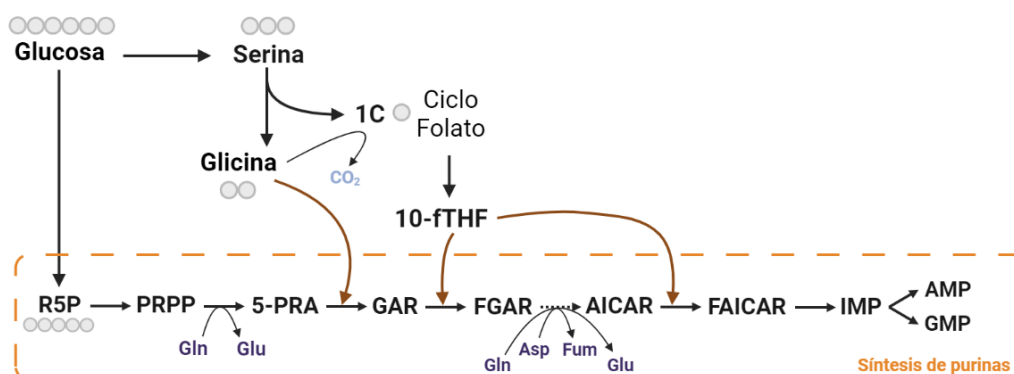


Figura 13: **Ruta de biosíntesis de purinas y fuentes de carbono.** La ruta de biosíntesis de purinas requiere de la síntesis de R5P la cual sufre una serie de reacciones que terminan dando lugar a IMP. En estas reacciones intervienen especies relevantes del ciclo serina-folato-1C aportando 4 unidades de carbono, que se suman a las 5 unidades de R5P. Ciertos aminoácidos como la glutamina o el aspartato son esenciales para llevar a cabo ciertas reacciones de esta ruta.

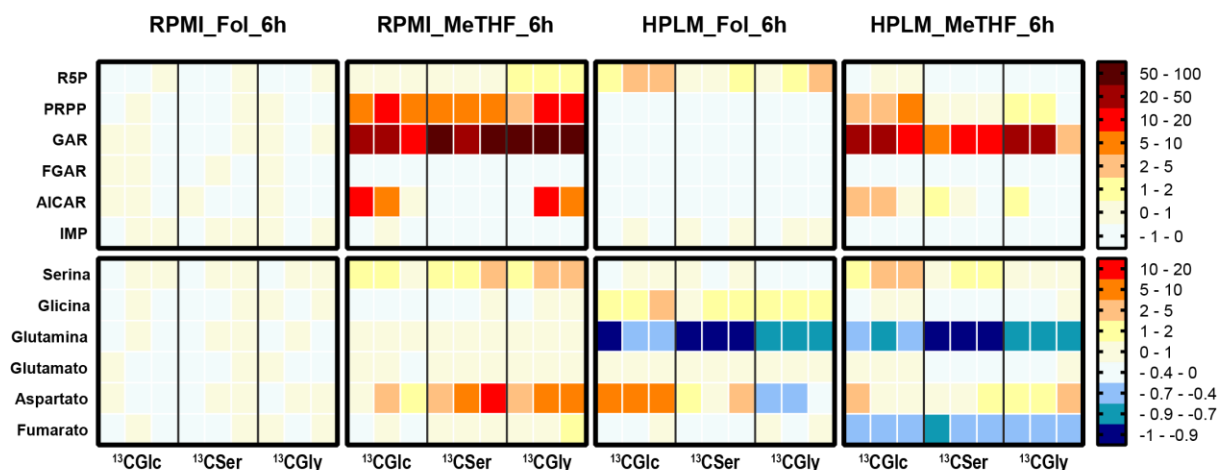
#### 4.2.1. Evaluación a las 6 horas

Tras 6 horas de incubación con los trazadores, se puede observar como aquellos controles cuya fuente de folato es 5-MeTHF en concentración fisiológica se produce una acumulación de intermediarios de la ruta de biosíntesis de purinas, como es el caso de GAR y AICAR, donde se requiere la especie 10-fTHF para la reacción. Estos datos son acordes a los datos de proliferación, donde todas las muestras de 5-MeTHF presentan un menor número de divisiones a las 24 horas tras el inicio del tratamiento. Además, los niveles de serina en estos medios son ligeramente más altos que en los medios con ácido fólico, en concordancia una vez más con su menor proliferación y con una menor actividad SHMT (Figura 14A). En los medios HPLM, es posible observar cómo los niveles intracelulares de glutamina ya son bajos a las 6 horas lo que puede contribuir a la menor proliferación observada en estas células.

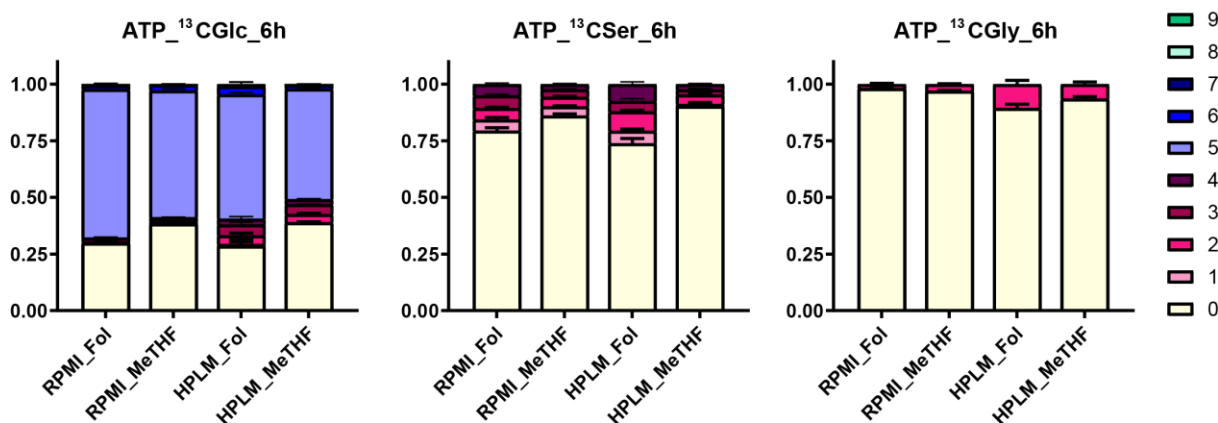
En cuanto al marcaje en los productos finales de la síntesis de novo de purinas, en aquellos casos en los que el trazador es U-<sup>13</sup>C-Glucosa el marcaje teórico máximo es M+9. En ATP y GTP se observa la predominancia del marcaje en M+5 a causa de la R5P uniformemente marcada que se está produciendo desde glucosa mediante oxPPP. Por otro lado, el marcaje en M+0 es menor en aquellos casos en los que la fuente de folato es ácido fólico, esto es así debido a que presentan una mayor tasa de proliferación y por tanto la fracción sintetizada de novo es mayor. Finalmente, en las muestras de HPLM se puede observar cómo aparece marcaje en M+2, M+3 y M+4. Esto se explica debido a las necesidades celulares para sintetizar serina, ya que en estas condiciones los niveles son bajos. De esta forma el marcaje de la glucosa pasa a las moléculas de serina y de esta a las moléculas de glicina y 10f-THF gracias a la actividad SHMT, para posteriormente incorporarse en los intermediarios de la síntesis de purinas, pudiendo ser observado en el marcaje final de ATP y GTP (Figura 14B-C).

En aquellos casos en los que el trazador es U-<sup>13</sup>C-Serina el marcaje teórico máximo es M+4. Se puede observar como el marcaje en M+0 es menor en aquellos casos en los que la fuente de folato es ácido fólico, esto de nuevo se explica a causa de una mayor tasa de proliferación y recambio y a la mayor actividad SHMT (Figura 14B-C).

A) Intermediarios en la biosíntesis de purinas y metabolitos esenciales en muestras control



B) Marcaje ATP en muestras control



C) Marcaje GTP en muestras control

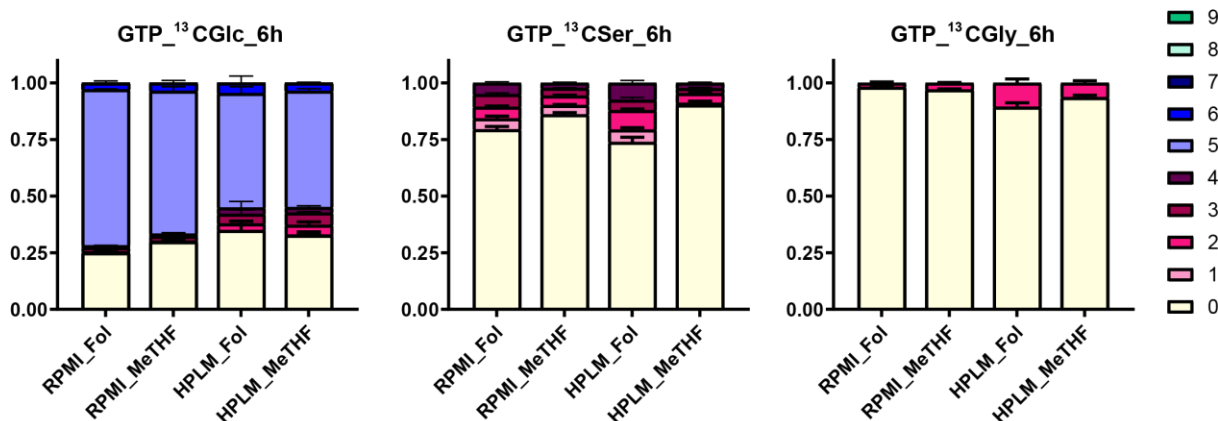


Figura 14: A) Heatmaps por fold change respecto a la condición RPMI\_Fol\_6h para las muestras control de los intermediarios y metabolitos de mayor interés en la ruta de biosíntesis de purinas. Las 3 réplicas se agrupan bajo el trazador empleado en cada caso, contando así con 9 réplicas totales para cada medio experimental. En el heatmap superior resulta de interés destacar la acumulación de los posibles intermediarios, mientras que en el heatmap inferior es interesante evaluar el consumo de los metabolitos necesarios en la ruta. **Marcaje de ATP y GTP respecto a las distintas condiciones en muestras control a las 6 horas.** Se representa, en gráfico de barras los resultados de marcaje en ATP (B) y GTP (C) para cada medio experimental junto a la desviación estándar.

Finalmente, en aquellos casos en los que el trazador es  $U^{13}C$ -Glicina si bien el marcaje teórico máximo es M+4 procedente de la propia glicina y 2x (+1) procedente de unidades de 1C derivadas de actividad GLDC, solamente se observa marcaje M+2 con lo que podemos deducir que la glicina es captada y utilizada por las células, pero que la actividad GLDC es despreciable. (Figura 8). Por último, se observa una mayor incorporación de marca procedente de glicina en el caso del HPLM debido a la mayor concentración de glicina y menor de serina en HPLM comparado con RPMI.

