



---

**Universidad de Valladolid**

**MÁSTER EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA  
TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**TÍTULO:  
INFLUENCIA DE LOS ÉTERES DE  
FOSFOLIPIDOS DE ETANOLAMINA EN LA  
MODULACIÓN DE LA FERROPTOSIS EN  
MACRÓFAGOS**

**AUTOR:** NATALIA PÉREZ RODRÍGUEZ

**TUTORES:** Dr. DAVID BALGOMA HERNANDO

Prof. JESÚS BALSINDE RODRÍGUEZ

**VALLADOLID, SEPTIEMBRE 2023**



## INDICE

RESUMEN.....	3
ABREVIATURAS .....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. Puntos clave de la señalización de la ferroptosis .....	6
1.1.1. Eje sistema Xc <sup>-</sup> -GSH-GPX4.....	7
1.1.2. El hierro .....	7
1.2. El metabolismo lipídico asociado a ferroptosis.....	8
1.2.1. El papel de los lípidos en la ferroptosis.....	9
1.3. La ferroptosis y su papel en diferentes patologías. ....	11
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1. Células y cultivos celulares.....	13
3.1.1. Recogida y contaje celular.....	13
3.2. Tratamientos relacionados con la ferroptosis.....	14
3.2.1. Inductores.....	14
3.2.2. Inhibidores.....	14
3.3. Tratamientos celulares con especies de PE .....	14
3.4. Análisis de expresión génica por RT-qPCR.....	14
3.4.1. Extracción de RNA y cuantificación .....	14
3.4.2. Síntesis de cDNA .....	15
3.4.3. <i>Primers</i> .....	15
3.4.4. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR).....	15
3.5. Análisis de las especies de fosfolípidos de etanolamina (PE) mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS).....	16
3.6. Análisis estadístico .....	17
4. RESULTADOS .....	18
4.1. Confirmación de muerte celular por ferroptosis con RSL3 .....	18
4.2. Puesta a punto del método de incorporación de especies de PE en el interior celular. ....	20
4.3. Efecto de plasménidos de PE en regulación de la síntesis de éteres de PE. .	21
4.4. Efecto de plasménidos de PE en situación de ferroptosis.....	23
5. DISCUSION.....	25
6. CONCLUSIONES .....	27
7. BIBLIOGRAFÍA.....	28

## RESUMEN

La ferroptosis es un tipo de muerte celular debida a la acumulación de especies reactivas de oxígenos (ROS) dependiente de hierro, y durante la cual se ven inhibidos diferentes mecanismos antioxidantes de la célula. Está descrito que durante el proceso ferroptótico suceden una serie de cambios celulares entre los cuales se encuentran cambios metabólicos lipídicos. Dentro de este grupo, cabe destacar el papel de los fosfolípidos de membrana y más en concreto, los éteres de etanolamina (PE). La localización de estas especies lipídicas en la cara interna de la membrana parece tener relación con la susceptibilidad a sufrir ferroptosis.

Actualmente, se ha vinculado la ferroptosis con algunas patologías del sistema inmune. Es por ello, que el propósito de este trabajo fue estudiar el perfil de los éteres lipídicos en diferentes condiciones celulares en la línea celular RAW264.7 mediante HPLC-MS y su posible vínculo con las enzimas implicadas en la biosíntesis de estas especies lipídicas aplicando técnicas, como qPCR. En este estudio, se han asentado las bases para inducir la ferroptosis en macrófagos y se ha podido ver la importancia de los éteres de PE durante este proceso, a pesar de la complejidad de estudio de estas especies. Estos resultados van a ser clave para investigaciones futuras sobre la modulación de la inflamación por la ferroptosis. Dicha modulación permitirá desarrollar nuevas estrategias en las enfermedades con un componente inflamatorio.

## ABSTRACT

Ferroptosis is a type of cell death caused by the accumulation of iron-dependent reactive oxygen species (ROS), during which various cell antioxidant mechanisms are inhibited. It has been described that during the ferroptotic process, a series of cellular changes occur, including lipid metabolic changes. Within this group, it is worth noting the role of membrane phospholipids, specifically ethanolamine ethers (PE). The localization of these lipid species on the inner side of the membrane appears to be related to susceptibility to undergo ferroptosis.

Currently, ferroptosis has been linked to some immune system pathologies. Therefore, the purpose of this study was to investigate the profile of lipid ethers in different cellular conditions in the RAW264.7 cell line using HPLC-MS and their possible connection with the enzymes involved in the biosynthesis of these lipid species using techniques such as qPCR. In this study, the groundwork has been laid for inducing ferroptosis in macrophages, and the importance of PE ethers during this process has been observed, despite the complexity of studying these species. These results will be crucial for future research on the modulation of inflammation by ferroptosis. Such modulation will allow for the development of new strategies in diseases with an inflammatory component.

## **ABREVIATURAS**

AA: ácido araquidónico

BSA: albumina de suero bovino

CD: ciclodextrina

DAPMs: patrones moleculares asociados a lesión

DMSO: dimetilsulfóxido

ePE: plasmanilos de etanolamina

Éteres de PE: éteres de fosfolípidos de etanolamina

FA: ácido graso

Fer-1: ferostatina-1

GPX4: glutatión peroxidasa 4

GSH: tripéptido ácido glutámico-cisteína-glicina (también conocido como glutatión)

HPLC-MS: cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas

MUFA: ácido graso monoinsaturado

PC: fosfolípido de colina

PE: fosfolípido de etanolamina

PL: fosfolípido

pPE: plamenilos de etanolamina

PS: fosfolípido de serina

PUFA: ácido graso poliinsaturado

ROS: especies reactivas de oxígeno

Sistema X<sub>c</sub><sup>-</sup>: antiportador cistina-glutamato

TF: transferrina

TFRC: transportador de transferrina

v/v: relación entre el volumen del soluto y el volumen de la disolución

## 1. INTRODUCCIÓN

El ciclo vital de las células es un complejo mecanismo que está regulado bajo la interconexión de diferentes proteínas, citoquinas y factores de señalización. Los eventos de proliferación y muerte celular forman parte de este ciclo celular y una correcta regulación de estos es imprescindible para una buena homeostasis celular [1,2]. La muerte celular es un proceso que está presente tanto en procesos fisiológicos como en procesos fisiopatológicos. Regula una amplia variedad de eventos como el desarrollo embrionario, el mantenimiento de los órganos, el envejecimiento o la respuesta inmune [3]. A su vez, una muerte celular descontrolada o una eliminación defectuosa de células muertas puede ocasionar graves daños al organismo. Esto puede verse reflejado en ciertas enfermedades cardiovasculares, como la aterosclerosis. Por un lado, se asocia una apoptosis disminuida en los inicios de la enfermedad. Por otro lado, una eliminación defectuosa de las células apoptóticas puede derivar en ocasionar necrosis secundaria en dichas células. Este hecho conlleva la salida de elementos nocivos al medio extracelular, promoviendo la aparición de la aterosclerosis [4].

A lo largo de la historia se han descrito diferentes mecanismos de muerte celular, clasificándose en función de los procesos biológicos que las distinguen [5]. Por un lado, tenemos la muerte celular no programada o necrosis, que se caracteriza por una muerte celular descontrolada, cursando con procesos químicos, físicos y mecanismos de estrés. Durante este proceso se rompe la membrana celular y se vierte todo el contenido al medio extracelular, dañando la zona. Por otro lado, se encuentra la muerte celular programada, incluyendo la apoptosis. Durante la apoptosis se activan diferentes cascadas de señalización celular, donde participan elementos característicos como las caspasas. A nivel morfológico, se caracteriza por la formación de cuerpos apoptóticos, los cuales son eliminados por las células del sistema inmune, como los macrófagos, impidiendo que se genere daño en la zona de lesión [6,7].

En 2012, Dixon *et al.* acuñaron el término ferroptosis para un tipo de muerte celular programada no apoptótica [8]. La ferroptosis fue descrita como un mecanismo de muerte debido a la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) dependiente de hierro, en el que se ven implicados diferentes procesos de inhibición de los mecanismos antioxidantes de la célula [9].

