

SULFURO DE HIDRÓGENO: DE GAS TÓXICO A MOLECULA NECESARIA PARA VIVIR

por ANGELES AROCA Y CECILIA GOTOR

INSTITUTO DE BIOQUÍMICA VEGETAL Y FOTOSÍNTESIS, CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y

UNIVERSIDAD DE SEVILLA, AVENIDA AMÉRICO VESPUCIO, 49, 41092 SEVILLA, SPAIN

AAROCA@US.ES, GOTOR@IBVF.CSIC.ES

Resumen: El sulfuro de hidrógeno siempre se ha considerado un gas nocivo. Sin embargo, investigaciones recientes han desvelado sus propiedades bioquímicas beneficiosas y su papel como molécula de señalización en numerosos procesos fisiológicos y patológicos tanto en los animales como en las plantas. Diversos estudios demuestran el papel protector del sulfuro de hidrógeno frente al estrés oxidativo, y tanto, en los sistemas animales como vegetales, se ha descrito que el sulfuro de hidrógeno está implicado en la regulación de la autofagia, cuyo mecanismo de acción subyacente es la persulfuración de dianas específicas, con el objetivo de promover la supervivencia del organismo.

Abstract: Hydrogen sulfide has long been classified as a harmful gas. However, recent research has unveiled its advantageous biochemical characteristics and its role as a signaling molecule in numerous physiological and pathological processes in both animals and plants. Various studies have showcased hydrogen sulfide's protective capacity against oxidative stress. Furthermore, in both animal and plant systems, hydrogen sulfide has been identified as a key player in regulating autophagy, whose underlying mechanism involves the persulfidation of specific targets, aiming to enhance organismal survival.

Palabras clave: H₂S, persulfuración, ERO, autofagia, estrés oxidativo, gasotransmisor.

Keywords: H₂S, persulfidation, ERO, autophagy, oxidative stress, gasotransmitter.

Introducción

El sulfuro de hidrógeno (H₂S) es un gas incoloro e inflamable con un característico olor a huevo podrido, y naturalmente se encuentra en los gases volcánicos, el gas natural, en los desagües y en algunas aguas de pozo. En ausencia de oxígeno, los microorganismos reductores de azufre utilizan diferentes formas de azufre oxidado como acceptor de electrones durante la degradación de materia orgánica simple, lo que produce H₂S y CO₂ (Offre *et al.*, 2013). El H₂S también lo utilizan las bacterias oxidantes de azufre como donante de electrones en la fotosíntesis anoxigénica.

A altas concentraciones, es un gas tóxico para la vida, ya que la presencia de sulfuro en las mitocondrias provoca la inhibición de la proteína citocromo *c* oxidasa de la cadena respiratoria, lo que a su vez inhibe la respiración mitocondrial (Nicholls *et al.*, 1982). De hecho, la exposición aguda a cantidades de H₂S >500 ppm puede provocar la muerte (Reiffenstein *et al.*, 1992).

Sin embargo, las células son capaces de producir H₂S enzimáticamente de manera endógena; así,

las enzimas responsables de la producción de H₂S en los mamíferos son principalmente la cistationina β -sintasa (CBS), la cistationina γ -liasa (CSE), y la 3-mercaptopiruvato sulfurtransferasa (3-MST), que tienen homólogos en las especies animales; mientras que en las células vegetales el H₂S puede originarse no sólo a través de la reducción mediante la asimilación fotosintética de sulfato en los cloroplastos, sino también por enzimas implicadas en el metabolismo de la cisteína, como las L- y D-cisteína desulfhidrasas (L- y C-DES), las NifS-like, y la β -cianoalanina sintasa que utiliza cisteína para la desintoxicación del cianuro y produce H₂S en las mitocondrias (Gotor *et al.*, 2019).

Fue en 1990 cuando Kimura y sus colaboradores publicaron una función esencial del H₂S en la fisiología humana (Kimura, 1990), considerado hasta entonces una molécula tóxica, lo que abrió un nuevo campo de estudio en la biología.