#### 4.2.2. Evaluación a las 24 horas

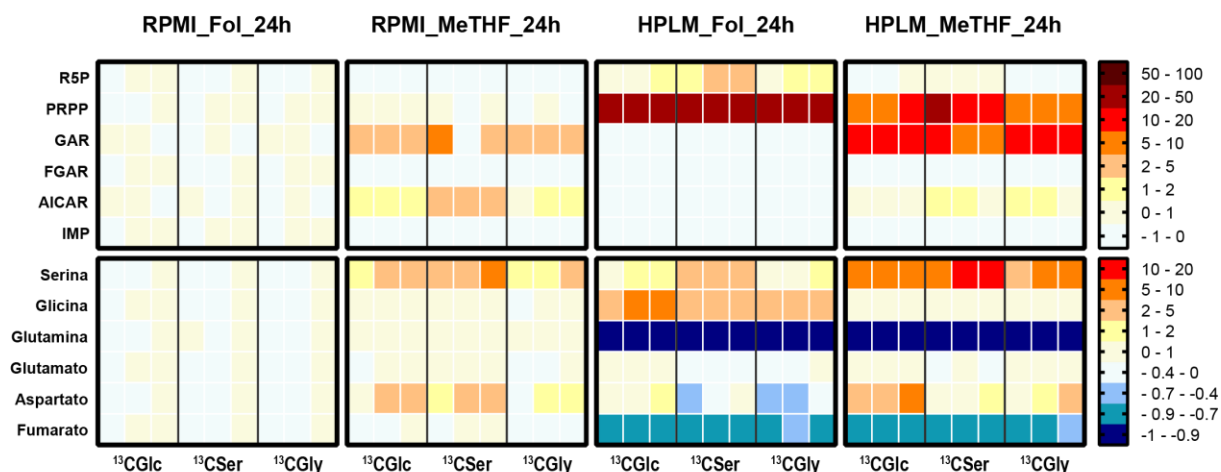
Tras 24 horas de incubación con los trazadores, de nuevo se observa cómo en aquellos controles cuya fuente de folato es 5-MeTHF en concentración fisiológica se produce una acumulación de intermediarios de la ruta de biosíntesis de purinas, como es el caso de GAR y AICAR, donde se requiere la especie 10-fTHF para la reacción. Sin embargo, en los medios HPLM destaca la acumulación de otro intermediario, en este caso el fosforribosilpirofosfato (PRPP) (Figura 15A). En este caso, es probable que el factor limitante no esté siendo tanto la especie de folato como sí la prácticamente ausencia de glutamina disponible en el medio y a nivel intracelular. En el medio HPLM\_Fol el patrón para las 9 réplicas es idéntico ya que en este caso la limitación es debida a la glutamina. Sin embargo, en el medio HPLM\_MeTHF, las limitaciones asociadas a la fuente de folato también están repercutiendo, provocando la acumulación de GAR. Por último, cabe destacar la acumulación de serina en los medios cuya fuente de folato es 5-MeTHF, debido a la menor tasa de proliferación que se puede observar en los resultados presentados con anterioridad, así como a una menor actividad SHMT (Figura 10).

En cuanto al marcaje en los productos finales de la síntesis de novo de purinas tras 24 horas se observan ciertos matices de interés. En aquellos casos en los que el trazador es  $U^{13}C$ -Glucosa el marcaje en M+0 se reduce a menos del 20% del total demostrando que a mayor tiempo se produce una mayor incorporación de marca debido a una mayor tasa de recambio de dichas moléculas. En las muestras de HPLM se puede observar cómo persiste el marcaje en M+2, M+3 y M+4 y aumenta la proporción de marcaje en M+6 y M+7 aportando consistencia a los resultados observados a las 6 horas en relación con la importancia de la síntesis de novo para compensar las limitaciones de serina de este medio. De esta forma, la célula es capaz de activar la vía de conversión de glucosa en serina para su utilización, entre otras rutas, en la biosíntesis de purinas (Figura 15B-C).

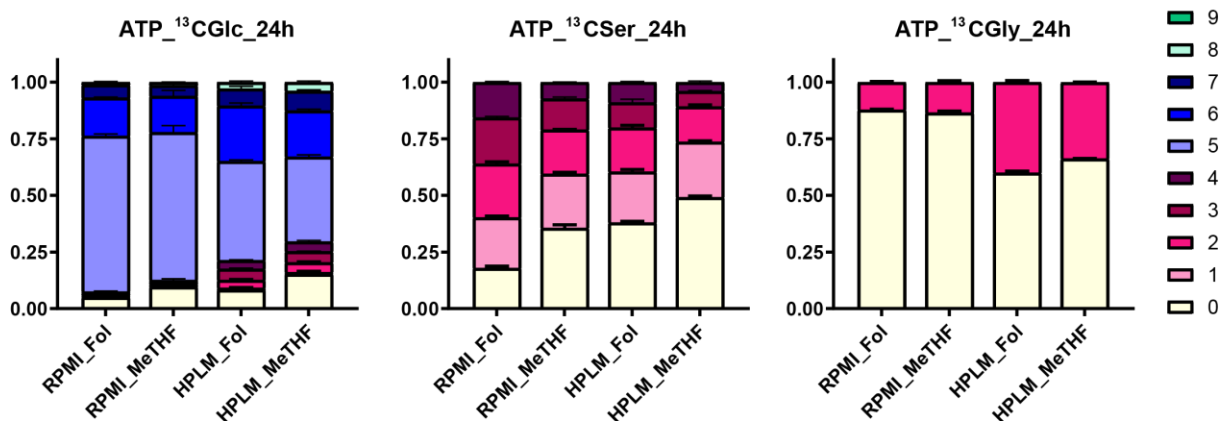
En aquellos casos en los que el trazador es  $U^{13}C$ -Serina se observa una variación en el recambio tras las 24 horas. Mientras que el recambio de ATP y GTP era mayor en HPLM\_Fol que en RPMI\_MeTHF a las 6 horas, a las 24 horas el marcaje en M+0 para ambas condiciones es muy similar. Probablemente el agotamiento de glutamina ha ralentizado la proliferación en HPLM\_Fol, provocando que se equipare a la limitación que supone el 5-MeTHF en la condición RPMI\_MeTHF (Figura 15B-C).

Finalmente, en aquellos casos en los que el trazador es  $U^{13}C$ -Glicina los perfiles de marcaje son similares a las 6 horas, destacando el aumento del ATP y GTP marcado en todos los casos con respecto a las 6 horas. Además, la mayor concentración de glicina en los medios HPLM explica la mayor relación de ATP y GTP con M+2 en estos medios con respecto a los medios RPMI (Figura 15B-C). De nuevo, no se observa marca en M+1, por lo que no parece que la enzima GLDC esté actuando (Figura 9).

A) Intermediarios en la biosíntesis de purinas y metabolitos esenciales en muestras control



B) Marcaje ATP en muestras control



C) Marcaje GTP en muestras control

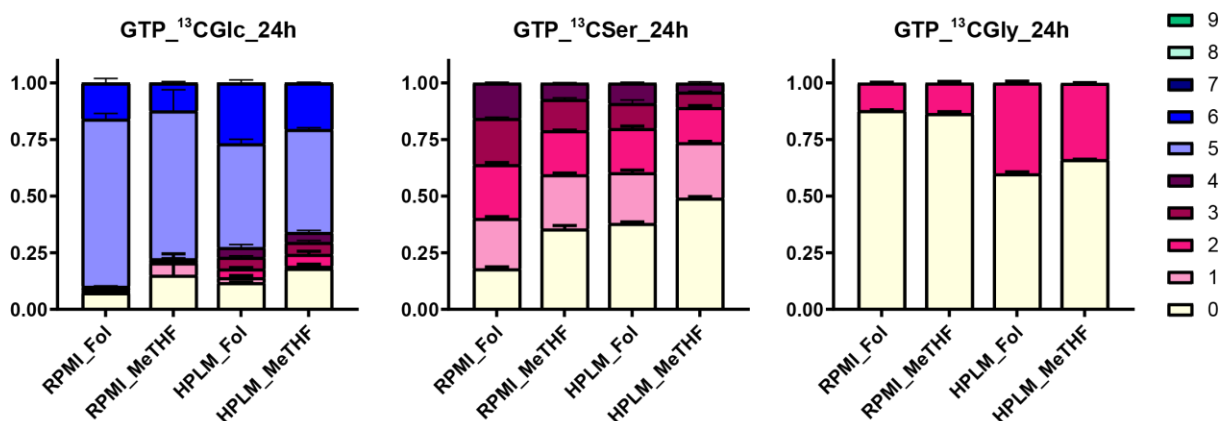


Figura 15: A) Heatmaps por fold change respecto a la condición RPMI\_Fol\_24h para las muestras control de los intermediarios y metabolitos de mayor interés en la ruta de biosíntesis de purinas. Las 3 réplicas se agrupan bajo el trazador empleado en cada caso, contando así con 9 réplicas totales para cada medio experimental. En el heatmap superior resulta de interés destacar la acumulación de los posibles intermediarios, mientras que en el heatmap inferior es interesante evaluar el consumo de los metabolitos necesarios en la ruta. Marcaje de ATP y GTP respecto a las distintas condiciones en muestras control a las 24 horas. Se representa, en gráfico de barras los resultados de marcaje en ATP (B) y GTP (C) para cada medio experimental junto a la desviación estándar.

### 4.3. MARCAJE Y VÍAS DE OBTENCIÓN DE SERINA Y GLICINA EN MUESTRAS CONTROL

Al emplear los 3 trazadores de  $^{13}\text{C}$  es posible evaluar el perfil de marcaje de serina y glicina y, mediante las ecuaciones 4-15 y 16-19, calcular las fuentes relativas de serina y glicina, respectivamente. El marcaje estará condicionado en base a la evolución de los niveles intra y extracelulares de cada metabolito para las distintas condiciones, así como en base al trazador empleado en cada caso.

#### 4.3.1. Estudio del marcaje y origen de serina

En base al perfil de marcaje de serina (Figura 16) se pueden observar diferencias para las distintas condiciones empleadas.

Los medios RPMI presentan mayores niveles de serina que los medios HPLM y, por balance de masas, la glucosa será metabolizada a serina en mayor medida que en RPMI. Esto implica una mayor síntesis de novo de serina en los medios HPLM. Al emplear el trazador  $\text{U}^{13}\text{C}$ -Glucosa se puede observar como la fracción de serina M+0 es menor en HPLM, debido a la mayor síntesis de novo desde glucosa marcada, y al emplear  $\text{U}^{13}\text{C}$ -Serina la fracción de serina M+0 es mayor en HPLM, debido a la mayor síntesis de novo desde glucosa no marcada.

Los medios con ácido fólico presentan una mayor concentración de folato que los medios con 5-MeTHF. Esto implica que predomine la actividad directa de la ruta mitocondrial y la reversa de la ruta citosólica (Figura 3), lo que favorece la regeneración de serina desde glicina y 5,10-MeTHF. Este hecho se refleja en el mayor marcaje para M+1 y M+2 tanto cuando el trazador es  $\text{U}^{13}\text{C}$ -Glucosa como con  $\text{U}^{13}\text{C}$ -Serina. El marcaje M+1 destaca en los medios HPLM ya que la concentración de glicina es mayor y por tanto la cantidad de glicina sin marcar que metaboliza serina también lo es.

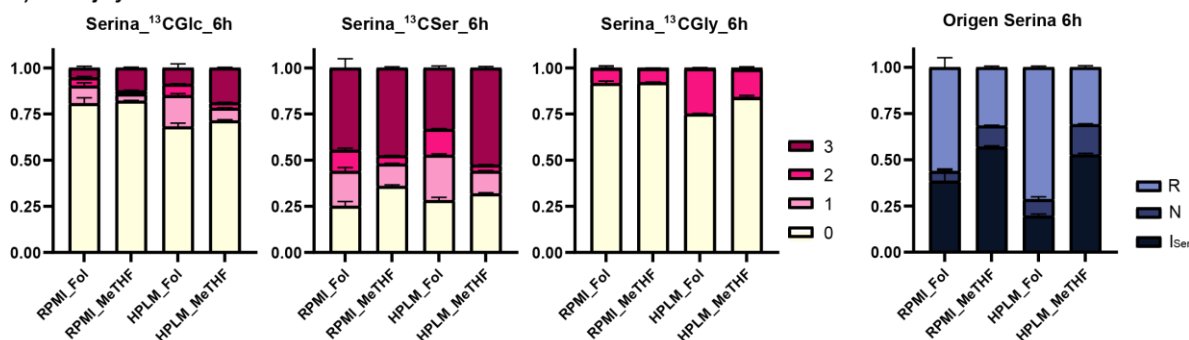
Por otro lado, los medios con ácido fólico presentan una mayor proporción de serina marcada como M+1 y M+2 demuestra que la actividad SHMT reversa (R) está actuando de forma destacada para regenerar serina desde glicina y 5,10-MeTHF. Este marcaje destaca en los medios HPLM ya que la concentración de glicina es mayor y por tanto la relación relativa de glicina sin marcar también lo es. Además, el marcaje en M+1 y M+2 destaca en los medios cuya fuente de folato es ácido fólico, ya que la concentración de folatos es superior y la vía citosólica aumenta su actividad reversible, mientras que en los medios con 5-MeTHF la concentración es más limitada y la vía citosólica directa predomina.