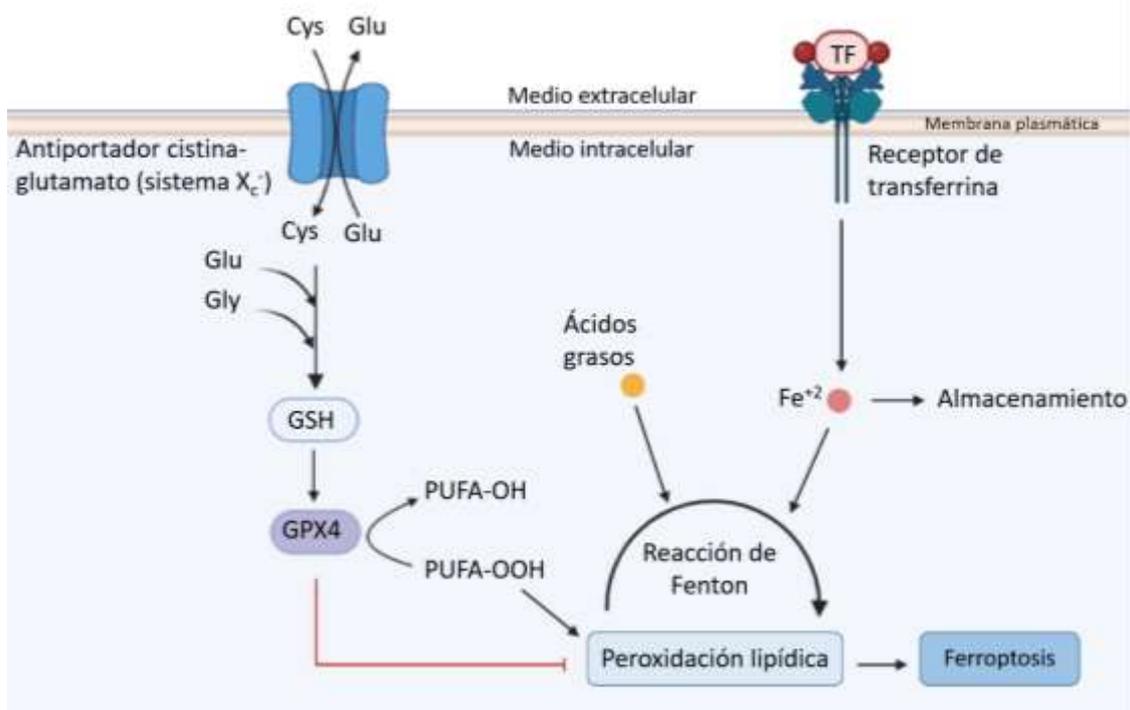
Durante la ferroptosis, como en cualquier tipo de muerte celular, en la célula ocurren una serie de cambios bioquímicos, morfológicos y genéticos. A nivel bioquímico, diferentes rutas del metabolismo celular se ven implicadas. El metabolismo lipídico, el metabolismo de aminoácidos y la respiración celular participan activamente durante este proceso, destacando la síntesis de fosfolípidos con ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), el metabolismo del ion hierro y la producción de ROS [9]. Estos procesos son clave ya que favorecen la peroxidación lipídica, y con ello, provocan un aumento de la sensibilidad de la célula a sufrir ferroptosis.

Estudios recientes demuestran que también hay cambios a nivel génico durante la ferroptosis [10]. Por ejemplo, se ha visto que el factor de transcripción Yap1 aumenta la transcripción de los genes *Tfrc* y *Acs14*, que codifican para el receptor de transferrina y la enzima sintetasa de acil-CoA de cadena larga de la familia 4, respectivamente [11]. Durante este proceso, también se ve modulada la expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas con el metabolismo lipídico. Entre otros, cabe destacar los genes *Far1* y *Peds1*, que corresponden con las proteínas reductasa 1 de ácidos grasos y TMEM189 o desaturasa de plasmaniletanolamina, respectivamente.

Por último, los cambios morfológicos implicados en el proceso ferroptótico no son tan agresivos como los que se desarrollan en otros tipos de muerte celular. Durante este proceso, la célula adquiere una forma redondeada similar a la forma necroptótica, pero no hay rotura de la membrana ni hinchazón de la célula ni de sus orgánulos. Los núcleos mantienen su estructura, a diferencia de lo ocurrido durante la apoptosis, que se condensan y forman cuerpos apoptóticos. [12]. En este caso, la acumulación de lípidos peroxidados, que actúan como patrones moleculares asociados a lesión o DAPMs [13] y la acumulación de ROS producen un aumento de la permeabilidad de la membrana celular y generan daños a nivel mitocondrial, modificando la estructura y actividad de las membranas y las crestas mitocondriales [14].

### 1.1. Puntos clave de la señalización de la ferroptosis

La ferroptosis se desarrolla en tres etapas: una inicial, caracterizada por la pérdida de las defensas antioxidantes de la célula; una segunda que cursa con un aumento del ion hierro intracelular; y una tercera, en la que tiene lugar la peroxidación lipídica [15]. Estos puntos clave se muestran esquematizados en la **Figura 1**. La inhibición del antiportador cistina-glutamato (sistema X<sub>c</sub><sup>-</sup>), la reducción del tripéptido ácido glutámico-cisteína-glicina, también conocido como glutatión (GSH) y la inhibición de la glutatión peroxidasa 4 (GPX4) son los principales mecanismos antioxidantes de la células, y por lo tanto, los posibles puntos de inicio de la ferroptosis [8].



**Figura 1. Puntos clave de la señalización de la ferroptosis.** El antiportador de cistina-glutamato (sistema X<sub>c</sub><sup>-</sup>) media la entrada de cistina, la cual será reducida a cisteína. Esta pasará a formar parte de GSH, quien activa la GPX4. Esta enzima tiene un papel protector dentro de la célula, reduciendo los hidroperóxidos. El receptor de transferrina, introduce el hierro al interior celular. Los ácidos grasos de la célula, el hierro y los lípidos peroxidados van a favorecer el proceso de peroxidación de los fosfolípidos de membrana, dando lugar a la muerte celular por ferroptosis. Abreviaturas: Cys, cisteína; Glu, glutamato; Gly, glicina; GSH, glutatión; GPX4, glutatión peroxidasa 4; PUFA-OOH, peróxidos de ácidos grasos poliinsaturados; PUFA-OH, alcoholes de ácidos grasos poliinsaturados; TF, transferrina).

### 1.1.1. Eje sistema Xc<sup>-</sup>-GSH-GPX4

El **antiportador de membrana cistina-glutamato (sistema Xc<sup>-</sup>)** se encarga de introducir al interior celular cistina extracelular, a la vez que se transporta al exterior glutamato, en un ratio 1:1. Dentro de la célula, la cistina es reducida a cisteína. Este aminoácido, junto con el ácido glutámico y la glicina, forman **el tripéptido GSH**. Esta molécula es uno de los principales mecanismos antioxidantes de la célula y su disponibilidad en el interior celular va a determinar la actividad de la GPX4, ya que actúa como cofactor de esta enzima. La **glutación peroxidasa 4 o GPX4** tiene como función proteger a la célula del daño oxidativo. Se encarga de la reducción de los lípidos de membrana hidropoxidados, los cuales son tóxicos para la célula, para dar lugar a alcoholes lipídicos [16,17]. El centro activo de la GPX4 está formado por triptófano, glutamina, asparagina y selenio. Cabe destacar la importancia de este último elemento, ya que tiene un papel importante en la regulación del estrés oxidativo de las células formando parte del centro catalítico de las enzimas antioxidantes [9].

La desregulación o la inhibición de algún componente del eje sistema Xc<sup>-</sup>-GSH-GPX4 puede provocar el inicio del proceso ferroptótico. Por ejemplo, un aumento de glutamato extracelular o carencias genéticas del gen que codifica para el antiportador cistina-glutamato pueden ser hechos que provoquen el inicio de este proceso [18], ya que GSH no sería sintetizado y la actividad de GPX4 se vería disminuida. Esto provocaría un aumento de la cantidad de lípidos oxidados por ROS en el interior celular y favorecería un ambiente pro-ferroptótico [19]. La ferroptosis, además de existir de forma fisiológica, también puede ser inducida mediante fármacos como la erastina, que inhibe el sistema Xc<sup>-</sup> [20] u otras como RSL3 [21], FINO2 [22] y FIN56 [23], que inhiben de forma directa el sistema GPX4.