De hecho, el papel del H₂S ha sido muy estudiado en las últimas dos décadas y existen numerosos artículos que demuestran su implicación en muchos procesos fisiológicos y patológicos tanto en los animales como en las plantas. Se ha demostrado su

papel regulador en la proliferación celular, apoptosis, procesos inflamatorios, hipoxia, neuromodulación, y cardioprotección, así como su participación en diferentes enfermedades cardíacas, neurodegenerativas, cáncer y diabetes, entre otras (Wang, 2014, Paul *et al.*, 2015, Hellmich *et al.*, 2015).

También se ha demostrado la implicación del H₂S en procesos fisiológicos de las plantas tan importantes como la germinación de semillas (Zhang *et al.*, 2008), en el desarrollo radicular (Zhang *et al.*, 2009), en la regulación de genes implicados en la fotosíntesis (Chen *et al.*, 2011), en la autofagia (Laureano-Marin *et al.*, 2016, Gotor *et al.*, 2013) o en la apertura estomática (García-Mata *et al.*, 2010), y que regula procesos de respuesta a distintos estreses abióticos como sequía, calor, estrés osmótico, salinidad, y metales pesados (Aroca *et al.*, 2021b, Aroca *et al.*, 2018). Por lo tanto, queda demostrado que el H₂S tiene una función gasotransmisora (molécula de señalización gaseosa) tan importante como otras moléculas señalizadoras ya consolidadas, como el óxido nítrico (NO), el monóxido de carbono (CO) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), y en muchos casos con funciones análogas en los sistemas vegetales y animales.

Mecanismo de acción del H₂S

En una solución acuosa, el H₂S está en equilibrio con sus formas aniónicas H⁺ y HS[−]. La forma aniónica HS[−] es incapaz de atravesar las membranas de los orgánulos. Sin embargo, debido a la solubilidad lipídica de la molécula de H₂S y su capacidad para atravesar las membranas, se facilitaría la distribución de especies de sulfuro dentro de las células. De esta forma, si se considera el pH fisiológico, aproximadamente dos tercios están presente en forma HS[−] y el resto como H₂S (Cuevasanta *et al.*, 2012).

El mecanismo de acción del sulfuro depende de este comportamiento ácido-base y de su gran reactividad. Se ha descrito que las metaloproteínas son dianas del H₂S, ya que se une covalentemente a los grupos metálicos como las porfirinas de tipo hemo. De esta forma se explica por qué el H₂S actúa como un potente inhibidor de la citocromo *c* oxidasa mitocondrial. El H₂S también puede reaccionar con moléculas oxidantes presentes en la célula, como NO, H₂O₂, S-nitrosotioles, y peroxinitrito, entre otros, modificándolos o reduciendo la concentración de estos oxidantes, y por lo tanto puede actuar como un antioxidante. Sin embargo, el principal mecanismo de acción del H₂S que está bien comprobado en mamíferos y plantas es la persulfuración (conocida también como S-sulfhidratación). En este proceso, el grupo tiol de la cisteína (-SH) presente en las proteínas

sufre una modificación que lo convierte en un grupo persulfuro (-SSH) (Mustafa *et al.*, 2009). Sin embargo, el mecanismo preciso que conduce a la formación de persulfuros está aún en debate, ya que el H₂S, o su forma iónica, HS[−], no pueden reaccionar directamente con los tioles de las proteínas y requiere la presencia de un oxidante. Por tanto, el H₂S puede reaccionar con los residuos de cisteína oxidados como ácido sulfénico (R-SOH) (Filipovic *et al.*, 2012). Este efecto se ha demostrado en diferentes tipos de células de mamífero y en las plantas (*Arabidopsis*), donde aumenta la persulfuración de las proteínas con cierto desfase tras la sulfenilación de las mismas debido a un estrés oxidativo (Zivanovic *et al.*, 2019, García-Calderón *et al.*, 2023).

En *Arabidopsis thaliana* se han identificado más de 5000 dianas de persulfuración, lo cual comprende casi el 13 % de su proteoma anotado (Aroca *et al.*, 2017, Jurado-Flores *et al.*, 2021). Y se sabe que esta modificación puede inducir cambios funcionales en las actividades, estructuras y ubicaciones subcelulares de las proteínas específicas afectadas (Filipovic *et al.*, 2018, Aroca *et al.*, 2015).