Tras 24 horas el agotamiento de glutamina y serina (Figura 12) y los niveles altos de glicina favorecen la actividad SHMT reversa por balance de masas. Esto sucede especialmente en HPLM\_Fol donde al emplear el trazador  $\text{U}^{13}\text{C}$ -Glicina se observa la mayor proporción de serina M+2 al agotar la serina no marcada y necesitar de la actividad SHMT reversa para mantener el balance de masas.

Si analizamos el perfil de origen para la serina (Figura 16) es posible apreciar como la vía SHMT reversible (R) es considerablemente mayor en los medios cuya fuente de folato es ácido fólico. Por otro lado, la menor disponibilidad de serina en los medios HPLM, provoca que la síntesis de novo de serina (N) tenga mayor peso relativo que sus correspondientes medios RPMI, sin embargo, esto no es suficiente para mantener el balance de serina, por lo que también aumenta la importación ( $I_{\text{Ser}}$ ).

En base al análisis 2-way ANOVA se observa que tanto el medio como la especie de folato contribuyen de forma significativa sobre las fuentes de serina estudiadas ( $I_{\text{Ser}}$ , N y R) en linfocitos T  $\text{CD8}^+$  tras 6 y tras 24 horas y en algunos también lo es la interacción de ambos factores (Anexo I).

**A) Marcaje y fuentes de serina a 6 horas en muestras control**



**B) Marcaje y fuentes de serina a 24 horas en muestras control**

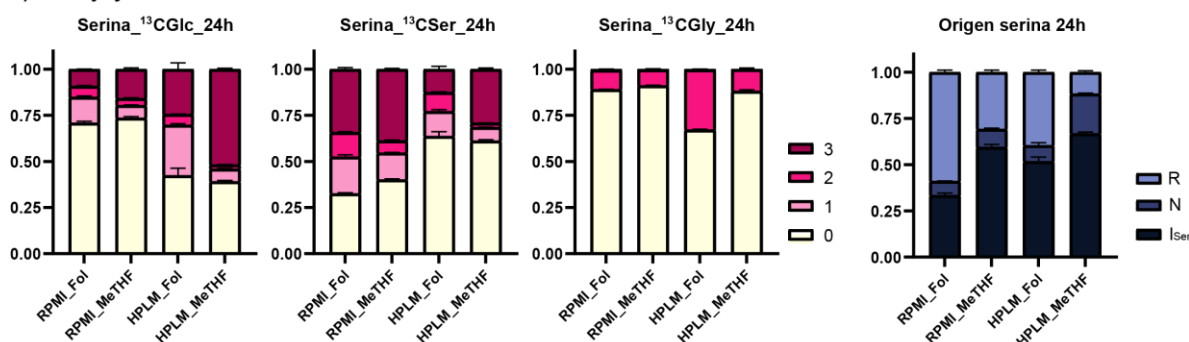


Figura 16: Marcaje y origen celular de serina en muestras control **A) Resultados a las 6 horas.** **b) Resultados a las 24 horas.** Se representa el promedio del marcaje de la serina para las 3 réplicas de muestras control en cada condición de cultivo junto a su desviación estándar. En la columna de la derecha se observa el ajuste del origen de las fuentes de serina para 6 horas y 24 horas. I\_Ser, es la proporción de serina que capta la célula; N, es la proporción de serina sintetizada desde glucosa; R, es la proporción de serina sintetizada desde glicina y unidades libres de 1 carbono.

**4.3.2. Estudio del marcaje y origen de glicina**

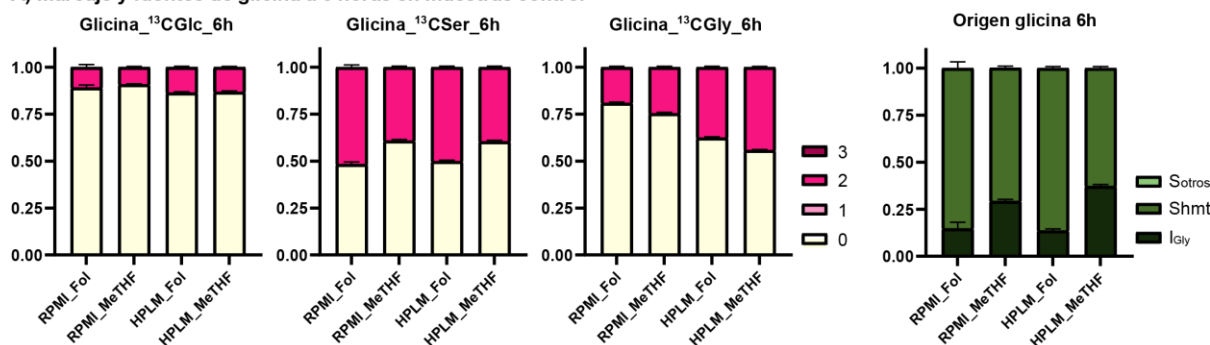
En base al perfil de marcaje de glicina (Figura 17) se pueden observar diferencias para las distintas condiciones empleadas. La información más importante se recoge al evaluar el trazador U-<sup>13</sup>C-Serina, ya que nos permite evaluar de forma directa la actividad SHMT. A las 6 horas, la proporción de glicina marcada es mayor en los medios que portan ácido fólico, por lo que la fuente de folato y su mayor concentración están favoreciendo la actividad SHMT (Figura 17A). Sin embargo, a las 24 horas la proporción de glicina marcada decae en los medios HPLM independientemente de la fuente de folato. Esto sucede debido a que tras 24 horas la concentración de serina en estas condiciones es muy baja y por lo tanto la actividad directa de SHMT se reduce. Al ser unas condiciones con niveles elevados de glicina la célula aumenta la importación directa (I<sub>Gly</sub>).

El marcaje al emplear U-<sup>13</sup>C-Glicina es mayor en los medios HPLM. Esta observación de nuevo es acorde a la mayor concentración de glicina en medios HPLM con respecto a medios RPMI.

Si analizamos los perfiles de origen de la glicina, es posible observar cómo se complementan con el marcaje de la glicina con el trazador U-<sup>13</sup>C-Serina. Esto tiene sentido ya que la glicina marcada al emplear este trazador se sintetiza íntegramente por la actividad SHMT. De nuevo, se observa mayor actividad SHMT en los medios con ácido fólico a las 6 horas y a las 24 horas el agotamiento de serina parece estar resultando fundamental a la hora de limitar la actividad SHMT. Finalmente, en las muestras control no se estima la presencia de glicina que provenga de un origen distinto a la importación o a la actividad SHMT.

En base al análisis two-way ANOVA se observa cómo solamente la especie de folato afecta significativamente a las fuentes de glicina I<sub>Gly</sub> y SHMT tras 6 horas, mientras que, tras 24 horas, tanto el medio como la especie de folato afectan de forma significativa en linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Anexo II).

**A) Marcaje y fuentes de glicina a 6 horas en muestras control**



**B) Marcaje y fuentes de glicina a 24 horas en muestras control**

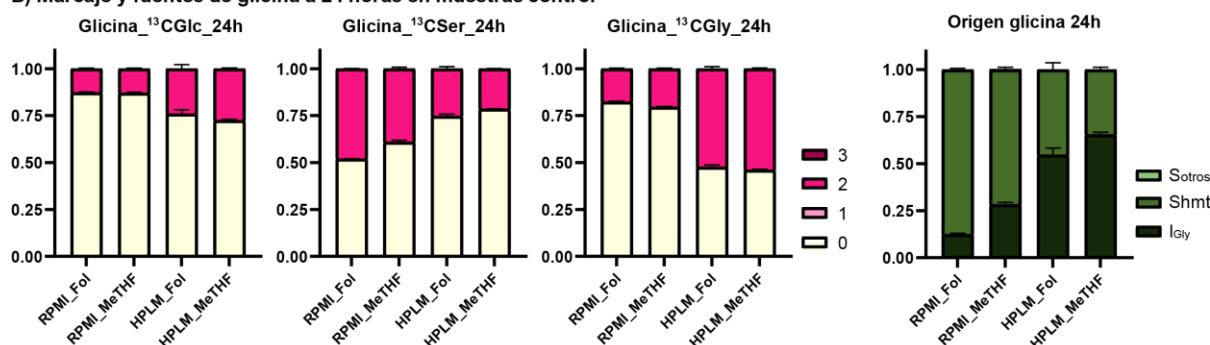


Figura 17: **Marcaje y origen celular de glicina en muestras control** a) Resultados a las 6 horas. b) Resultados a las 24 horas. Se representa el promedio del marcaje de la glicina para las 3 réplicas de muestras control en cada condición de cultivo junto a su desviación estándar. En la columna de la derecha se observa el ajuste del origen de las fuentes de glicina para 6 horas y 24 horas. I<sub>Gly</sub> es la proporción de glicina que capta la célula; SHMT es la proporción de glicina metabolizada desde serina y Sotros se estima como el resto de fuentes de glicina no estudiadas.

#### 4.4. RUTA DE BIOSÍNTESIS DE PURINAS EN MUESTRAS TRATAMIENTO

Una vez valoradas las diferencias en las condiciones de cultivo mediante el análisis de los resultados asociados a las muestras control, se evalúan las muestras con los distintos tratamientos, es decir, aquellas con MTX y aquellas con el inhibidor experimental SHIN2. Para ello se realizan heatmaps de variación para los intermediarios en la biosíntesis de purinas. En este caso el fold change toma como referencia los valores del mismo medio tras el mismo tiempo, pero en muestras control.

##### 4.4.1. Evaluación del tratamiento con SHIN2

Tras 6 horas (Figura 18A) el efecto del inhibidor SHIN2 se está acentuando en las muestras con condiciones de folato no fisiológicas (HPLM\_Fol y RPMI\_Fol), donde se observa una mayor acumulación de GAR y AICAR respecto a las mismas condiciones sin tratamiento. Recordemos que el inhibidor SHIN2 actúa sobre la enzima SHMT, evitando que ocurra la reacción que da 5,10-MeTHF en presencia de serina (Figura 3).

Ambas condiciones de folato deben llevar a cabo esta reacción para que tenga lugar la biosíntesis de purinas, pero no se observan grandes y consistentes cambio en las muestras con folato a niveles fisiológicos (RPMI\_MeTHF y HPLM\_MeTHF). En estos casos, las condiciones control ya son suficientemente limitantes debido a la menor concentración de folato en el medio y es probable que

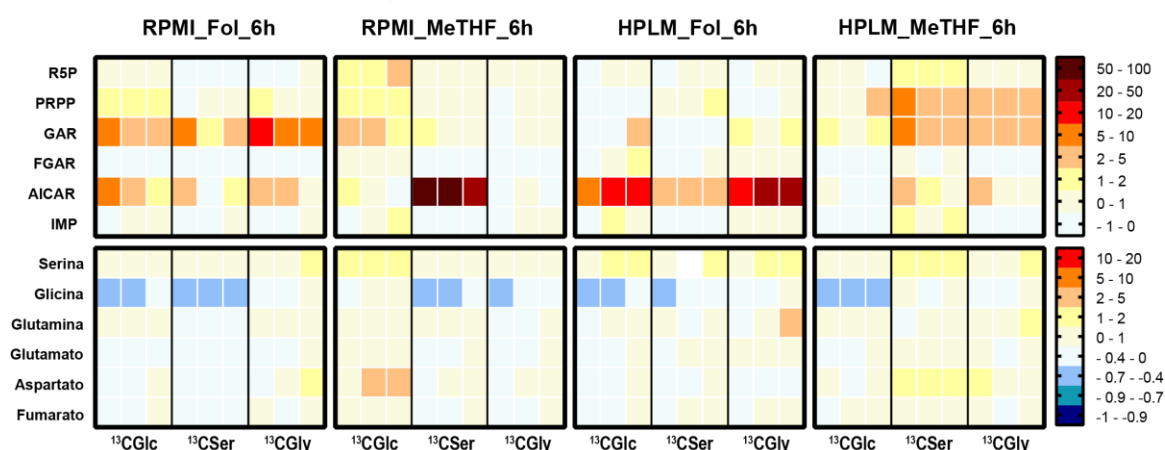


la fuerza del inhibidor a la concentración utilizada no sea suficiente para observar cambios destacados en las muestras con SHIN2 respecto a las muestras control.