### 1.1.2. El hierro

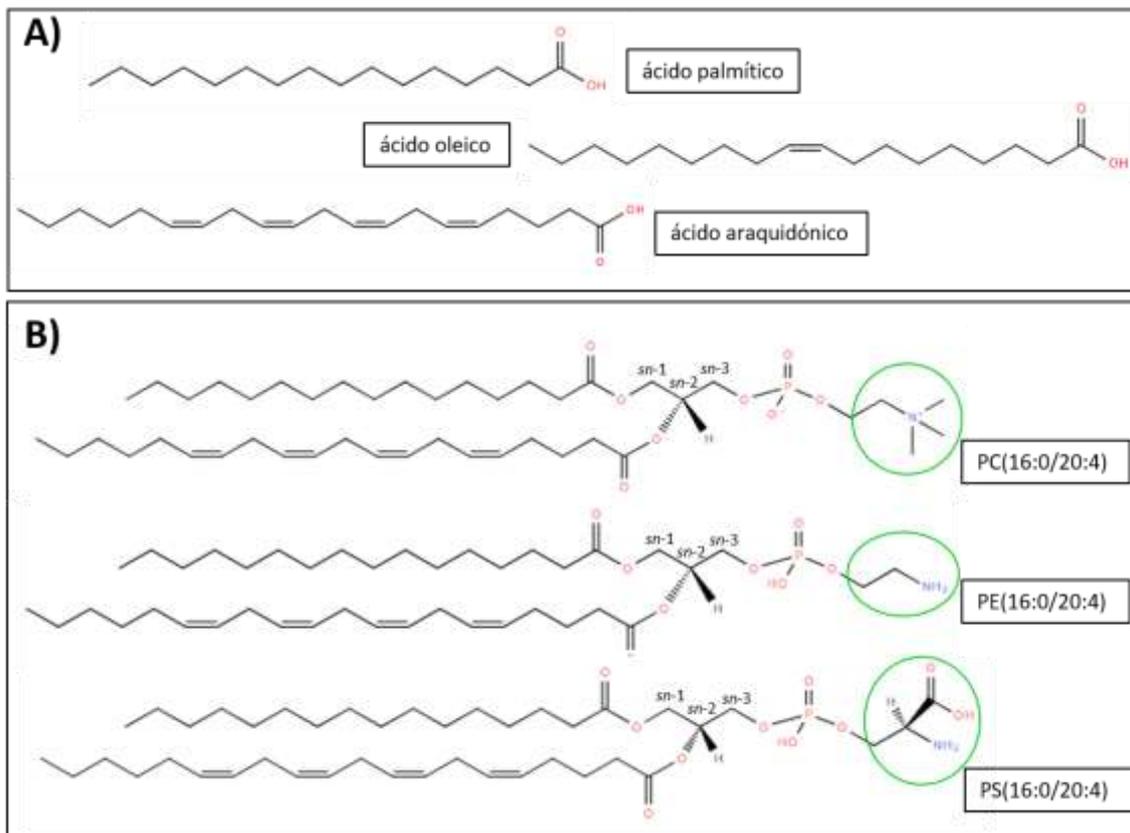
**El hierro** es un elemento celular muy importante en numerosos procesos fisiológicos y metabólicos gracias a su capacidad de ser donador/aceptor de electrones en reacciones redox. Es por ello, por lo que tanto su cantidad como su metabolismo se encuentran altamente regulados en el interior celular, ya que si no fuera así, podría provocar efectos tóxicos para la célula. La mayoría del hierro extracelular está unido a la transferrina (TF) y es endocitado al interior celular mediante el transportador de transferrina (TFRC). Dentro de la célula es almacenado en ferritina. Su acumulación intracelular excesiva causa daño oxidativo y puede llegar a provocar la muerte de la célula [9].

Durante la ferroptosis, se produce un aumento del ion ferroso en el interior celular. El hierro se ve partícipe tanto en la producción de ROS al reaccionar con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como en la peroxidación lipídica directamente a través de reacciones de tipo Fenton. Aumentado las proteínas implicadas en el almacenamiento de hierro, la cantidad de hierro disponible para su utilización en estas reacciones será menor. Por lo que, modificando las condiciones de estas proteínas de almacenamiento, como la ferritina, se puede aumentar o disminuir la sensibilidad a ferroptosis.

## 1.2. El metabolismo lipídico asociado a ferroptosis.

El metabolismo de los lípidos es el último punto clave durante el proceso de ferroptosis. Los lípidos son un grupo de moléculas amplio y muy diverso con funciones importantes dentro del organismo, formando parte de las membranas celulares, participando en rutas de señalización y siendo el principal almacén de energía [24]. También, cabe destacar la importancia de los lípidos en procesos patológicos como la aterosclerosis, la colitis, o en el complejo proceso de la inflamación [25].

Los lípidos comprenden un grupo muy heterogéneo de moléculas tanto a nivel estructural como funcional, por lo que no es fácil su clasificación [26]. El lípido más sencillo descrito es el ácido graso (FA) (**Figura 2A**). Es una molécula formada por una cadena hidrocarbonada que tiene como grupo funcional principal un grupo carboxilo. Pueden presentar dobles enlaces o insaturaciones a lo largo de su estructura, denominándose ácidos grasos insaturados. En función del número de insaturaciones presentes, se clasifican en ácidos grasos con una sola insaturación, denominados monoinsaturados o MUFAs, como el ácido oleico; y en ácidos grasos con varias insaturaciones denominados poliinsaturados o PUFAs, como el ácido araquidónico. En cambio, si a lo largo de su estructura no presentan insaturaciones, se denominan ácidos grasos saturados, como por ejemplo el ácido palmítico. (**Figura 2A**).



**Figura 2. Estructura de ejemplos de lípidos principales. A) Ácidos grasos.** Ácido palmítico: ejemplo de ácido graso (saturado). Ácido oleico: ejemplo de MUFA (ácido graso monoinsaturado). Ácido araquidónico: ejemplo de PUFA (ácido graso poliinsaturado). **B) Fosfolípidos.** Resaltado en los círculos verdes, la cabeza polar unida al grupo fosfato en la posición sn-3 del glicerol. PC, fosfatidilcolina; PE, fosfatidiletanolamina; PS, fosfatidilserina. Todos ellos con un ácido graso saturado (16:0) en posición sn-1 del glicerol y un PUFA (20:4, ácido araquidónico) en posición sn-2 del glicerol

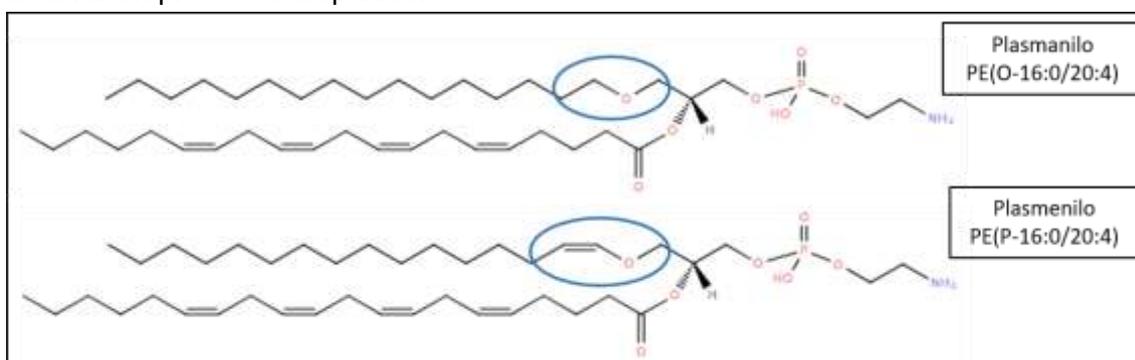
Un grupo de lípidos a destacar en la ferroptosis son los fosfolípidos (PL), siendo uno de los principales componentes de las membranas biológicas [27]. Se componen de una molécula de glicerol a la cual están unidos dos ácidos grasos y un grupo fosfato. En la posición sn-3 del glicerol se encuentra el grupo fosfato, siendo la cabeza polar del PL, y a él, se unen otras moléculas como la colina, serina o etanolamina, formando moléculas tales como los fosfolípidos de colina (PC), fosfolípidos de serina (PS) y fosfolípidos de etanolamina (PE), respectivamente (**Figura 2B**). Los ácidos grasos de estas moléculas se encuentran esterificados en las posiciones sn-1 y sn-2 del glicerol. Serán las rutas metabólicas de acilación, liberación y reacilación las que determinen la localización específica de los ácidos grasos, estando los PUFAs preferentemente en la posición sn-2 del glicerol. El PUFA más común es el ácido araquidónico (AA), siendo mayoritario en las membranas lipídicas y el principal precursor de los mediadores lipídicos de la inflamación (prostaglandinas y leucotrienos) a través de la actividad de las ciclooxigenasas y las lipoxigenasas [28].