Persulfuración y ERO

El grupo tiol de las cisteínas es sensible a la oxidación por especies reactivas de oxígeno (ERO) como el H₂O₂, producido durante una situación de estrés. La oxidación de los residuos de cisteína es un proceso reversible que puede afectar la función de las proteínas oxidadas. De esta forma, cuando hay ERO, ciertas proteínas pueden ser modificadas por sulfenilación (R-SOH), lo cual puede afectar a la función de dichas proteínas y alterar las vías de señalización celular. Sin embargo, en condiciones de estrés persistente o en presencia de concentraciones elevadas de ERO, puede ocurrir una sobreoxidación de proteínas con la formación de motivos de ácido sulfénico (R-SO₂H) o ácido sulfónico (R-SO₃H) en los residuos de cisteína. A diferencia de la oxidación de las cisteínas hasta R-OH y R-SO₂H que pueden ser reversibles, la sobreoxidación hasta R-SO₃H es irreversible y puede alterar permanentemente la estructura y función de las proteínas afectadas (**figura 1**). En este sentido, la persulfuración podría estar protegiendo las proteínas frente a la sobreoxidación, ya que el H₂ reacciona con los residuos de tipo sulfenilo para formar persulfuros. De esta forma, cuando un estrés induce un estado de oxidación persistente, las proteínas persulfuradas pueden reaccionar con las ERO para formar ácidos pertiosulfénicos (-SSOH) y, en caso de que el estrés sea continuado y muy oxidante, el ácido pertiosulfénico se puede oxidar a pertiosulfónico (-SSO₂H) y

ácido pertiosulfónico (-SSO₃H) (Filipovic *et al.*, 2018, Aroca *et al.*, 2018). Estos residuos de pertiol oxidados pueden reducirse nuevamente a tiol por la acción del

glutatión y de los sistemas de tiorredoxinas, volviendo a recuperar la estructura y funcionalidad de las proteínas afectadas (Zivanovic *et al.*, 2019).

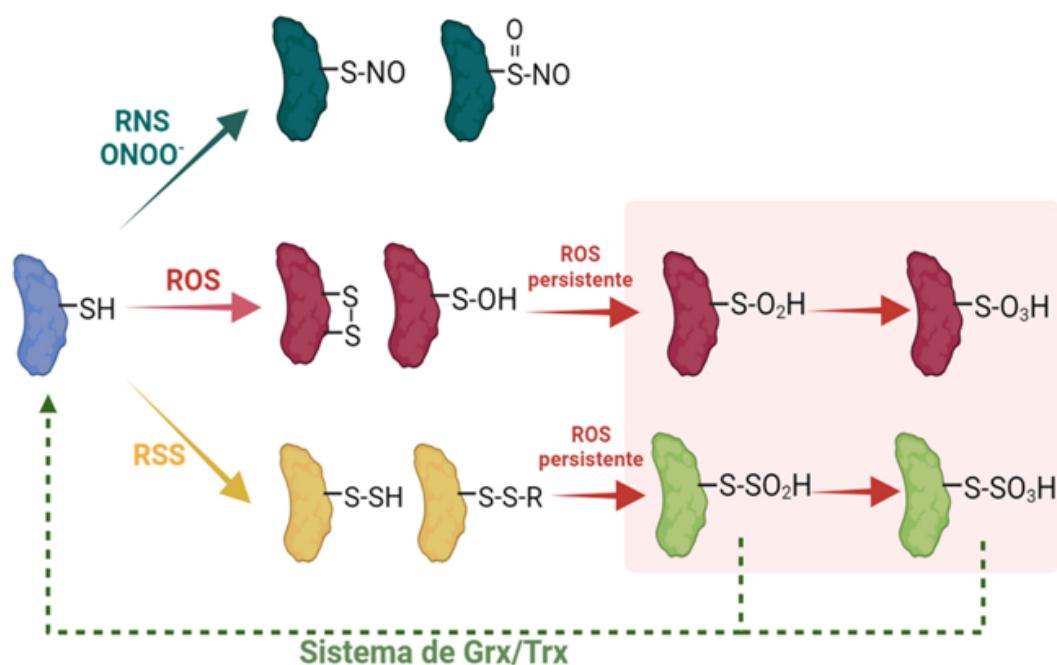


Figura 1. Representación esquemática de las interacciones entre las diferentes especies reactivas de oxígeno (ERO o ROS), de nitrógeno (RNS o RSS) y de azufre (ERS o RSS) en la célula y las modificaciones postraduccionales del grupo tiol de una cisteína proteica.