Tras 24 horas (Figura 18B) los resultados para los intermediarios de la ruta de biosíntesis de purinas en las muestras con 5-MeTHF no muestran cambios con respecto a los mismos medios en condiciones control. En las condiciones con esta fuente de folato, el metabolismo ya se encuentra considerablemente alterado y por consiguiente la acción del inhibidor no resulta del todo relevante. Sin embargo, para estas condiciones se observa la disminución en los niveles de glicina, lo cual concuerda con una disminución de la actividad SHMT directa y la consiguiente acumulación de serina.

En el caso de HPLM\_Fol, tras 24 horas el nivel glutamina es tan bajo como en las muestras control y por consiguiente los niveles de intermediarios siguen estando condicionados por ese aminoácido.

**A) Intermediarios en la biosíntesis de purinas en muestras tratadas con SHIN2 a las 6 horas**



**B) Intermediarios en la biosíntesis de purinas en muestras tratadas con SHIN2 a las 24 horas**

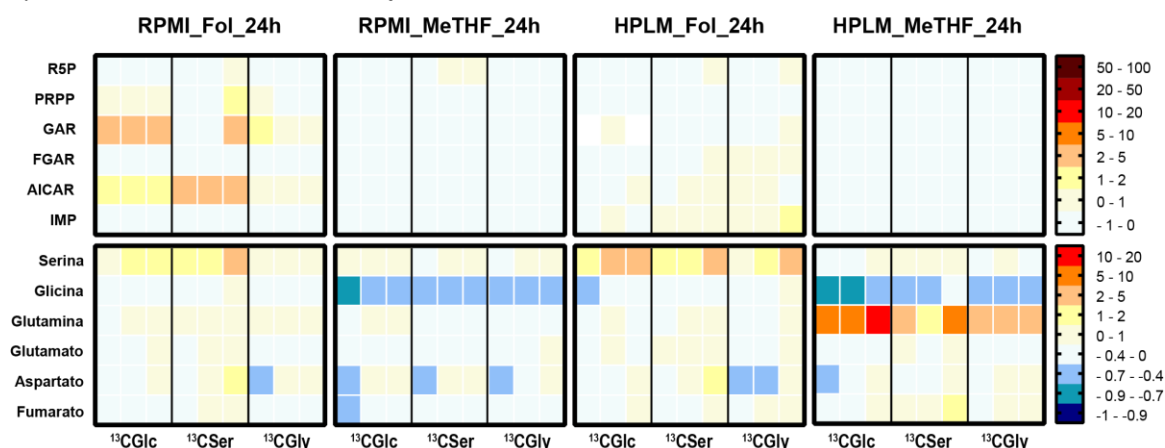


Figura 18: Heatmaps por fold change de las muestras tratadas con SHIN2 respecto a sus muestras control de los intermediarios y metabolitos de mayor interés en la ruta de biosíntesis de purinas. A) Resultados tras 6 horas desde el inicio del tratamiento con SHIN2. B) Resultados tras 24 horas desde el inicio del tratamiento con SHIN2. Las 3 réplicas se agrupan bajo el trazador empleado en cada caso, contando así con 9 réplicas totales para cada medio experimental.

**4.4.2. Evaluación del tratamiento con MTX**

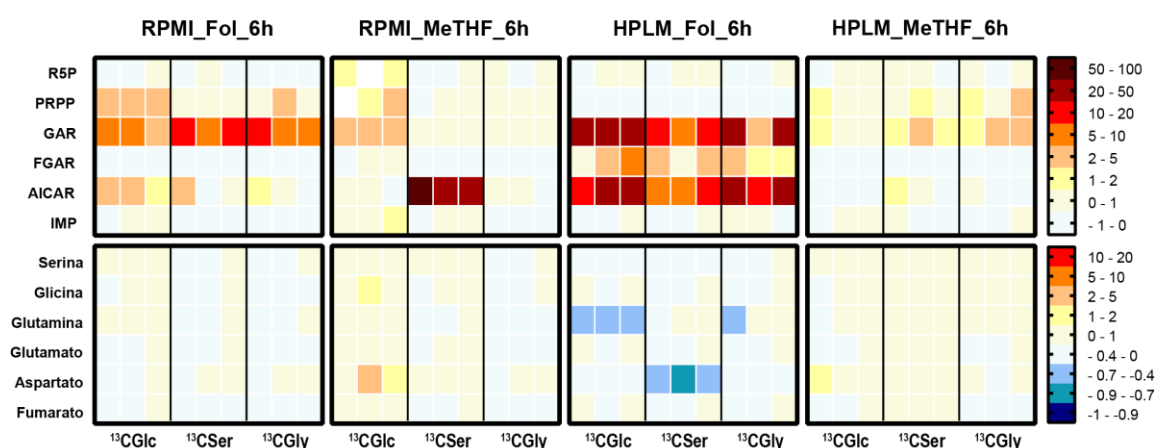
En este caso, el MTX inhibe principalmente a la enzima DHFR, de tal forma que no debería influir de ninguna forma sobre el 5-MeTHF presente en los medios con folato fisiológico. A diferencia del inhibidor SHIN2, solo se deberían ver afectados los medios con 5-MeTHF (Figura 3).

Tras 6 horas (Figura 19A) el efecto del MTX se acentúa sobre las muestras con condiciones de folato no fisiológicas (RPMI\_Fol y HPLM\_Fol). Se observa una consistente acumulación de GAR y AICAR con respecto a las condiciones control de los mismos medios. Además, como es de esperar, en aquellas condiciones cuya fuente de folato es 5-MeTHF, la acumulación de intermediarios con respecto a los controles es reducida e inconsistente.

Tras 24 horas (Figura 19B) sí que se observa consistencia con los resultados a las 6 horas, observándose acumulación de los intermediarios GAR (RPMI\_Fol) y AICAR (HPLM\_Fol), mientras que las condiciones con folato fisiológico no se ven alteradas respecto a su control en gran medida.

En este caso pese a los niveles bajos de glutamina y serina acordes a las condiciones control, el efecto del inhibidor está provocando que en HPLM\_Fol tanto a las 6 como a las 24 horas se produzca una mayor acumulación de intermediarios que en las muestras control. Esto sugiere que el efecto del MTX limita suficientemente la ruta de biosíntesis como para que el nivel de glutamina no llegue a ser un factor limitante.

**A) Intermediarios en la biosíntesis de purinas en muestras tratadas con MTX a las 6 horas**



**B) Intermediarios en la biosíntesis de purinas en muestras tratadas con MTX a las 24 horas**

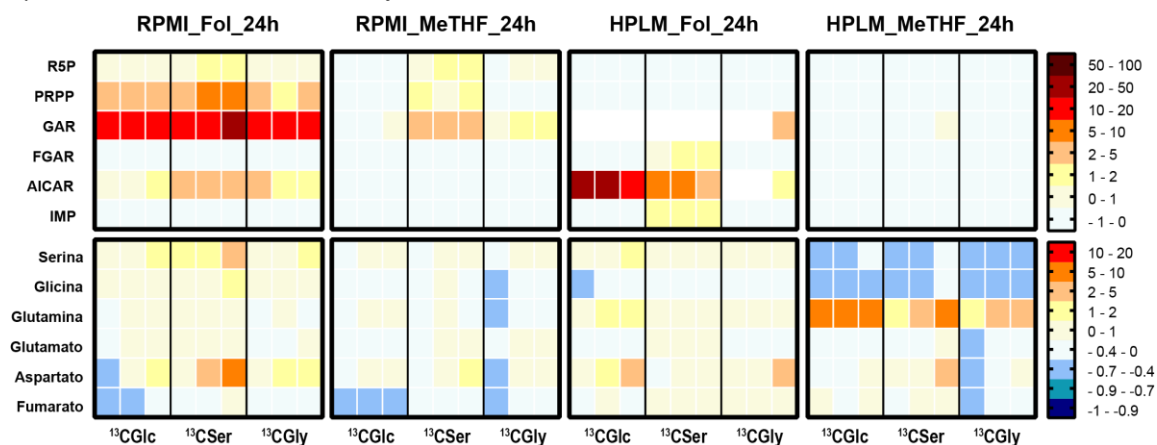


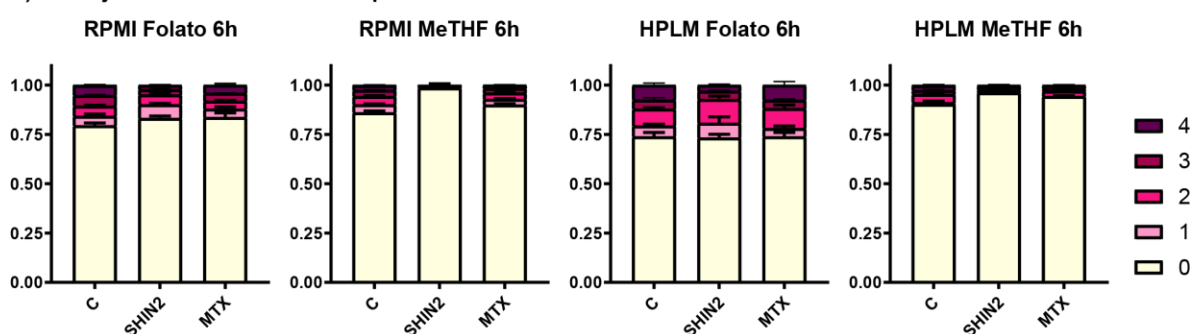
Figura 19: Heatmaps por fold change de las muestras tratadas con MTX respecto a sus muestras control de los intermediarios y metabolitos de mayor interés en la ruta de biosíntesis de purinas. A) Resultados tras 6 horas desde el inicio del tratamiento con MTX. B) Resultados tras 24 horas desde el inicio del tratamiento con MTX. Las 3 réplicas se agrupan bajo el trazador empleado en cada caso, contando así con 9 réplicas totales para cada medio experimental.

#### 4.5. MARCAJE DE ATP PARA LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS AL EMPLEAR U-<sup>13</sup>C-SERINA

Tras haber estudiado el perfil de marcaje para el ATP en las muestras control, se analiza también el perfil de marcaje para las muestras tratamiento. El perfil de marcaje para ATP y GTP es equivalente para las distintas condiciones (Figuras 14 y 15) por lo que tan solo se representan los resultados para ATP en la Figura 20. Además, en este caso se estudia el perfil en base al trazador U-<sup>13</sup>C-Serina, ya que es el más informativo en este caso.

Tras 6 horas, se pueden observar perfiles similares en función de la fuente de folato (Figura 20A). Por un lado, se observa cómo los medios control presentan mayor marcaje que las muestras que han sido sometidas a tratamiento. Esto demuestra que los inhibidores están ejerciendo función sobre el intercambio de moléculas de ATP en las células. Para las condiciones no fisiológicas de folato (RPMI\_Fol y HPLM\_Fol) el perfil de marcaje es similar entre muestras control y muestras tratadas. Sin embargo, cuando la fuente de folato es fisiológica (RPMI\_MeTHF y HPLM\_MeTHF) los inhibidores provocan que la ruta de biosíntesis presente una menor actividad y por consiguiente menor marcaje sobre el ATP.