### 1.2.1. El papel de los lípidos en la ferroptosis

En el proceso de ferroptosis, el aumento del hierro intracelular provoca un aumento de la peroxidación de fosfolípidos de membrana con ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), lo que conduce a la muerte celular.

El daño producido por los lípidos peroxidados puede evitarse farmacológicamente con la ferrostatina-1 (Fer-1), entre otras moléculas. Se trata de un antioxidante activo que atrapa a los radicales hidroxilos que se producen en el inicio del proceso ferroptótico debido a la acción del ion ferroso sobre los hidroperóxidos lipídicos. A día de hoy, es considerado uno de los inhibidores más potentes de ferroptosis [29].

Se ha descrito que la presencia de, en concreto, **ésteres de fosfolípidos de etanolamina (ésteres de PE)** en la cara interna de la membrana celular sensibiliza a la célula a entrar en un proceso ferroptótico [30]. Es por ello, que la forma y la composición de la membrana celular juega un papel crucial en este proceso. En comparación con otros fosfolípidos, estos ésteres de PE se caracterizan por tener una cadena hidrocarbonada unida por un enlace éter aislado (plasmanil) o por un viniléter (plamenil o plasmalógeno) en la posición sn-1 del esqueleto de glicerol, dando lugar a plasmanilos de etanolamina (ePE) y plamenilos de etanolamina (pPE) (**Figura 3**). En la posición sn-2 del glicerol se va a encontrar generalmente un PUFA esterificado, como el AA. La presencia de fosfolípidos con PUFAs aumenta de forma significativa la sensibilización a ferroptosis en un contexto oxidante en el interior celular, ya que son susceptibles de ser peroxidados. Por lo que se podría decir que en función de la cantidad de estas especies presentes en la célula y su localización, variará el grado de susceptibilidad de la célula a entrar en proceso ferroptótico.

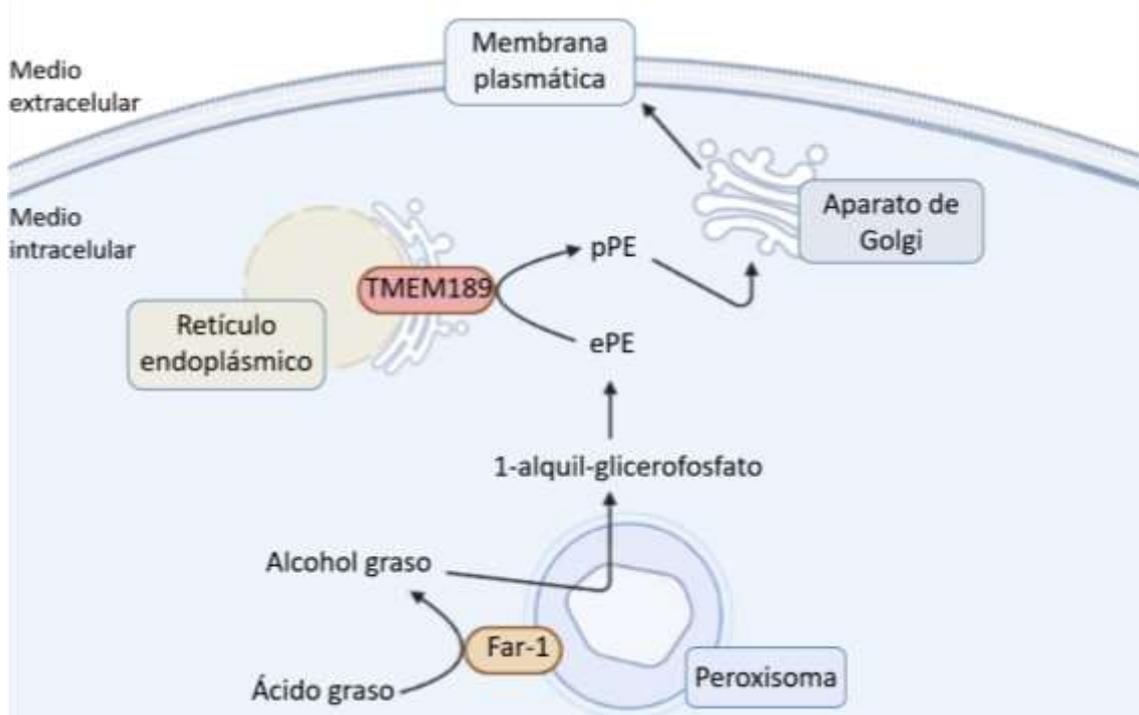


**Figura 3. Estructura de los ésteres de fosfolípidos de etanolamina.** Ejemplos de plasmanilo de etanolamina [ePE; PE(O-16:0/20:4)] y plamenilos de etanolamina o plasmalógenos de etanolamina [pPE; PE(P-16:0/20:4)]. Resaltado en los círculos azules los enlaces característicos de cada una de las moléculas.

El primer factor que regula el efecto de los niveles de los éteres de PE es su síntesis. El **proceso de síntesis** de los éteres de PE tiene una etapa inicial que se desarrolla en el peroxisoma y continúan su procesamiento en el retículo endoplasmático [31] (**Figura 4**).

El **peroxisoma** es un orgánulo celular con múltiples funciones. Entre ellas se encuentran la degradación inicial de FAs de cadena muy larga y ramificada, la eliminación de especies ROS citosólicas y la iniciación de la biosíntesis de los éteres de PE [32]. Durante el proceso de síntesis de éteres de PE participan numerosas enzimas, en la que cabe destacar la proteína de membrana reductasa 1 de ácidos grasos o Far1, la cual está codificada por el gen *Far1*. Esta enzima cataliza la reducción de los ácidos grasos a alcoholes grasos, siendo los principales sustratos los ácidos grasos saturados C16 y C18 [33,34]. Diferentes estudios han determinado que la regulación de esta enzima depende del nivel de plasmalógenos celulares [35]. Se han descrito mutaciones en el gen que codifica para esta enzima que correlacionan con un trastorno peroxisomal que conlleva epilepsia, cataratas y discapacidad intelectual [36].

El **retículo endoplasmático** es el segundo orgánulo implicado en el proceso de síntesis de éteres de PE, debido a la presencia de la enzima desaturasa de plasmaniletanolamina o TMEM189 en la membrana de este orgánulo. Esta enzima está codificada por el gen *Peds1* y se encarga de introducir el doble enlace en la plasmaniletanolamina (ePE) para formar plasmeniletanolamina o plasmalógeno (pPE). Cuando la actividad de esta enzima se ve disminuida o anulada, la síntesis de pPE se ve afectada, de tal forma que su cantidad será deficiente [37].



**Figura 4. Esquema de la síntesis de éteres de PE.** La enzima peroxisomal, Far-1, cataliza la reducción de los ácidos grasos a alcoholes grasos. Estas moléculas entran en el peroxisoma, donde sufren una serie de reacciones, hasta formar 1-alkilglicerofosfato, el cual dará lugar a plasmanilo de PE (ePE) ya fuera del peroxisoma. La enzima TMEM189 catalizará la reacción de plasmanilos de PE (ePE) a plasmenilos de PE (pPE) en el retículo endoplasmático. Estos pPE pasarán por el aparato de Golgi, y finalmente, se incorporarán en la membrana plasmática.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la composición de la membrana y más en concreto, la presencia de éteres de PE en la cara interna de esta, se relaciona con el proceso de ferroptosis. Estudios recientes muestran que los plasmenilos de PE están enriquecidos en la cara intracelular de la membrana plasmática [38] y relacionan dicha localización con la regulación de la síntesis de estas moléculas. Otras investigaciones defienden la idea de que la síntesis de estas especies es clave en el proceso ferroptótico [30,32]. Es por ello que enzimas que median en la síntesis de los éteres de PE, como son Far1 y TMEM189, van a ser claves para el estudio de la regulación de la ferroptosis. A día de hoy, se sabe que un incremento de plasmenilos de PE en la cara interna de la membrana, disminuye la actividad de la enzima Far1, siendo una enzima participe de la etapa inicial de su síntesis [39]. En cambio, el papel de TMEM189 todavía no está tan definido. Hay autores que mencionan un posible papel protector de esta enzima frente a la ferroptosis [30] mientras que otros no le dan ninguna relevancia en este proceso [32].