Se ha comprobado que la regulación redox es muy importante para diversos procesos de señalización que controlan las respuestas a distintos tipos de estrés ambiental, ya sea de origen biótico o abiótico, así como en los procesos relacionados con el desarrollo celular, la autofagia y la apoptosis. No obstante, en estos mismos procesos también se ha comprobado la implicación del sulfuro, y cada vez hay más resultados que sugieren que la regulación está conectada con la sulfenilación y la persulfuración para modular las vías de señalización que se activan en respuesta a un estrés.

Persulfuración y autofagia

La regulación redox de proteínas tiene efectos importantes en la señalización de diversos procesos biológicos en los organismos vivos, incluida la autofagia. La autofagia es un proceso conservado en los eucariotas, muy regulado y muy complejo, que implica la degradación y reciclaje de componentes celulares. Se ha observado que el sulfuro de hidrógeno influye en varios aspectos de este proceso tanto en células animales como vegetales (Aroca *et al.*, 2022b).

En los sistemas animales, se ha demostrado la

relación entre el sulfuro y la autofagia en diversas enfermedades, aunque no hay un consenso sobre la función del H₂S en el sentido de que actúe como activador o represor de la autofagia, ya que varía según el proceso patológico. En algunas ocasiones, el sulfuro actúa regulando las rutas proautofágicas en las que interviene la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), la quinasa hepática B1 (LKB1), o la proteína quinasa activada por monofosfato de adenosina (AMPK), activándolas y, por lo tanto, activa la autofagia. En otras ocasiones, tiene la función opuesta, activando rutas anti-autofágicas como las reguladas por el factor 2 relacionado con NF-E2 (Nrf2), el receptor clase A (SR-A) o la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), y, por lo tanto, bloquea la autofagia (Wu *et al.*, 2018) (**figura 2**). Esto puede explicarse ya que, dependiendo de la enfermedad en cuestión, la inhibición excesiva de la autofagia también puede ser perjudicial para la salud celular. Sin embargo, en todos los casos descritos, la función principal del H₂S al regular la autofagia es preservar la integridad celular con el fin de proteger a las células (Wu *et al.*, 2018).

En las plantas, el papel del H₂S en la regulación de la autofagia se ha estudiado en condiciones de

estrés, y se ha demostrado que cuando la autofagia se induce por limitación nutricional, ya sea por falta de carbono inducida por la oscuridad o por la privación de nitrógeno, el H₂S regula negativamente este pro-

ceso y, además, mejora los rasgos fenotípicos típicos inducidos por el estrés (Laureano-Marin *et al.*, 2016; Álvarez *et al.*, 2012) (figura 2).