##### A) Marcaje de ATP a las 6 horas empleando <sup>13</sup>C Ser como trazador.



##### B) Marcaje de ATP a las 24 horas empleando <sup>13</sup>C Ser como trazador.

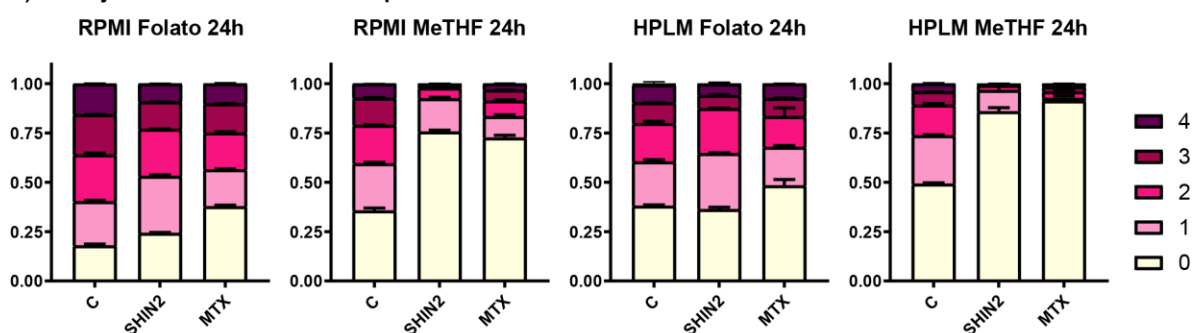


Figura 20: Marcaje de ATP en base al trazador U-<sup>13</sup>C-Serina para todas las muestras A) tras 6 horas desde el inicio del tratamiento B) tras 24 horas desde el inicio del tratamiento. En cada barra se representa el promedio del marcaje para cada uno de los 3 tratamientos posibles (Control, SHIN2 y MTX) con su correspondiente desviación estándar.

Tras 24 horas, se observan perfiles con mayor variación entre los distintos medios y entre el tratamiento recibido (Figura 20B).

En los medios con fuente de folato no fisiológica es posible observar como cuando el tratamiento es MTX, se mantiene un menor porcentaje de ATP marcado en relación con las muestras control. Por otro lado, cuando el tratamiento es SHIN2 la diferencia entre ATP marcado y ATP no marcado es pequeña, pero si se observa la marca en M+3 y M+4, las muestras tratadas con SHIN2 presentan un porcentaje mucho menor que las muestras control, lo cual implica que la cantidad de glicina y unidades de 1 carbono marcada es menor en consonancia con una menor actividad SHMT.

En cuanto a los medios con fuente de folato fisiológica se observa un descenso considerable del ATP marcado en las muestras sometidas a los tratamientos, acentuándose de nuevo la reducción del marcaje en M+3 y M+4 para las muestras tratadas con SHIN2.

#### 4.6. ORIGEN DE SERINA Y GLICINA EN MUESTRAS TRATAMIENTO

Finalmente, mediante el script de ecuaciones (apartado 3.6.4.), se calcula el origen de la serina y de la glicina para cada medio de cultivo y en sus distintos tratamientos empleados, permitiendo así comparar la condición control con los distintos tratamientos.

##### 4.6.1. Estudio del origen de la serina

En relación con la serina, el inhibidor SHIN2 está afectando significativamente a las fuentes de serina con respecto a las condiciones control (Anexo III), provocando que la serina que se obtiene por regeneración (R) gracias a la actividad reversa de la enzima SHMT desaparezca casi por completo en la mayoría de las condiciones de cultivo el efecto es aún mayor en el caso del medio con 5-MeTHF debido al efecto aditivo de la limitación en la fuente de folato. En cambio, en estos casos no hay variación con relevancia biológica respecto a las muestras control debido al inhibidor MTX, con variaciones no significativas para la mayoría de las condiciones (Anexo III), por lo que se deduce que este inhibidor no altera de forma relevante las fuentes de serina (Figura 21).

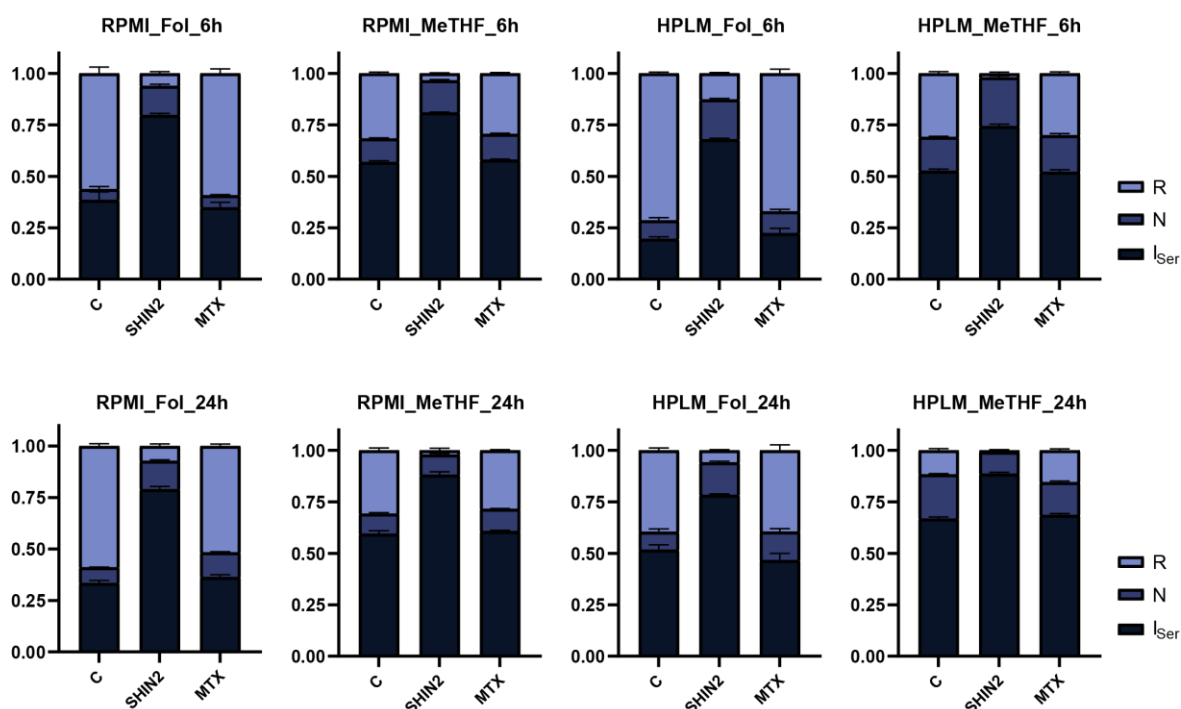


Figura 21: **Origen de serina celular para todas las muestras en las distintas condiciones y tiempos.** Se representa en gráfico de barras el promedio y desviación estándar para el origen de la serina celular en cada condición (medio y tiempo) y los distintos tratamientos. ISer, es la proporción de serina que capta la célula; N, es la proporción de serina sintetizada desde glucosa; R, es la proporción de serina sintetizada desde glicina y unidades libres de 1 carbono.

En los medios RPMI los perfiles a las 6 y a las 24 horas son similares, manteniendo la estabilidad en las fuentes de serina. Además, se observa como en aquellas condiciones con folato en condiciones fisiológicas (5-MeTHF) la influencia de R es menor que en las condiciones con Fol.

En los medios HPLM existen diferencias entre las condiciones a 6 horas y las de 24 horas. A diferencia de los medios RPMI, las condiciones fisiológicas para todos los aminoácidos de este medio provocan, como se ha observado en resultados previos (Figura 12), el agotamiento de los nutrientes y por consiguiente a las 24 horas la actividad reversa de la enzima SHMT se encuentra descompensada. De esta forma, se produce una reducción sustancial de la regeneración como fuente de serina, reduciéndose así la influencia de R entre las 6 y las 24 horas. A su vez, se observa como en aquellas condiciones con folato en condiciones fisiológicas (5-MeTHF) la relevancia de  $I_{Ser}$  es mayor que en las condiciones con Fol.

#### 4.6.2. Estudio del origen de la glicina

En relación con la glicina, también se observa cómo el inhibidor SHIN2 está provocando que la glicina que se obtiene por la actividad directa de la enzima SHMT se reduzca. Cabe destacar como en todos los medios con fuente de folato fisiológica (5-MeTHF), el inhibidor SHIN2 está induciendo que otras vías para la obtención de glicina se activen (Sotros), a diferencia de lo que sucede con Fol, donde esto no ocurre pese a reducirse el porcentaje de glicina que se obtiene a partir de actividad SHMT. Las posibles fuentes alternativas de glicina se asocian a treonina, colina, glioxilato y degradación de proteínas (Wang et al., 2013), por lo que sería interesante valorar estos metabolitos como trazadores. La influencia de SHIN2 es, además, estadísticamente significativa para todos los medios con relación a  $I_{Gly}$  y SHMT. En este caso, la acción de MTX sobre el origen de la glicina celular es mayoritariamente no significativa con ciertas excepciones tras 24 horas con baja relevancia biológica debido a la inestabilidad metabólica a causa del agotamiento de nutrientes y a la escasa magnitud del cambio (Anexo IV) (Figura 22).

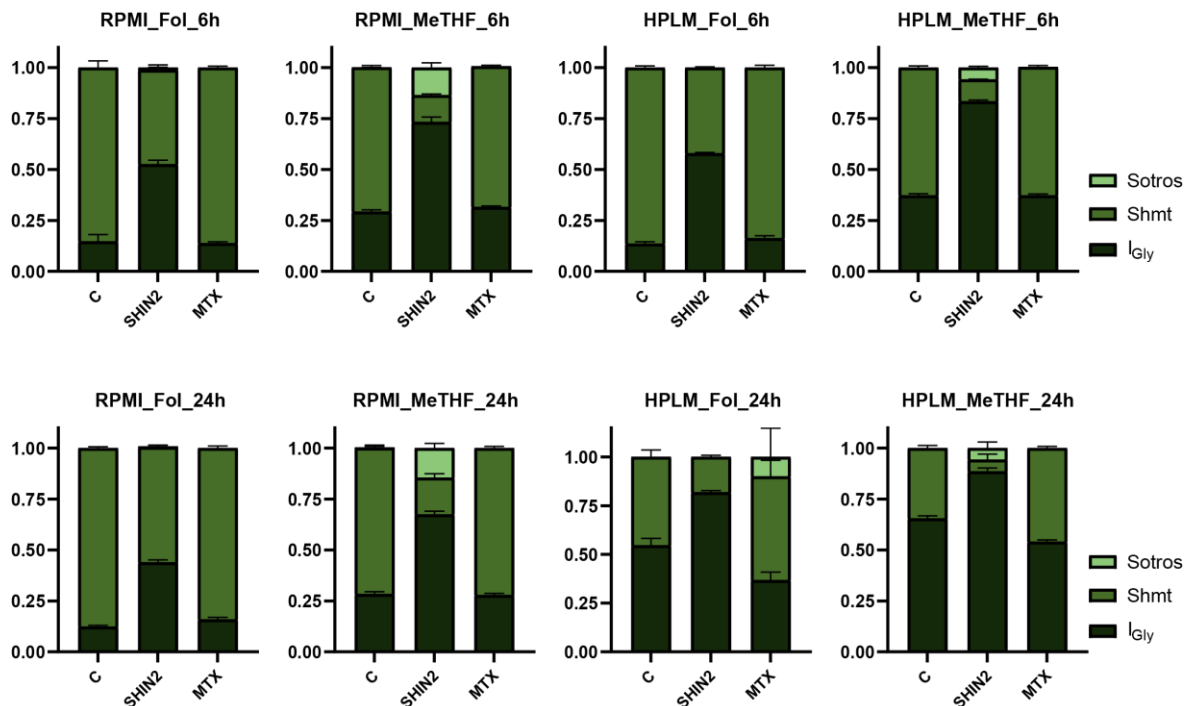


Figura 22: Origen de glicina celular para todas las muestras en las distintas condiciones y tiempos. Se representa en gráfico de barras el promedio y desviación estándar para el origen de la glicina celular en cada condición (medio y tiempo) y los distintos tratamientos.  $I_{Gly}$  es la proporción de glicina que capta la célula; SHMT es la proporción de glicina metabolizada desde serina y Sotros se estima como el resto de fuentes de glicina no estudiadas.