### 1.3. La ferroptosis y su papel en diferentes patologías.

El término de ferroptosis como muerte celular inicialmente fue descrito en una línea celular cancerígena [14]. Desde entonces, numerosos laboratorios a lo largo del mundo se han centrado en su estudio con el fin de encontrar nuevas terapias contra el cáncer. Diversos estudios posicionan a la ferroptosis como un mecanismo crítico de evasión de tumores [40].

Otros investigadores, como Liang *et al.*, han descrito el proceso ferroptótico como un posible vínculo de unión entre muerte celular, señalización y metabolismo lipídico. Como ya se ha mostrado anteriormente, el evento central de la ferroptosis es la peroxidación lipídica. Es por ello, que el papel de los lípidos durante este proceso es clave [41].

Además de participar en el proceso ferroptótico, los lípidos están implicados en numerosos procesos celulares, entre los que se encuentra la respuesta inmunitaria [42]. Durante este proceso cabe destacar la importancia de los fosfolípidos (PL) de membrana, ya que juegan un papel importante en el reconocimiento e inicio de la cascada de señalización de respuestas a daño, como es la inflamación. Durante dicho proceso participan numerosos mediadores entre los que se encuentran proteínas y lípidos, que potencian esta respuesta de defensa. Es por ello, que es necesario una fina regulación del metabolismo lipídico dentro de la célula para una buena respuesta inflamatoria.

Actualmente, numerosos estudios vinculan la inflamación con el proceso ferroptótico. El sistema inmunitario puede verse comprometido por la ferroptosis mediante dos vías diferentes. Por un lado, la función de las células inmunitarias puede verse afectada. Por ejemplo, los macrófagos pueden disminuir su actividad macrofágica si sufren ferroptosis. Por otro lado, las células ferroptóticas pueden ser diana de las células del sistema inmune, siendo señal de respuestas específicas y/o inflamatorias [15]. Estudios experimentales recientes han revelado cómo la ferroptosis puede tener un papel pro-inflamatorio en situaciones patológicas debida a una lesión por isquemia-reperusión, lesión renal aguda o lesión cerebral secundaria. Inhibidores del proceso ferroptótico, como la ferrostatina-1, podrían correlacionar con mejoras en dichas patologías debido a sus efectos antiinflamatorios [43].

En este contexto, estudiar y conocer los mecanismos específicos de la ferroptosis en células inflamatorias ayudará a encontrar nuevas estrategias terapéuticas en las enfermedades con un componente inflamatorio, tales como la enfermedad de Crohn, diabetes o artritis reumatoide. En último término, dichas estrategias terapéuticas mejoraran la calidad de vida de los pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas.

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Dada la potencial importancia de la ferroptosis en diversas patologías inflamatorias y la posible relación entre la localización de éteres de PE en la membrana celular y la sensibilidad a la ferroptosis, en este trabajo nos planteamos la hipótesis de que un aumento de la presencia de estas especies lipídicas puede modificar la susceptibilidad de la célula a sufrir ferroptosis.

Para ello, el objetivo general de este trabajo es el estudio del perfil de éteres lipídicos en diferentes condiciones celulares y su posible vínculo con las enzimas implicadas en la biosíntesis de estas especies lipídicas: Far1 y TMEM189.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### MATERIALES QUÍMICOS

Dimetilsulfóxido (DMSO); metanol; “*RAS-selective lethal*” (RSL3); “*eradicator of RAS and ST-expressing cells*” (erastina); FINO2 (PubChem CID: 23815485). y FIN56 (PubChem CID:118986699). Todos ellos de la casa comercial Caymanchem; Ferrostatina-1 (Fer-1) (Sigma-Aldrich); Las especies de PE (Glicerofosfolípidos de etanolamina, o más comúnmente llamados fosfolípidos de etanolamina) usadas: PE(16:0/18:1), PE(P-18:0/18:1), PE(P-18:0/22:6), todas ellas de la casa comercial Avanti. Albumina de suero bovino (BSA); ciclodextrina (CD). Para la cromatografía, se utilizó dos fases móviles: A (agua/acetonitrilo/isopropanol 50:25:25, v/v/v, 2 mM de bicarbonato de amonio) y B (acetonitrilo/isopropanol, 50:50, v/v, 2 mM de bicarbonato de amonio).

#### MATERIALES DE CULTIVO

DMEM 1X (Dulbecco’s Modification of Eagle’s Medium) con 4,5 g/L de glucosa y piruvato de sodio sin glutamina (Corning); tripsina 0,05% (1X) (Cytiva); Mezcla de Penicilina, estreptomocina y glutamina (P/S/G) (100X) (Gibco); Suero fetal bovino (FBS) (Gibco); PBS (tampón fosfato alcalino); Trypan Blue Dye 0,4% (Bio-Rad)

##### 3.1. Células y cultivos celulares.

Se utilizó la línea celular RAW267.4. Es una línea de macrófagos procedente de un tumor maligno establecido en un ratón macho BALB/c inducido con el virus de leucemia murina de Abelson. Esta línea celular se mantuvo en medio DMEM suplementado con FBS al 10% (v/v) y una mezcla de glutamina, penicilina y estreptomocina al 1% a 37°C en atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>. Para su mantenimiento, las células se despegaron mediante raspado.

Para los diferentes estímulos y tratamientos, las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos (9,6 cm<sup>2</sup>/pocillo) (Thermo Scientific) con una confluencia de 1,5x10<sup>6</sup> células/pocillo. Se incubaron durante una noche (o/n, overnight en inglés) a 37°C en atmósfera humidificada con 5% CO<sub>2</sub> en medio DMEM 1% P/S/G y 1% FBS. El día del tratamiento, los macrófagos se incubaron durante 2 horas en medio DMEM 1% P/S/G y sin suero a 37°C en atmósfera humidificada con 5% CO<sub>2</sub>.

##### 3.1.1. Recogida y conteo celular.

Para evitar la pérdida de viabilidad, tras el tiempo correspondiente de cada tratamiento, las células se levantaron incubando con 300 µL de tripsina (1X) durante 3 minutos. A continuación, se añadió 1 mL de DMEM con 10% FBS y 1% P/S/G y se recogieron. Se lavó cada pocillo con 200 µL de PBS estéril y se recogió. Se centrifugó a 400 g durante 8 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 200 µL de PBS estéril.

El conteo celular se realizó mediante el equipo Automated Cell Counter TC20™ (Bio-RAD). Brevemente, se realizó una dilución 1:1 de las células en PBS con Trypan Blue Dye 0,4% (Bio-Rad) y, a continuación, se midió el número de células viables y el porcentaje de viabilidad.

### 3.2. Tratamientos relacionados con la ferroptosis.

#### 3.2.1. Inductores

En este trabajo se utilizaron diferentes inductores de muerte celular por ferroptosis: erastina (2,5  $\mu$ M y 4  $\mu$ M), RSL3 (1,375  $\mu$ M, 2,75  $\mu$ M, 4,25  $\mu$ M, 5,5  $\mu$ M, 8,5 $\mu$ M y 17  $\mu$ M), FIN56 (29  $\mu$ M) y FINO2 (58,5  $\mu$ M). En todos los casos los inductores se añadieron disueltos en DMSO. Los tratamientos consistieron en inducir muerte celular con cada uno de ellos de forma independiente, menos en un caso en el que se añadieron erastina y RSL3 de forma simultánea. El tiempo de tratamiento fue de 24h. Los controles correspondientes fueron tratados con la misma cantidad de DMSO.

#### 3.2.2. Inhibidores

El inhibidor de muerte celular utilizado fue la ferrostatina-1 (Sigma-Aldrich), a una concentración de 19  $\mu$ M. Las células fueron tratadas con ferrostatina-1 1h antes del tratamiento con RSL3.