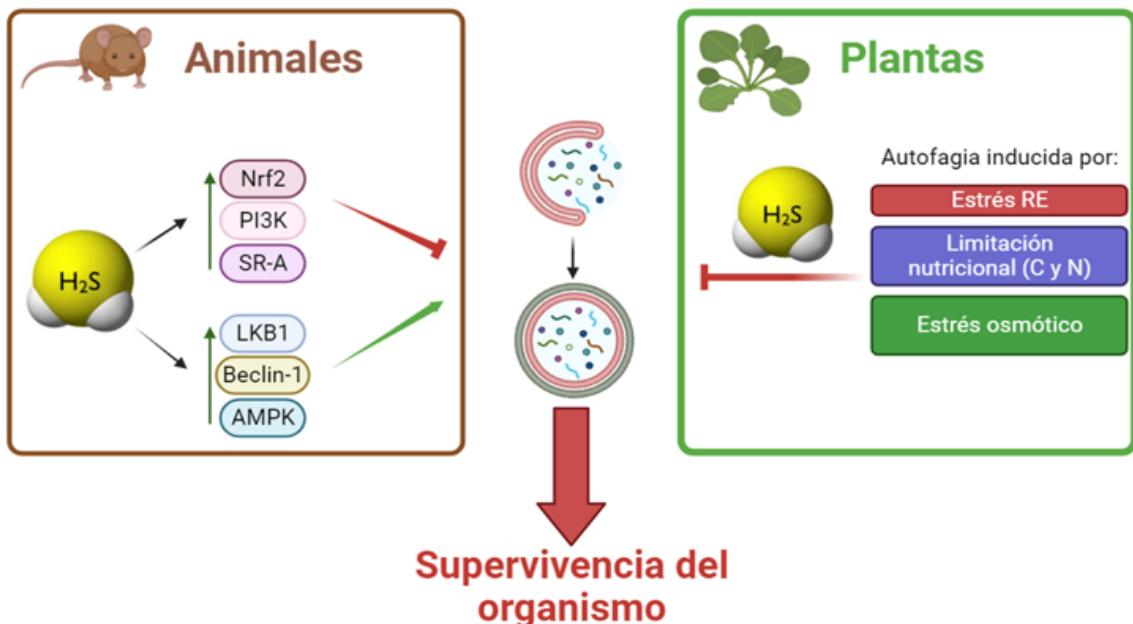


Figura 2. Representación esquemática del papel del sulfuro regulando la autofagia en animales y plantas.

También se ha demostrado que el H₂S suprime la autofagia inducida por el tratamiento con ácido abscísico (ABA) (Laureano-Marín *et al.*, 2020). El ABA, es una hormona vegetal que aumenta su concentración en respuesta a las condiciones de estrés abiótico, lo desencadena una serie de respuestas que incluyen la inducción de la autofagia (Liu *et al.*, 2012). En este caso, se ha demostrado que la presencia de H₂S en las situaciones de estrés evita la inducción de la autofagia en respuesta al ABA y, por lo tanto, desempeña un papel fundamental en la mejora del rendimiento de la planta (figura 2).

En ambos sistemas, animal y vegetal, se ha demostrado que el mecanismo por el cual el sulfuro regula la autofagia es mediante la persulfuración de ciertas dianas (Gotor *et al.*, 2022). Por ejemplo, en los animales, la persulfuración de la GAPDH impide que la CCAR2 inhiba la desacetilasa SIRT1, es decir, impide la interacción entre ellas, con lo que no se induce la autofagia (Iqbal *et al.*, 2021). En el caso de plantas, el hecho de que la persulfuración fuera el mecanismo por el que el H₂S regula la autofagia se describió incluso antes que en los animales. Se ha demostrado que varias proteínas implicadas en la progresión del autafagosoma, vesículas de doble membrana que capturan material citoplasmático y lo transportan hasta la vacuola para su degradación, son dianas de persulfuración (Aroca *et al.*, 2017), y

se ha estudiado en detalle el mecanismo por el que la persulfuración de algunas de estas dianas regula la autofagia. De esta forma, se ha descrito que la persulfuración reversible de la proteína ATG4a en el residuo específico Cys170 inhibe su actividad proteolítica, lo que impide la formación de los autafagosomas e inhibe la inducción de la autofagia (Laureano-Marín *et al.*, 2020) (figura 3).

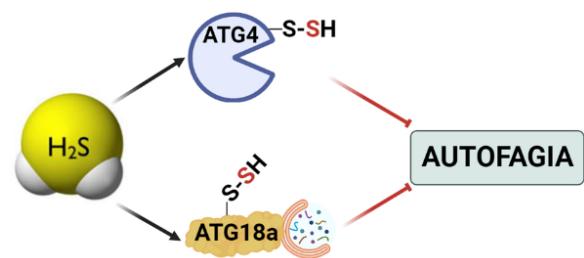


Figura 3. Representación esquemática de la regulación de las proteínas ATG4 y ATG18a por persulfuración en plantas.

También, se ha demostrado que la persulfuración reversible de otra proteína autafágica, la ATG18a, en el residuo específico Cys103 cuando hay estrés del retículo endoplásmico (RE), modula su unión a fosfolípidos específicos, lo que afecta a su unión a las membranas, lo cual retraza su liberación del autafagosoma, inhibe la progresión y maduración del

autofagosoma y, por tanto, inhibe la autofagia selectiva del RE (Aroca *et al.*, 2021a). De esta forma, en las plantas está más claro que la función de la persulfuración de dianas específicas de autofagia es regular este proceso negativamente, y probablemente permita a la planta una correcta respuesta fisiológica ante el estrés (**figura 3**).