En los medios RPMI los perfiles a las 6 y a las 24 horas son similares, manteniendo la estabilidad en las fuentes de glicina celulares. En el caso de la glicina se observa como en aquellas condiciones con folato en condiciones fisiológicas (5-MeTHF) SHMT tiene menor influencia relativa que en las condiciones con Fol.

En este caso, las condiciones fisiológicas para todos los aminoácidos de los medios HPLM también provocan, como se ha observado en resultados previos (Figura 12), el agotamiento de los nutrientes y, por consiguiente, a las 24 horas la actividad SHMT se encuentra descompensada y se reduce. De esta forma, se produce una reducción sustancial de la vía SHMT como fuente de glicina, aumentando así  $I_{Gly}$  entre las 6 y las 24 horas. Al igual que en los medios RPMI, se observa como en aquellas condiciones con folato en condiciones fisiológicas (5-MeTHF) la influencia relativa de  $I_{Gly}$  es mayor que en las condiciones con Fol.

#### 4.7. MARCAJE DEL NADPH Y RUTA oxPPP EN FUNCIÓN DEL MEDIO

Puesto que ambos medios presentan condiciones basales de glucosa distintas, resultó de interés evaluar el marcaje de NADPH. El marcaje presente en esta molécula va a permitir valorar cual está siendo el rendimiento de la ruta oxPPP, que no solo se encarga de sintetizar ribosas/desoxirribosas, sino que, además, produce 2 moléculas de NADPH por cada molécula de glucosa. A priori, en los medios RPMI, donde se observaba una mayor proliferación, la ruta oxPPP debe presentar un mayor rendimiento asociada también a su mayor concentración basal de glucosa (Figura 23).

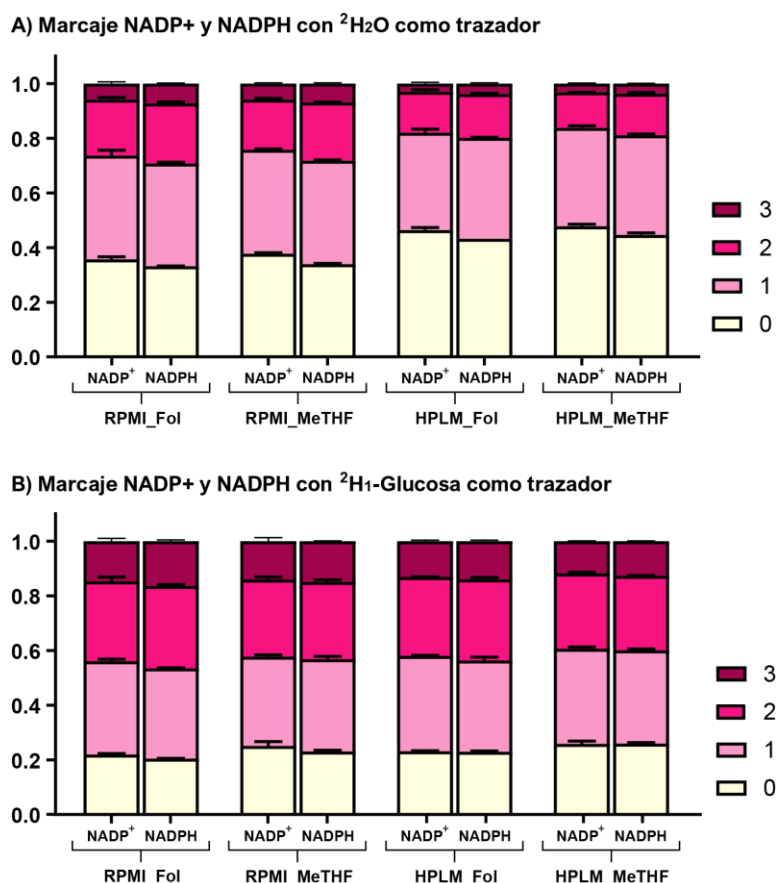


Figura 23: A) Marcaje NADP<sup>+</sup> y NADPH con  $^2H_2O$  como trazador. Se representa el marcaje desde M+0 hasta M+3 del NADP<sup>+</sup> y del NADPH para los distintos medios. B) Marcaje NADP<sup>+</sup> y NADPH con  $^2H_1$ -glucosa como trazador. Se representa el marcaje desde M+0 hasta M+3 del NADP<sup>+</sup> y del NADPH para los distintos medios.

El marcaje con  $^2\text{H}$  (M+1, M+2, M+3) presenta un mayor peso cuando se utiliza el trazador  $^2\text{H}_1$ -glucosa (Figura 23B) que cuando se emplea el trazador  $^2\text{H}_2\text{O}$  (Figura 23A). Además, con ambos trazadores se observa como para un mismo medio el marcaje relativo con  $^2\text{H}$  es mayor en NADPH que en  $\text{NADP}^+$ . Esto resulta lógico al contener el NADPH un protón más que el  $\text{NADP}^+$  (Figura 5).

Tras realizar la corrección asociada al intercambio de protones con el disolvente (ver 1.4.3.2.) los resultados para cada marca se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3: *Proporción de NADPH marcado en los distintos medios para cada trazador. Tras realizar la corrección se muestra la media de las 3 réplicas para la proporción de NADPH marcado mediante la actividad de la enzima G6PDH junto a su desviación estándar. La contribución de la enzima G6PDH se ha calculado como  $^2\text{H}_1\text{-Glc} / (1\text{-}^2\text{H}_2\text{O}/0.2)$ .*

	RPMI_Fol	RPMI_MeTHF	HPLM_Fol	HPLM_MeTHF
$^2\text{H}_2\text{O}$	$0.08 \pm 0.01$	$0.11 \pm 0.01$	$0.07 \pm 0.01$	$0.070 \pm 0.009$
$^2\text{H}_1\text{-Glc}$	$0.073 \pm 0.004$	$0.08 \pm 0.03$	$0.03 \pm 0.01$	$0.02 \pm 0.01$
<b>G6PDH (oxPPP)</b>	$0.118 \pm 0.007$	$0.17 \pm 0.06$	$0.05 \pm 0.01$	$0.04 \pm 0.01$

Se representa la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) que produce la primera molécula de NADPH desde glucosa en la ruta oxPPP. Para ello emplea el hidrógeno asociado al carbono 1 de la molécula de glucosa, por lo que mediante el trazador  $^2\text{H}_1$ -glucosa es posible valorar la proporción de NADPH marcado asociado a la actividad de esta enzima.

Los resultados muestran cómo, la contribución relativa de oxPPP como fuente de poder reductor para NADPH es mayor en RPMI que en HPLM (Anexo 5), tanto en la medida directa ( $^2\text{H}_1\text{-Glc}$ ) como en la medida corregida por el intercambio con el disolvente (G6PDH (oxPPP)). En ambos casos, la fuente de folato no afecta de forma significativa.

## 5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

Los resultados obtenidos y su discusión han permitido aproximar las respuestas de los objetivos planteados:

1. El uso de concentraciones fisiológicas de nutrientes y fuentes de folato impone restricciones metabólicas a la proliferación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> de ratón.
  - a. El uso de 5-MeTHF 0.1 mg/mL vs folato 1 mg/mL limita la producción de unidades de 1C mediante la actividad SHMT disponibles para la síntesis de purinas.
  - b. El uso del medio HPLM vs RPMI impone restricciones en la disponibilidad de serina y glutamina.
2. El uso de concentraciones fisiológicas de nutrientes y fuentes de folato altera el metabolismo de la glucosa y de la serina/glicina en linfocitos T CD8<sup>+</sup> de ratón.
  - a. El uso del medio HPLM vs RPMI aumenta la contribución de la síntesis de novo de serina, de la importación de glicina y disminuye la contribución de la ruta oxPPP a la producción de NADPH
  - b. El uso de 5-MeTHF 0.1 mg/mL vs folato 1 mg/mL limita la actividad SHMT y por tanto la reversibilidad de la reacción, favoreciendo la ruta citosólica frente a la mitocondrial.
3. El uso de condiciones fisiológicas de folato altera la efectividad de los inhibidores de metabolismo del folato/serina/1C SHIN2 y MTX en linfocitos T CD8<sup>+</sup> de ratón.
4. El inhibidor de la enzima SHMT, SHIN2, pero no el inhibidor de la enzima DHFR, MTX, altera las fuentes de serina en linfocitos T CD8<sup>+</sup> de ratón

Los resultados están en concordancia con la hipótesis principal planteada, sin embargo, se abren nuevos frentes que deben ser la base de las perspectivas de futuro asociados a este proyecto. En primer lugar, sería interesante valorar los niveles de más metabolitos implicados en el metabolismo del folato-serina-1C, de esta forma sería posible realizar una reconstrucción del modelo más compleja y acertada. También resultaría de interés emplear trazadores para evaluar las incógnitas pendientes, como es la importancia de los niveles de glutamina en condiciones fisiológicas y su papel en la limitación de la proliferación celular o valorar la importancia de las distintas vías posibles asociadas a Sotros en el caso de las fuentes de glicina como podrían ser trazadores para treonina, colina o glioxilato.

El objetivo final de este proyecto sería realizar un análisis sistemático del metabolismo utilizando cálculos asociados a modelos más complejos con el objetivo de elucidar flujos absolutos y valorar con mayor precisión el papel del metabolismo del folato-serina-1C en linfocitos T CD8<sup>+</sup> y otros tipos celulares con altas tasas proliferativas. Por último, cabe destacar que este proyecto se ha realizado utilizando linfocitos T CD8<sup>+</sup> de ratón y por tanto de cara a maximizar la relevancia de los mismos deberían validarse en linfocitos T CD8<sup>+</sup> humano



## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Chan, E. S. L., & Cronstein, B. N. (2010). Methotrexate—how does it really work? *Nature Reviews Rheumatology*, *6*(3), 175–178. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2010.5>
- Chattopadhyay, S., Moran, R. G., & Goldman, I. D. (2007). Pemetrexed: biochemical and cellular pharmacology, mechanisms, and clinical applications. *Molecular Cancer Therapeutics*, *6*(2), 404–417. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0343>
- Cuthbertson, C. R., Arabzada, Z., Bankhead, A., Kyani, A., & Neamati, N. (2021). A Review of Small-Molecule Inhibitors of One-Carbon Enzymes: SHMT2 and MTHFD2 in the Spotlight. *ACS Pharmacology and Translational Science*, *4*(2), 624–646. <https://doi.org/10.1021/acsptsci.0c00223>
- Czeizel, A. E., Dudás, I., Vereczkey, A., & Bánhidly, F. (2013). Folate Deficiency and Folic Acid Supplementation: The Prevention of Neural-Tube Defects and Congenital Heart Defects. *Nutrients*, *5*(11), 4760–4775. <https://doi.org/10.3390/NU5114760>
- Ducker, G. S., & Rabinowitz, J. D. (2017). One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metabolism*, *25*(1), 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.08.009>
- Figueiredo, J. C., Levine, A. J., Lee, W. H., Conti, D. v., Poynter, J. N., Campbell, P. T., Duggan, D., Lewinger, J. P., Martinez, M. E., Ulrich, C. M., Newcomb, P., Potter, J., Limburg, P. J., Hopper, J., Jenkins, M. A., le Marchand, L., Baron, J. A., & Haile, R. W. (2010). Genes involved with folate uptake and distribution and their association with colorectal cancer risk. *Cancer Causes and Control*, *21*(4), 597–608. <https://doi.org/10.1007/S10552-009-9489-6>
- Frigerio, B., Bizzoni, C., Jansen, G., Leamon, C. P., Peters, G. J., Low, P. S., Matherly, L. H., & Figini, M. (2019). Folate receptors and transporters: Biological role and diagnostic/therapeutic targets in cancer and other diseases. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, *38*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S13046-019-1123-1>
- García-Cañaveras, J. C., Lancho, O., Ducker, G. S., Ghergurovich, J. M., Xu, X., da Silva-Diz, V., Minuzzo, S., Indraccolo, S., Kim, H., Herranz, D., & Rabinowitz, J. D. (2021). SHMT inhibition is effective and synergizes with methotrexate in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, *35*(2), 377–388. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0845-6>
- Ghergurovich, J. M., García-Cañaveras, J. C., Wang, J., Schmidt, E., Zhang, Z., TeSlaa, T., Patel, H., Chen, L., Britt, E. C., Piqueras-Nebot, M., Gomez-Cabrera, M. C., Lahoz, A., Fan, J., Beier, U. H., Kim, H., & Rabinowitz, J. D. (2020). A small molecule G6PD inhibitor reveals immune dependence on pentose phosphate pathway. *Nature Chemical Biology*, *16*(7), 731–739. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0533-x>
- Ghergurovich, J. M., Xu, X., Wang, J. Z., Yang, L., Ryseck, R. P., Wang, L., & Rabinowitz, J. D. (2021). Methionine synthase supports tumour tetrahydrofolate pools. *Nature Metabolism*, *3*(11), 1512–1520. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00465-w>