### 3.3. Tratamientos celulares con especies de PE

Se utilizaron diferentes especies de fosfolípidos de etanolamina (PE) reflejados en la Tabla 1, almacenadas a -80°C. Cada PE fue disuelto en la cantidad de disolvente/s correspondiente/s para tener la concentración indicada de cada uno de ellos.

**Tabla 1.** Especies de fosfolípidos de etanolamina (PE) utilizadas a lo largo de este trabajo.

Especie PE (Avanti)	Concentración (mg/mL)	Disolvente
PE(16:0/18:1)	10mg/mL	metanol/H <sub>2</sub> O/cloroformo (19:1:5)
PE(P-18:0/18:1)	10mg/mL	metanol/H <sub>2</sub> O/cloroformo (19:1:5)
PE(P-18:0/22:6)	1mg/mL	cloroformo

Para los tratamientos, se preparó una disolución madre con el PE y la molécula complejante correspondiente, en una proporción 1:2 (PE/molécula complejante), de tal forma que al añadir 100  $\mu$ L de esta disolución a las células tratadas la concentración final del PE fuera de 100  $\mu$ M. Los controles correspondientes llevarían la misma cantidad de molécula/s complejante/s. Las moléculas complejantes utilizadas fueron BSA y CD. Primeramente, se prepararon dos tubos ámbar donde se añadió la cantidad de PE o de disolvente donde este estaba diluido según correspondiese, así fuese tratamiento o control, respectivamente. Se secaron bajo corriente de nitrógeno. A continuación, se añadió la cantidad correspondiente de molécula complejante a ambos tubos y se sonicó en un sonicador de sonda 3 veces durante 15 segundos. Por último, previamente a ser añadido a las células, se incubó durante 30 minutos en un baño en agitación a 37°C.

### 3.4. Análisis de expresión génica por RT-qPCR

#### 3.4.1. Extracción de RNA y cuantificación

El RNA de las células tratadas se extrajo usando TRIzol<sup>TM</sup> Reagent (Canvax Biotech) siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial. La extracción se basa en la lisis celular por este detergente catiónico Tio zinato de Guadinidio (GTC).

Inicialmente, las células fueron recogidas en 1 mL de TRIzol y se les añadió 200  $\mu$ L cloroformo. Se agitó vigorosamente y se dejó reposar durante 3 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos a 4°C, tras la cual se pudo observar 3 fases bien diferenciadas: una fase orgánica abajo, una fase intermedia y una fase acuosa. Es en esta última donde se encuentra el RNA de interés.

Se recogieron aproximadamente 400  $\mu\text{L}$  de esta fase acuosa y se añadió la misma cantidad de isopropanol. Se volvió a agitar vigorosamente, se dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente, y a continuación se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante, se lavó el pellet obtenido en 1mL de etanol/agua 3:1 y se agitó vigorosamente. Se centrifugó a 10000 g durante 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet obtenido en agua de grado biología molecular en función del tamaño de este. Se realizó una incubación a 60°C durante 10 minutos y por último, se recogió en hielo para proceder a la cuantificación.

El RNA de cada muestra fue cuantificado mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260nm usando el equipo Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

### 3.4.2. Síntesis de cDNA

Para obtener el cDNA del RNA extraído, se utilizó el kit comercial Verso cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific), siguiendo el protocolo indicado. Este kit ofrece una reacción resistente y sensible gracias al uso combinado de una enzima retrotranscriptasa de gran afinidad, un método de cebado de ARN exclusivo y un sistema tampón optimizado. El volumen final de reacción es de 10  $\mu\text{L}$ , correspondiendo 5,5  $\mu\text{L}$  de ellos a la solución con el RNA molde (500 ng/ $\mu\text{L}$ ). Se incubó durante 50-60 minutos a 43°C para iniciar el proceso de síntesis. Finalmente, se incubó durante 3 minutos a 92/93°C para parar la reacción. El cDNA sintetizado se almacenó a -20°C hasta su uso.

### 3.4.3. Primers

Los *primers* de los genes en cuestión (**Tabla 2**) fueron localizados en un banco de *primers* público PRIMER BANK (MGH-PGA) teniendo en cuenta 3 condiciones: la presencia de un único pico de disociación, una temperatura de *melting* alrededor de 60°C y un tamaño de amplicón de entre 100 y 200. Se confirmó su especificidad en "Primer BLAST"(NCBI).

**Tabla 2.** Secuencias y características de los *primers* utilizados durante este trabajo.

Gen	Secuencia	%GC	T <sup>a</sup> de fusión
<i>Gapdh</i>	Fw:AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	52,38	60,88
	Rv:TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	58,59	58,59
<i>Tfrc</i>	Fw:GTTTCTGCCAGCCCCTTATTAT	45,45	58,43
	Rv: GCAAGGAAAGGATATGCAGCA	47,62	58,97
<i>Far-1</i>	Fw:TAGTGGTCAACACGAGCCTTG	52,38	60,27
	Rv:GGCTTACAGCAATCCAGTAATGA	43,87	58,80
<i>Peds1</i>	Fw:TCCAGGAGTGGTGTCCGT	57,89	60,46
	Rv:CCAGGATCACGAGGGGTGT	63,16	60,99

### 3.4.4. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

La PCR cuantitativa a tiempo real es una técnica que permite detectar y cuantificar la amplificación de moléculas de DNA. En este caso, los productos de la PCR son detectados al final de cada ciclo gracias a una sonda fluorescente que se intercala entre en la doble hélice de DNA, SYBR Green.

Primero, se evaluó la eficiencia de cada pareja de *primers* (**Tabla 2**). La evaluación de estas fue satisfactoria ya que superaron los criterios de evaluación necesarios: las eficiencias de los genes de interés y del de referencia diferían menos de un 10% entre ellas, y todas las eficiencias eran cercanas a 1. Evaluar la eficiencia es necesario para poder comparar la expresión génica mediante el Método Comparativo de Ct ( $\Delta\Delta\text{Ct}$ ).

Por otro lado, se analizó la expresión de los genes de interés en las muestras mediante qPCR. La qPCR fue llevada a cabo para 20 ng de cDNA usando el kit “PowerUp SYBR™ Green Master Mix” (Applied Biosystems) siguiendo el protocolo de la casa comercial. Al cDNA molde se le añadió 5 µL de la Enzima Mix, 0,5 µL del Primer Forward (C = 10 µM) y 0.5 µL del Primer Reverse (C = 10 µM) del gen correspondiente. La amplificación del cDNA de interés fue llevada a cabo mediante los *primers* adjuntos en la **Tabla 2**. El gen *housekeeping* utilizado como referencia durante este procedimiento fue GAPDH, ya que se expresa de forma constante en la línea celular RAW264.7

La PCR se llevó a cabo en un 7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems) usando el siguiente protocolo:

1. 95°C durante 3 minutos para iniciar la desnaturalización
2. 40 ciclos de amplificación:
  - 2.1. 95°C durante 12 segundos para desnaturalizar
  - 2.2. 60°C durante 16 segundos para
  - 2.3. 72°C durante 28 segundos para la extensión y recolección de datos.
3. 72°C durante 1 minutos para la extensión final.
4. *Melting curve* o curva de disociación.
  - 4.1. 95°C durante 15 segundos
  - 4.2. 60°C durante 60 segundos
  - 4.3. 95°C durante 30 segundos
  - 4.4. 60°C durante 15 segundos

La especificidad de cada par de *primers* se evaluó con el análisis de la *melting curve*.

El análisis de los datos obtenidos se llevó a cabo mediante el Método Comparativo de Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ), el cual compara los cambios de expresión génica de forma relativa, es decir, la diferencia de número de copias entre un gen de interés y un gen de referencia en una muestra. En este caso, el gen de referencia utilizado fue GAPDH.

Para ello se aplicó la siguiente fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$
$$2^{-[(Ct \text{ tratamiento} - Ct \text{ GAPDH}) - (Ct \text{ control} - Ct \text{ GAPDH})]}$$

Con la fórmula anterior se obtiene la expresión relativa de los genes en cada condición. Niveles de expresión iguales a 1 indicaban la misma expresión del gen tanto en la condición de tratamiento como la condición control (sin tratamiento). En cambio, resultados <1 indicaban una disminución de la expresión y resultados >1 indicaban un aumento de la expresión en la condición tratamiento con respecto a la condición control. Los resultados obtenidos fueron representados como el número de veces de expresión del gen en la condición de tratamiento con respecto a la condición control, habiendo sido normalizado anteriormente con el gen de referencia. La condición control en este caso fueron los controles sin tratamiento a las horas correspondientes.