Conclusión y perspectiva futura

En los últimos años se han identificado numerosas proteínas que son dianas de la persulfuración, y se ha demostrado que esta modificación desempeña una función crucial en la regulación de procesos biológicos fundamentales, tales como la autofagia, el metabolismo del carbono, las respuestas de las plantas al estrés abiótico, el crecimiento y el desarrollo de las plantas, así como la traducción del ARN (Aroca *et al.*, 2022a, Aroca *et al.*, 2020, Aroca *et al.*, 2021c). Más recientemente se ha descrito también su importancia como protector frente a la respuesta al estrés oxidativo que implican las condiciones no fotorrespiratorias en *Arabidopsis* (García-Calderón *et al.*, 2023, Aroca *et al.*, 2023). Aunque se está avanzando mucho en el conocimiento del mecanismo molecular del H₂S en diversos procesos biológicos y en el número de

proteínas diana, el papel del H₂S y la persulfuración en dichas proteínas debe estudiarse más a fondo para conocer el rol específico en cada situación y cada diana.

De esta manera, quedan aún varias cuestiones básicas por resolver; por ejemplo, la especificidad química en cuanto a los residuos de cisteína que se modifican aún no está completamente clara, ya que en algunos casos la cisteína modificada es el sitio activo, y en otras proteínas no lo es. Asimismo, aunque se ha descrito una interconexión con otras moléculas señalizadoras como el NO o el H₂O₂, es necesario conocer cuál es el alcance de estas interacciones en otras dianas y cómo afecta a la supervivencia celular.

Agradecimientos

Las autoras agradecen la financiación de los proyectos PID2019-109785GB-I00 y PID2022-141885NB-I00, financiados por MCIN/AEI/10.13039/501100011033/, del proyecto PRO-YEXCEL_00177 de la Junta de Andalucía, y a la Red de investigación 2022: Integración de la señalización redox en el desarrollo y la adaptación de las plantas al estrés medioambiental (RED2022-134072-T).

Referencias

- [1] Álvarez, C., *et al.*, Cysteine-generated sulfide in the cytosol negatively regulates autophagy and modulates the transcriptional profile in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2012 (24), 4621-34.
- [2] Aroca, A., *et al.*, Persulfidation proteome reveals the regulation of protein function by hydrogen sulfide in diverse biological processes in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 2017 (68), 4915-4927.
- [3] Aroca, A., *et al.*, Photorespiration: regulation and new insights on the potential role of persulfidation. *J Exp Bot*, 2023.
- [4] Aroca, A., *et al.*, Hydrogen sulfide action in the regulation of plant autophagy. *Fefs Letters*, 2022a (596), 2186-2197.
- [5] Aroca, A., *et al.*, Hydrogen Sulfide: A Key Role in Autophagy Regulation from Plants to Mammilians. *Antioxidants* (Basel), 2022b (11).
- [6] Aroca, A., *et al.*, Hydrogen Sulfide: From a Toxic Molecule to a Key Molecule of Cell Life. *Antioxidants*, 2020 (9), 621.
- [7] Aroca, A., *et al.*, Hydrogen Sulfide Signaling in Plants: Emerging Roles of Protein Persulfidation. *Front Plant Sci*, 2018 (9).
- [8] Aroca, A., *et al.*, S-sulfhydration: a cysteine posttranslational modification in plant systems. *Plant Physiology*, 2015 (168), 334-342
- [9] Aroca, A., *et al.*, Persulfidation of ATG18a regulates autophagy under ER stress in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021a (118), e2023604118.
- [10] Aroca, A., *et al.*, Hydrogen sulfide signaling in plant adaptations to adverse conditions: molecular mechanisms. *J Exp Bot*, 2021b (72), 5893-5904.
- [11] Aroca, A., *et al.*, Supplementary material for manuscript titled: Hydrogen sulfide signaling in plant adaptations to adverse conditions: molecular mechanisms. *Zenodo*, 2021c.
- [12] Chen, J., *et al.*, Hydrogen sulphide enhances photosynthesis through promoting chloroplast biogenesis, photosynthetic enzyme expression, and thiol redox modification in *Spinacia oleracea* seedlings. *J Exp Bot*, 2011 (62), 4481-93.
- [13] Filipovic, M. R., *et al.*, Chemical Characterization of the Smallest S-Nitrosothiol, HSNO; Cellular Cross-Talk of H2S and S-Nitrosothiols. *J. Am. Chem. Soc.*, 2012 (134), 12016.
- [14] Filipovic, M. R., *et al.*, Chemical Biology of H2S Signaling through Persulfidation. *Chemical Reviews*, 2018 (118), 1253-1337.
- [15] García-Calderón, M., *et al.*, Persulfidation protects from oxidative stress under nonphotorespiratory conditions in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 2023 (238), 1431-1445.
- [16] Garcia-Mata, C., *et al.*, Hydrogen sulphide, a novel gasotransmitter involved in guard cell signalling. *New Phytol*, 2010 (188), 977-84. °7°7°7
- [17] Gotor, C., *et al.*, Persulfidation is the mechanism underlying sulfide-signaling of autophagy. *Autophagy*, 2022 (18), 695-697.
- [18] Gotor, C., *et al.*, Signaling by hydrogen sulfide and cyanide through post-translational modification. *J Exp Bot*, 2019 (70), 4251-4265.
- [19] Gotor, C., *et al.*, Sulfide as a signaling molecule in autophagy. *Autophagy*, 2013 (9), 609-11.