- Hermans, D., Gautam, S., García-Cañaveras, J. C., Gromer, D., Mitra, S., Spolski, R., Li, P., Christensen, S., Nguyen, R., Lin, J. X., Oh, J., Du, N., Veenbergen, S., Fioravanti, J., Ebina-Shibuya, R., Bleck, C., Neckers, L. M., Rabinowitz, J. D., Gattinoni, L., & Leonard, W. J. (2020). Lactate dehydrogenase inhibition synergizes with IL-21 to promote CD8<sup>+</sup> T cell stemness and antitumor immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(11), 6047–6055. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1920413117>
- Hosios, A. M., Hecht, V. C., Danai, L. v., Johnson, M. O., Rathmell, J. C., Steinhäuser, M. L., Manalis, S. R., & vander Heiden, M. G. (2016). Amino Acids Rather than Glucose Account for the Majority of Cell Mass in Proliferating Mammalian Cells. *Developmental Cell*, *36*(5), 540–549. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.02.012>
- Jang, C., Chen, L., & Rabinowitz, J. D. (2018). Metabolomics and Isotope Tracing. *Cell*, *173*(4), 822–837. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2018.03.055>
- Lassi, Z. S., Salam, R. A., Haider, B. A., & Bhutta, Z. A. (2013). Folic acid supplementation during pregnancy for maternal health and pregnancy outcomes. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (3), Art. No.: CD006896. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006896.pub2>
- Locasale, J. W. (2013). Serine, glycine and one-carbon units: Cancer metabolism in full circle. *Nature Reviews Cancer*, *13*(8), 572–583. <https://doi.org/10.1038/nrc3557>
- Ma, E. H., Bantug, G., Griss, T., Condotta, S., Johnson, R. M., Samborska, B., Mainolfi, N., Suri, V., Guak, H., Balmer, M. L., Verway, M. J., Raissi, T. C., Tsui, H., Boukhaled, G., Henriques da Costa, S., Frezza, C., Krawczyk, C. M., Friedman, A., Manfredi, M., ... Jones, R. G. (2017). Serine Is an Essential Metabolite for Effector T Cell Expansion. *Cell Metabolism*, *25*(2), 345–357. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.12.011>
- Moll, R., & Davis, B. (2017). Iron, vitamin B12 and folate. *Medicine*, *45*(4), 198–203. <https://doi.org/10.1016/J.MPMED.2017.01.007>
- Nawaz, F. Z., & Kipreos, E. T. (2022). Emerging roles for folate receptor FOLR1 in signaling and cancer. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *33*(3), 159–174. <https://doi.org/10.1016/J.TEM.2021.12.003>
- Newman, A. C., & Maddocks, O. D. K. (2017). One-carbon metabolism in cancer. *British Journal of Cancer*, *116*(12), 1499–1504. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.118>
- Pan, S., Fan, M., Liu, Z., Li, X., & Wang, H. (2021). Serine, glycine and one-carbon metabolism in cancer (Review). *International Journal of Oncology*, *58*(2), 158–170. <https://doi.org/10.3892/ijo.2020.5158>
- Roca, M., Alcoriza, M. I., Garcia-Cañaveras, J. C., & Lahoz, A. (2021). Reviewing the metabolome coverage provided by LC-MS: Focus on sample preparation and chromatography-A tutorial. *Analytica Chimica Acta*, *1147*, 38–55. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2020.12.025>
- Sanderson, S. M., Gao, X., Dai, Z., & Locasale, J. W. (2019). Methionine metabolism in health and cancer: a nexus of diet and precision medicine. *Nature Reviews Cancer* 2019, *19*(11), 625–637. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0187-8>

- Scaglione, F., & Panzavolta, G. (2014). Folate, folic acid and 5-methyltetrahydrofolate are not the same thing. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*, 44(5), 480–488. <https://doi.org/10.3109/00498254.2013.845705>
- Spleen (mouse) | Mouse cell sources | Mouse cells and organs | MACS Handbook | Resources | Miltenyi Biotec | España*. (n.d.). Retrieved May 26, 2022, from <https://www.miltenyibiotec.com/ES-en/resources/macs-handbook/mouse-cells-and-organs/mouse-cell-sources/spleen-mouse.html>
- Su, X., Lu, W., & Rabinowitz, J. D. (2017). Metabolite Spectral Accuracy on Orbitraps. *Analytical Chemistry*, 89(11), 5940–5948. <https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.7B00396>
- Sullivan, M. R., Darnell, A. M., Reilly, M. F., Kunchok, T., Joesch-Cohen, L., Rosenberg, D., Ali, A., Rees, M. G., Roth, J. A., Lewis, C. A., & vander Heiden, M. G. (2021). Methionine synthase is essential for cancer cell proliferation in physiological folate environments. *Nature Metabolism*, 3(11), 1500. <https://doi.org/10.1038/S42255-021-00486-5>
- Wang, W., Wu, Z., Dai, Z., Yang, Y., Wang, J., & Wu, G. (2013). Glycine metabolism in animals and humans: implications for nutrition and health. *Amino Acids*, 45(3), 463–477. <https://doi.org/10.1007/S00726-013-1493-1>
- Zhang, Z., Chen, L., Liu, L., Su, X., & Rabinowitz, J. D. (2017). Chemical basis for deuterium labeling of fat and NADPH. *Journal of the American Chemical Society*, 139(41), 14368. <https://doi.org/10.1021/JACS.7B08012>
- Zhou, B., Xiao, J. F., Tuli, L., & Ressom, H. W. (2012). LC-MS-based metabolomics. *Molecular BioSystems*, 8(2), 470–481. <https://doi.org/10.1039/C1MB05350G>

## 7. ANEXOS

## ANEXO I. TABLAS SUPLEMENTARIAS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EVALUAR INFLUENCIA DEL MEDIO Y LA FUENTE DE FOLATO EN LAS FUENTES DE SERINA.

Tabla suplementaria 1: Resultados Two-Way ANOVA sobre las fuentes de serina para todas las muestras control a las 6 horas.

Two-Way ANOVA Origen serina control_6h	Factor	% Variación	<i>p value</i>	Estadísticamente significativo
<b>ISer</b>	<b>Interacción</b>	2.95	0.0185	No
	<b>Medio</b>	7.33	0.0003	Sí
	<b>Folato</b>	36.2	<0.0001	Sí
<b>N</b>	<b>Interacción</b>	0.245	0.5106	No
	<b>Medio</b>	11.8	<0.0001	Sí
	<b>Folato</b>	29.6	<0.0001	Sí
<b>R</b>	<b>Interacción</b>	3.33	0.0033	Sí
	<b>Medio</b>	2.77	0.0072	Sí
	<b>Folato</b>	55.6	<0.0001	Sí

Tabla suplementaria 2: Resultados Two-Way ANOVA sobre las fuentes de serina para todas las muestras control a las 24 horas.

Two-Way ANOVA Origen serina control_24h	Factor	% Variación	<i>p value</i>	Estadísticamente significativo
<b>ISer</b>	<b>Interacción</b>	3.44	0.0007	Sí
	<b>Medio</b>	18.7	<0.0001	Sí
	<b>Folato</b>	48.3	<0.0001	Sí
<b>N</b>	<b>Interacción</b>	15.6	<0.0001	Sí
	<b>Medio</b>	22.4	<0.0001	Sí
	<b>Folato</b>	29.4	<0.0001	Sí
<b>R</b>	<b>Interacción</b>	0.000544	0.9396	No
	<b>Medio</b>	29	<0.0001	Sí
	<b>Folato</b>	61.17	<0.0001	Sí

## ANEXO II. TABLAS SUPLEMENTARIAS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EVALUAR INFLUENCIA DEL MEDIO Y LA FUENTE DE FOLATO EN LAS FUENTES DE GLICINA.

Tabla suplementaria 3: Resultados Two-Way ANOVA sobre las fuentes de glicina para todas las muestras control a las 6 horas.

Two-Way ANOVA Origen glicina control_6h	Factor	% Variación	<i>p value</i>	Estadísticamente significativo
<b>IGly</b>	<b>Interacción</b>	2.67	0.0168	No
	<b>Medio</b>	1.53	0.0686	No
	<b>Folato</b>	48.7	<0.0001	Sí
<b>SHMT</b>	<b>Interacción</b>	2.72	0.016	No
	<b>Medio</b>	1.57	0.0657	No
	<b>Folato</b>	48.5	<0.0001	Sí
<b>Sotros</b>	<b>Interacción</b>	0.0447	0.8297	No
	<b>Medio</b>	0.0447	0.8296	No
	<b>Folato</b>	0.0447	0.8297	No

Tabla suplementaria 4: Resultados Two-Way ANOVA sobre las fuentes de glicina para todas las muestras control a las 24 horas.

Two-Way ANOVA Origen glicina control_24h	Factor	% Variación	<i>p value</i>	Estadísticamente significativo
<b>IGly</b>	<b>Interacción</b>	0.303	0.2041	No
	<b>Medio</b>	72.1	<0.0001	Sí
	<b>Folato</b>	8.32	<0.0001	Sí
<b>SHMT</b>	<b>Interacción</b>	0.283	0.2251	No
	<b>Medio</b>	71.8	<0.0001	Sí
	<b>Folato</b>	8.16	<0.0001	Sí
<b>Sotros</b>	<b>Interacción</b>	0.223	0.6296	No
	<b>Medio</b>	0.223	0.6296	No
	<b>Folato</b>	0.223	0.6296	No

### ANEXO III. TABLAS SUPLEMENTARIAS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EVALUAR INFLUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS EN LAS FUENTES DE SERINA

Tabla suplementaria 5: Resultados t test para condiciones RPMI\_Fol\_6h (serina)

t test unpaired Origen serina RPMI_Fol_6h	Vía	Diferencia medias + SD	p value	Estadísticamente significativo
<b>SHIN2 vs C</b>	ISer	0.413 ± 0.0403	<0.0001	Sí
	N	0.0884 ± 0.0147	<0.0001	Sí
	R	-0.501 ± 0.0325	<0.0001	Sí
<b>MTX vs C</b>	ISer	-0.0356 ± 0.0461	0.4437	No
	N	0.00534 ± 0.0126	0.6741	No
	R	0.0303 ± 0.0383	0.4337	No

Tabla suplementaria 6: Resultados t test para condiciones RPMI\_MeTHF\_6h (serina)

t test unpaired Origen serina RPMI_MeTHF_6h	Vía	Diferencia medias + SD	p value	Estadísticamente significativo
<b>SHIN2 vs C</b>	ISer	0.241 ± 0.00716	<0.0001	Sí
	N	0.0411 ± 0.00497	<0.0001	Sí
	R	-0.282 ± 0.00701	<0.0001	Sí
<b>MTX vs C</b>	ISer	0.0113 ± 0.00800	0.1638	No
	N	0.0106 ± 0.00469	0.0286	No
	R	-0.0218 ± 0.00786	0.0075	Sí