### **3.5. Análisis de las especies de fosfolípidos de etanolamina (PE) mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS)**

A los pellets de células, se les añadió metanol/agua 9:1 sobre las células, a razón de 100 µl por cada 250000 células, y a continuación 30 pmol de PE(17:0/17:0) como estándar interno. Después de dejar toda la noche las muestras a -20°C para permitir la precipitación de la proteína, las muestras se centrifugaron a 13000 g durante 10 min a 4°C y se transfirieron 100 µL del sobrenadante a un vial de inyección para cromatografía de líquidos.

Las muestras se inyectaron en un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (HPLC), modelo Thermo Fisher Scientific Dionex Ultimate 3000, equipado con una bomba binaria Ultimate HPG-3400SD y un inyector Ultimate ACC-3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La separación de fosfolípidos se llevó a cabo en una columna XSelect™ Premier CSH C18 VanGuard™ FIT Column, 2,5 µm, 2,1 x 150 mm, unida a una XSelect™ Premier CSH C18 VanGuard FIT Cartridge, 2,1 x 5 mm (Waters Corporation, Milford, MA, USA). La fase móvil consistió en un gradiente de fase móvil A (agua/acetonitrilo/isopropanol 50:25:25, v/v/v, 2 mM de bicarbonato de amonio) y fase móvil B (acetonitrilo/isopropanol, 50:50, v/v, 2 mM de bicarbonato de amonio). El gradiente empezó en 5% B de 0 a 2 min, después aumentó a 50% B a 4 min, 80% B a 9 min, 100% B a 18 min, se mantuvo constante durante 2 min, y decreció a 5% B a 20,1 min, para mantenerse constante durante 1,9 min adicionales antes de la siguiente inyección. El flujo de la columna se fijó en 0,35 mL/min.

El eluyente cromatográfico se analizó mediante un espectrómetro de masas Sciex QTRAP 4500, estaba equipado con una fuente de ionización Turbo V y una sonda para ionización por electrospray TurbolonSpray (AB Sciex, Framingham, MA, USA). Los parámetros de ionización usados fueron: voltaje de ionización, -4500 V; gas cortina, 30 psi; gas de nebulización, 50 psi; gas de desolvatación, 60 psi; temperatura, 500°C. Las especies de fosfolípidos de etanolamina se analizaron en modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) aislando el aducto  $[M-H]^-$  en el primer cuadrupolo (Q1), fragmentando mediante disociación inducida por colisión en la celda de fragmentación (Q2) y aislando el ion correspondiente al fragmento de uno de los ácidos grasos en el segundo cuadrupolo (Q3). Para adquirir los datos se utilizó el programa Analyst® (versión 1.6.3). Los picos cromatográficos se integraron con el programa MultiQuant™ (versión 3.0.2) y se realizó una semicuantificación según el ratio de áreas entre el analito y el estándar interno. Los resultados se muestran como pmoles/millón de células.

### 3.6. Análisis estadístico

Los resultados de este trabajo se representan como la media  $\pm$  el error de la media estándar (SEM). La significación estadística para comparar los grupos correspondientes se llevó a cabo con la prueba t-Student para muestras desapareadas mediante el programa Graphpad. Se consideraron resultados con diferencias estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$  (indicado con \*). Cuando  $p < 0,005$  se indica con \*\* y cuando  $p < 0,0005$  con \*\*\*.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Confirmación de muerte celular por ferroptosis con RSL3

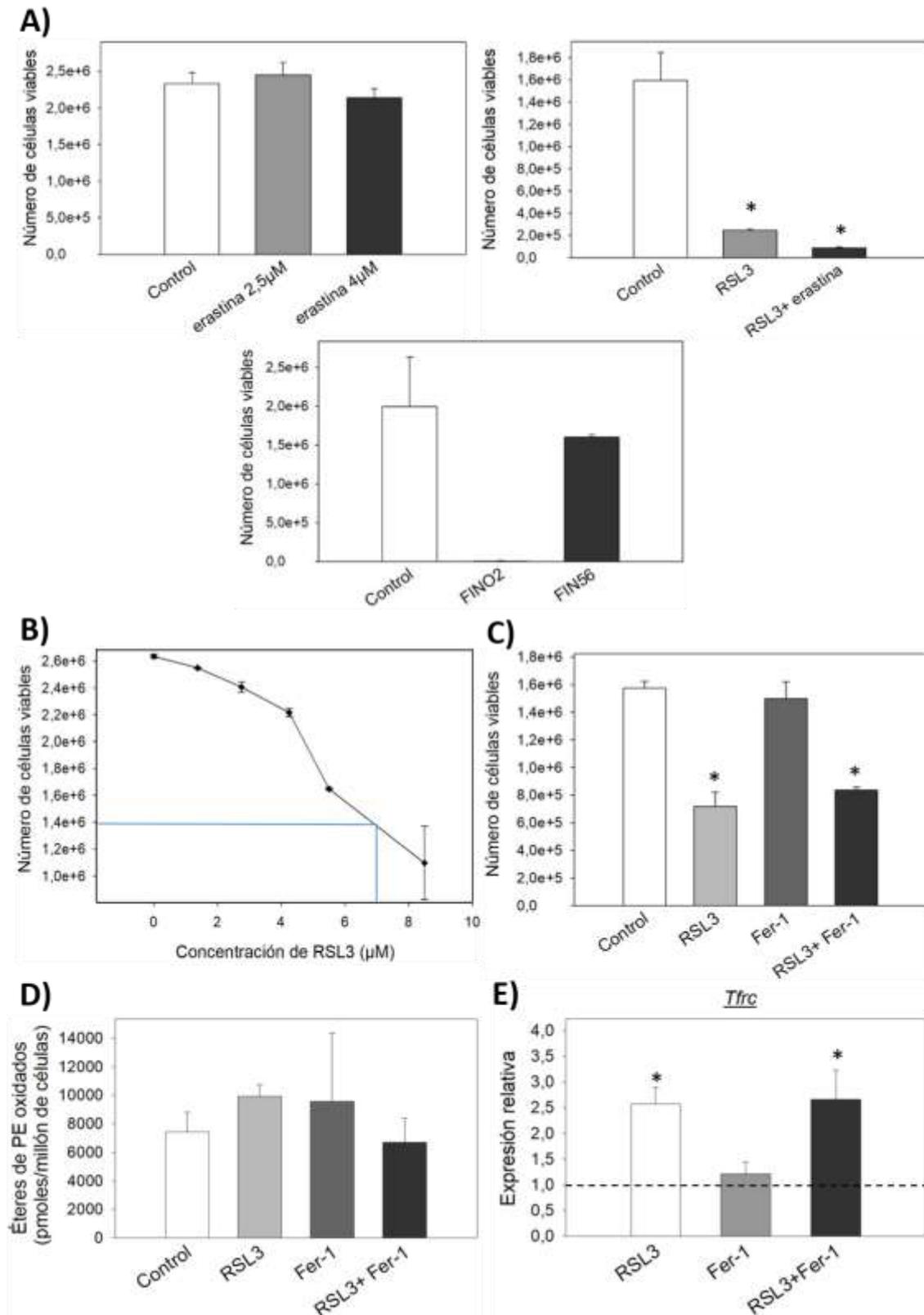
Con la finalidad de elegir un modelo de sensibilización a ferroptosis en la línea celular RAW264.7, las células fueron tratadas con diferentes inductores de ferroptosis, variando sus concentraciones, para obtener una muerte celular del 50%. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 5A**. A pesar de que la erastina es el inductor clásico de ferroptosis, en este caso no se obtuvieron los resultados esperados de un 50% de muerte celular, ya que apenas se observa muerte celular con respecto a los controles. Tanto con FINO2 como con el tratamiento combinado de erastina y RSL3 se observó una muerte celular elevada del 90%, lo que no permitiría estudiar posteriormente como los fosfolípidos de etanolamina modulan la ferroptosis. En cambio, cuando las células son tratadas durante 24h sólo con el inductor RSL3 en concentración 17µM se observó una tasa de muerte celular del 80%. Por consiguiente, se estudió qué dosis de RSL3 produce una muerte celular del 50%.