-
- [20] Hellmich, M. R., *et al.*, Hydrogen Sulfide and Cancer. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2015 (230), 233.
- [21] Iqbal, I. K., *et al.*, Hydrogen sulfide-induced GAPDH sulphhydration disrupts the CCAR2-SIRT1 interaction to initiate autophagy. *Autophagy*, 2021 (17), 3511-3529.
- [22] Jurado-Flores, A., *et al.*, Label-Free Quantitative Proteomic Analysis of Nitrogen Starvation in Arabidopsis Root Reveals New Aspects of H₂S Signaling by Protein Persulfidation. *Antioxidants*, 2021 (10), 508.
- [23] Kimura, J., Message from the editor's office. *Muscle & Nerve*, 1990 (13), 1095-1095.
- [24] Laureano-Marín, A. M., *et al.*, Abscisic Acid-Triggered Persulfidation of the Cys Protease ATG4 Mediates Regulation of Autophagy by Sulfide. *Plant Cell*, 2020 (32), 3902-3920.
- [25] Laureano-Marin, A. M., *et al.*, Negative Regulation of Autophagy by Sulfide Is Independent of Reactive Oxygen Species. *Plant Physiol*, 2016 (171), 1378-91.
- [26] Liu, Y., *et al.*, Autophagy: pathways for self-eating in plant cells. *Annu Rev Plant Biol*, 2012 (63), 215-37.
- [27] Mustafa, A. K., *et al.*, H₂S Signals Through Protein S-Sulphydratation. *Sci. Signal.*, 2009 (2), ra72.
- [28] Nicholls, P., *et al.*, Sulphide as an Inhibitor and Electron Donor for the Cytochrome c Oxidase System. *Can. J. Biochem.*, 1982 (60), 613.
- [29] Offre, P., *et al.*, Archaea in Biogeochemical Cycles. 2013 (67), 437-457. Paul, B. D., *et al.*, Modes of physiologic H₂S signaling in the brain and peripheral tissues. *Antioxid Redox Signal*, 2015 (22), 411-23.
- [30] Reiffenstein, R. J., *et al.*, Toxicology of hydrogen sulfide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1992 (32), 109-34.
- [31] Wang, R., Gasotransmitters: growing pains and joys. *Trends in Biochemical Sciences*, 2014 (39), 227-232.
- [32] Wu, D., *et al.*, Hydrogen sulfide and autophagy: A double edged sword. *Pharmacol Res*, 2018 (131), 120-127.
- [33] Zhang, H., *et al.*, Hydrogen sulfide promotes wheat seed germination and alleviates oxidative damage against copper stress. *J Integr Plant Biol*, 2008 (50), 1518-29.
- [34] Zhang, H., *et al.*, Hydrogen sulfide promotes root organogenesis in Ipomoea batatas, Salix matsudana and Glycine max. *J Integr Plant Biol*, 2009 (51), 1086-94.
- [35] Zivanovic, J., *et al.*, Selective Persulfide Detection Reveals Evolutionarily Conserved Antiaging Effects of S-Sulphydratation. *Cell Metab*, 2019 (30), 1152-1170.e13.