Tabla suplementaria 7: Resultados t test para condiciones HPLM\_Fol\_6h (serina)

t test unpaired Origen serina HPLM_Fol_6h	Vía	Diferencia medias + SD	p value	Estadísticamente significativo
<b>SHIN2 vs C</b>	ISer	0.484 ± 0.0118	<0.0001	Sí
	N	0.103 ± 0.0147	<0.0001	Sí
	R	-0.587 ± 0.00776	<0.0001	Sí
<b>MTX vs C</b>	ISer	0.0277 ± 0.0260	0.2915	No
	N	0.0159 ± 0.0168	0.3508	No
	R	-0.0436 ± 0.0222	0.0551	No

Tabla suplementaria 8: Resultados t test para condiciones HPLM\_MeTHF\_6h (serina)

t test unpaired Origen serina HPLM_MeTHF_6h	Vía	Diferencia medias + SD	p value	Estadísticamente significativo
<b>SHIN2 vs C</b>	ISer	0.218 ± 0.0122	<0.0001	Sí
	N	0.0717 ± 0.00862	<0.0001	Sí
	R	-0.290 ± 0.0107	<0.0001	Sí
<b>MTX vs C</b>	ISer	-0.00443 ± 0.0131	0.7369	No
	N	0.0126 ± 0.00936	0.1827	No
	R	-0.00820 ± 0.0115	0.4796	No

Tabla suplementaria 9: Resultados t test para condiciones RPMI\_Fol\_24h (serina)

t test unpaired Origen serina RPMI_Fol_24h	Vía	Diferencia medias + SD	p value	Estadísticamente significativo
<b>SHIN2 vs C</b>	<b>ISer</b>	0.456 ± 0.0185	<0.0001	Sí
	<b>N</b>	0.0614 ± 0.00517	<0.0001	Sí
	<b>R</b>	-0.518 ± 0.0158	<0.0001	Sí
<b>MTX vs C</b>	<b>ISer</b>	0.0296 ± 0.0169	0.0858	No
	<b>N</b>	0.0430 ± 0.00328	<0.0001	Sí
	<b>R</b>	-0.0725 ± 0.0151	<0.0001	Sí

Tabla suplementaria 10: Resultados t test para condiciones RPMI\_MeTHF\_24h (serina)

t test unpaired Origen serina RPMI_MeTHF_24h	Vía	Diferencia medias + SD	p value	Estadísticamente significativo
<b>SHIN2 vs C</b>	<b>ISer</b>	0.287 ± 0.0203	<0.0001	Sí
	<b>N</b>	0.00158 ± 0.00729	0.8294	No
	<b>R</b>	-0.288 ± 0.0151	<0.0001	Sí
<b>MTX vs C</b>	<b>ISer</b>	0.0124 ± 0.0150	0.413	No
	<b>N</b>	0.0120 ± 0.00586	0.046	No
	<b>R</b>	-0.0244 ± 0.0117	0.0423	No

Tabla suplementaria 11: Resultados t test para condiciones HPLM\_Fol\_24h (serina)

t test unpaired Origen serina HPLM_Fol_24h	Vía	Diferencia medias + SD	p value	Estadísticamente significativo
<b>SHIN2 vs C</b>	<b>ISer</b>	0.266 ± 0.0241	<0.0001	Sí
	<b>N</b>	0.0710 ± 0.0151	<0.0001	Sí
	<b>R</b>	-0.337 ± 0.0125	<0.0001	Sí
<b>MTX vs C</b>	<b>ISer</b>	-0.0501 ± 0.0401	0.2169	No
	<b>N</b>	0.0510 ± 0.0196	0.0121	No
	<b>R</b>	-0.000851 ± 0.0300	0.9775	No

Tabla suplementaria 12: Resultados t test para condiciones HPLM\_MeTHF\_24h (serina)

t test unpaired Origen serina HPLM_MeTHF_24h	Vía	Diferencia medias + SD	p value	Estadísticamente significativo
<b>SHIN2 vs C</b>	<b>ISer</b>	0.218 ± 0.0107	<0.0001	Sí
	<b>N</b>	-0.109 ± 0.00721	<0.0001	Sí
	<b>R</b>	-0.109 ± 0.00891	<0.0001	Sí
<b>MTX vs C</b>	<b>ISer</b>	0.0180 ± 0.0107	0.0985	No
	<b>N</b>	-0.0566 ± 0.00723	<0.0001	Sí
	<b>R</b>	0.0385 ± 0.0112	0.0012	Sí

## ANEXO IV. TABLAS SUPLEMENTARIAS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EVALUAR INFLUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS EN LAS FUENTES DE LA GLICINA

Tabla suplementaria 13: Resultados t test para condiciones RPMI\_Fol\_6h (glicina)

t test unpaired Origen glicina RPMI_Fol_6h	Vía	Diferencia medias + SD	p value	Estadísticamente significativo
<b>SHIN2 vs C</b>	<b>IGly</b>	0.379 ± 0.0390	<0.0001	Sí
	<b>SHMT</b>	-0.390 ± 0.0364	<0.0001	Sí
	<b>Sotros</b>	0.0121 ± 0.0128	0.3483	No
<b>MTX vs C</b>	<b>IGly</b>	-0.00908 ± 0.0343	0.7925	No
	<b>SHMT</b>	0.00908 ± 0.0343	0.7925	No
	<b>Sotros</b>	-2.15E-09 ± 6.09E-09	0.7253	No

Tabla suplementaria 14: Resultados t test para condiciones RPMI\_MeTHF\_6h (glicina)

t test unpaired Origen glicina RPMI_MeTHF_6h	Vía	Diferencia medias + SD	p value	Estadísticamente significativo
<b>SHIN2 vs C</b>	<b>IGly</b>	0.440 ± 0.0255	<0.0001	Sí
	<b>SHMT</b>	-0.576 ± 0.0111	<0.0001	Sí
	<b>Sotros</b>	0.135 ± 0.0241	<0.0001	Sí
<b>MTX vs C</b>	<b>IGly</b>	0.0220 ± 0.0107	0.044	No
	<b>SHMT</b>	-0.0167 ± 0.0109	0.1321	No
	<b>Sotros</b>	-7.71E-05 ± 3.57E-04	0.8301	No

Tabla suplementaria 15: Resultados t test para condiciones HPLM\_Fol\_6h (glicina)

t test unpaired Origen glicina HPLM_Fol_6h	Vía	Diferencia medias + SD	p value	Estadísticamente significativo
<b>SHIN2 vs C</b>	<b>IGly</b>	0.444 ± 0.00971	<0.0001	Sí
	<b>SHMT</b>	-0.444 ± 0.00971	<0.0001	Sí
	<b>Sotros</b>	-3.50E-10 ± 1.27E-09	0.784	No
<b>MTX vs C</b>	<b>IGly</b>	0.0271 ± 0.0146	0.0686	No
	<b>SHMT</b>	-0.0270 ± 0.0146	0.0688	No
	<b>Sotros</b>	-3.32E-10 ± 1.31E-09	0.8006	No

Tabla suplementaria 16: Resultados t test para condiciones HPLM\_MeTHF\_6h (glicina)

t test unpaired Origen glicina HPLM_MeTHF_6h	Vía	Diferencia medias + SD	p value	Estadísticamente significativo
<b>SHIN2 vs C</b>	<b>IGly</b>	0.462 ± 0.0105	<0.0001	Sí
	<b>SHMT</b>	-0.520 ± 0.00828	<0.0001	Sí
	<b>Sotros</b>	0.0575 ± 0.00654	<0.0001	Sí
<b>MTX vs C</b>	<b>IGly</b>	0.000509 ± 0.0110	0.9634	No
	<b>SHMT</b>	0.00257 ± 0.0109	0.8148	No
	<b>Sotros</b>	-3.55E-11 ± 1.47E-10	0.8101	No



Tabla suplementaria 17: Resultados t test para condiciones RPMI\_Fol\_24h (glicina)

t test unpaired Origen glicina RPMI_Fol_24h	Vía	Diferencia medias + SD	p value	Estadísticamente significativo
<b>SHIN2 vs C</b>	<b>IGly</b>	0.316 ± 0.0135	<0.0001	Sí
	<b>SHMT</b>	-0.310 ± 0.0109	<0.0001	Sí
	<b>Sotros</b>	0.00248 ± 0.00508	0.6282	No
<b>MTX vs C</b>	<b>IGly</b>	0.0354 ± 0.0121	0.005	Sí
	<b>SHMT</b>	-0.0354 ± 0.0121	0.005	Sí
	<b>Sotros</b>	-5.30E-10 ± 3.25E-09	0.8712	No

Tabla suplementaria 18: Resultados t test para condiciones RPMI\_MeTHF\_24h (glicina)

t test unpaired Origen glicina RPMI_MeTHF_24h	Vía	Diferencia medias + SD	p value	Estadísticamente significativo
<b>SHIN2 vs C</b>	<b>IGly</b>	0.391 ± 0.0186	<0.0001	Sí
	<b>SHMT</b>	-0.538 ± 0.0236	<0.0001	Sí
	<b>Sotros</b>	0.143 ± 0.0238	<0.0001	Sí
<b>MTX vs C</b>	<b>IGly</b>	-0.00530 ± 0.0136	0.6982	No
	<b>SHMT</b>	0.00382 ± 0.0151	0.8018	No
	<b>Sotros</b>	-0.00221 ± 0.00457	0.6306	No

Tabla suplementaria 19: Resultados t test para condiciones HPLM\_Fol\_24h (glicina)

t test unpaired Origen glicina HPLM_Fol_24h	Vía	Diferencia medias + SD	p value	Estadísticamente significativo
<b>SHIN2 vs C</b>	<b>IGly</b>	0.273 ± 0.0373	<0.0001	Sí
	<b>SHMT</b>	-0.273 ± 0.0373	<0.0001	Sí
	<b>Sotros</b>	9.90E-11 ± 2.82E-09	0.9722	No
<b>MTX vs C</b>	<b>IGly</b>	-0.178 ± 0.0550	0.0021	Sí
	<b>SHMT</b>	0.0786 ± 0.148	0.5966	No
	<b>Sotros</b>	0.0998 ± 0.147	0.4997	No

Tabla suplementaria 20: Resultados t test para condiciones HPLM\_MeTHF\_24h (glicina)

t test unpaired Origen glicina HPLM_MeTHF_24h	Vía	Diferencia medias + SD	p value	Estadísticamente significativo
<b>SHIN2 vs C</b>	<b>IGly</b>	0.231 ± 0.0203	<0.0001	Sí
	<b>SHMT</b>	-0.288 ± 0.0299	<0.0001	Sí
	<b>Sotros</b>	0.0570 ± 0.0305	0.0668	No
<b>MTX vs C</b>	<b>IGly</b>	-0.114 ± 0.0154	<0.0001	Sí
	<b>SHMT</b>	0.114 ± 0.0154	<0.0001	Sí
	<b>Sotros</b>	2.98E-10 ± 2.08E-09	0.8867	No

## ANEXO V. TABLAS SUPLEMENTARIAS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EVALUAR INFLUENCIA DEL MEDIO Y LA FUENTE DE FOLATO EN EL MARCAJE DEL NADPH

Tabla suplementaria 21: Resultados Two-Way ANOVA sobre el marcaje del NADPH a causa de la enzima G6PDH

Two-Way ANOVA Marcaje NADPH	Factor	% Variación	<i>p value</i>	Estadísticamente significativo
<b>G6PDH (oxPPP)</b>	<b>Interacción</b>	8.53	0.0977	No
	<b>Medio</b>	69.2	0.0007	Sí
	<b>Folato</b>	2.81	0.3131	No
<b><sup>2</sup>H<sub>1</sub>Glc</b>	<b>Interacción</b>	3.02	0.3363	No
	<b>Medio</b>	73.9	0.0010	Sí
	<b>Folato</b>	0.021	0.9338	No