Para determinar la concentración de RSL3 que induce un 50% de muerte en macrófagos RAW264.7, las células fueron incubadas con diferentes concentraciones de dicho inductor de ferroptosis durante 24h. En la **Figura 5B**, se observa como a medida que aumenta la concentración de RSL3, disminuye el número de células viables. Se calculó la concentración que produce una muerte celular del 50%, siendo 7,4µM de RSL3.

Con el fin de confirmar la selectividad del RSL3 para producir muerte celular por ferroptosis, se utilizó un inhibidor clásico de este tipo de muerte celular, la ferrostatina-1 (Fer-1). Las células fueron incubadas con Fer-1 (19µM) 1h antes del tratamiento con RSL3 (7,4µM) (**Figura 5C**). Por un lado, se puede ver que la Fer-1 no afecta a la viabilidad celular, ya que se obtienen el mismo número de células viables que en el control. Por otro lado, con el tratamiento con RSL3 se observa una muerte celular significativa del 50% con respecto al control, demostrando que la concentración de RSL3 elegida es la óptima. Por último, con el tratamiento combinado de RSL3 (7,4µM) y Fer-1 (19µM) se recogieron significativamente menos células viables que en el control pero más que con el tratamiento con RSL3, indicando que la Fer-1 está inhibiendo alrededor de un 16,4% de la muerte celular inducida por RSL3.

Se quiso corroborar por otro método que la muerte presenciada era por ferroptosis. Para ello se analizó los éteres de PE oxidados mediante HPLC-MS. Estas especies oxidadas aumentaron durante el proceso ferroptótico (**Figura 5D**). Las células tratadas con RSL3 mostraron una mayor cantidad de éteres de PE oxidados con respecto a los controles. Por el contrario, esta cantidad se vio disminuida con respecto al control cuando las células son tratadas con RSL3 y Fer-1.

Por último, se estudió la expresión del gen TFRC por qPCR, marcador clásico de ferroptosis (**Figura 5E**). Con este análisis se confirmó la muerte celular por esta vía en las células tratadas con RSL3, debido al aumento significativo de la expresión relativa del mRNA del receptor de transferrina, hecho que no ocurría en las células tratadas sólo con Fer-1. En cambio, la expresión relativa de este gen aumentaba también de forma significativa en las células tratadas con RSL3 y Fer-1, a pesar de estar tratadas con dicho inhibidor de ferroptosis.

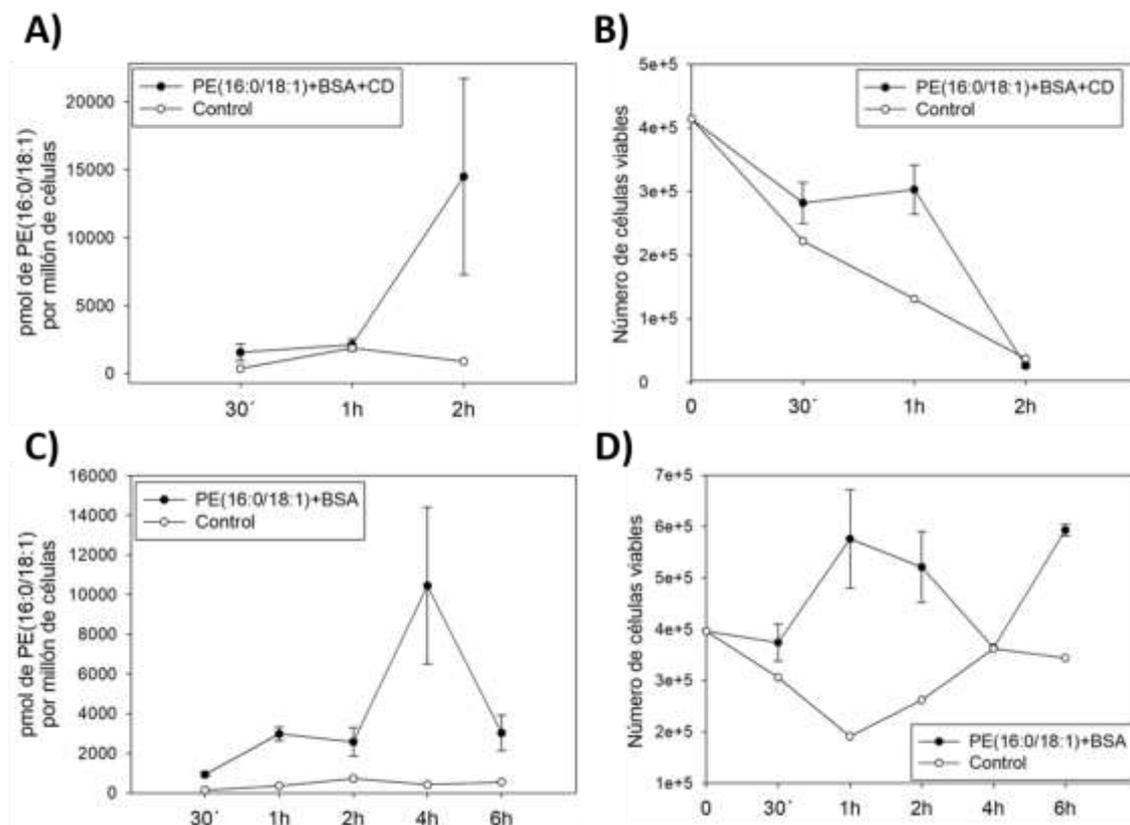


**Figura 5. Confirmación de muerte celular por ferroptosis con RSL3. A)** Tratamientos de 24h con diferentes inductores de ferroptosis en la línea celular RAW264.7. Control (DMSO); erastina (2,5 y 4 μM); RSL3 (17 μM); FINO2 (58,5 μM); FIN56 (29 μM). **B)** Dosimetría a 24h con diferentes concentraciones de RSL3 (1,75 μM, 2,75 μM, 4,25 μM, 5,5 μM, 8,5 μM y 17 μM). **C)** Tratamiento a 24h en la línea celular RAW264.7 con RSL3 (7 μM), ferrostatina-1 (Fer-1) (19 μM) y de forma conjunta. **D)** Análisis de la presencia de éteres de PE oxidados en los diferentes tratamientos mediante HPLC-MS. **E)** Análisis del nivel de mRNA del receptor de transferrina (TFRC) mediante qPCR en células RAW264.7. Los controles correspondientes tienen un valor de referencia 1. \* $p < 0,05$  mediante t-student.

#### 4.2. Puesta a punto del método de incorporación de especies de PE en el interior celular.

Debido a que los PE son moléculas con ácidos grasos hidrófobos, necesitan ser complejadas por otros compuestos para ser efectivamente incorporadas en la célula. Con el fin de encontrar un método óptimo para introducir este tipo de especies en los macrófagos de la línea celular RAW264.7, se utilizó la molécula PE(16:0/18:1) y se llevaron a cabo dos estrategias diferentes. Por un lado, las células fueron tratadas con PE(16:0/18:1) (10 $\mu$ M) complejado con una mezcla de compuestos: BSA y ciclodextrina (CD), en una proporción 2:1 (**Figura 6A-B**). Por otro lado, se trataron a las células con el PE(16:0/18:1) (10 $\mu$ M) complejado únicamente con BSA, también en una proporción 2:1 (**Figura 6C-D**). Las células control fueron tratadas con la misma cantidad de BSA y CD o solo con BSA, según correspondiese.

A pesar de que la incorporación de la especie de PE(16:0/18:1) fue más eficaz cuando se complejó con el tratamiento de BSA y CD (**Figura 6A**), este tratamiento disminuía la viabilidad celular, incluso en los controles (**Figura 6B**). La tasa de mortalidad de las células tratadas con dicho tratamiento llega a ser del 100% a las 4h de tratamiento. En cambio, cuando dicha especie de PE se complejó únicamente con BSA, se observó un incremento intracelular del PE a lo largo del tiempo (**Figura 6C**), acompañado de una mayor tasa de viabilidad celular que con el tratamiento anterior (**Figura 6D**).



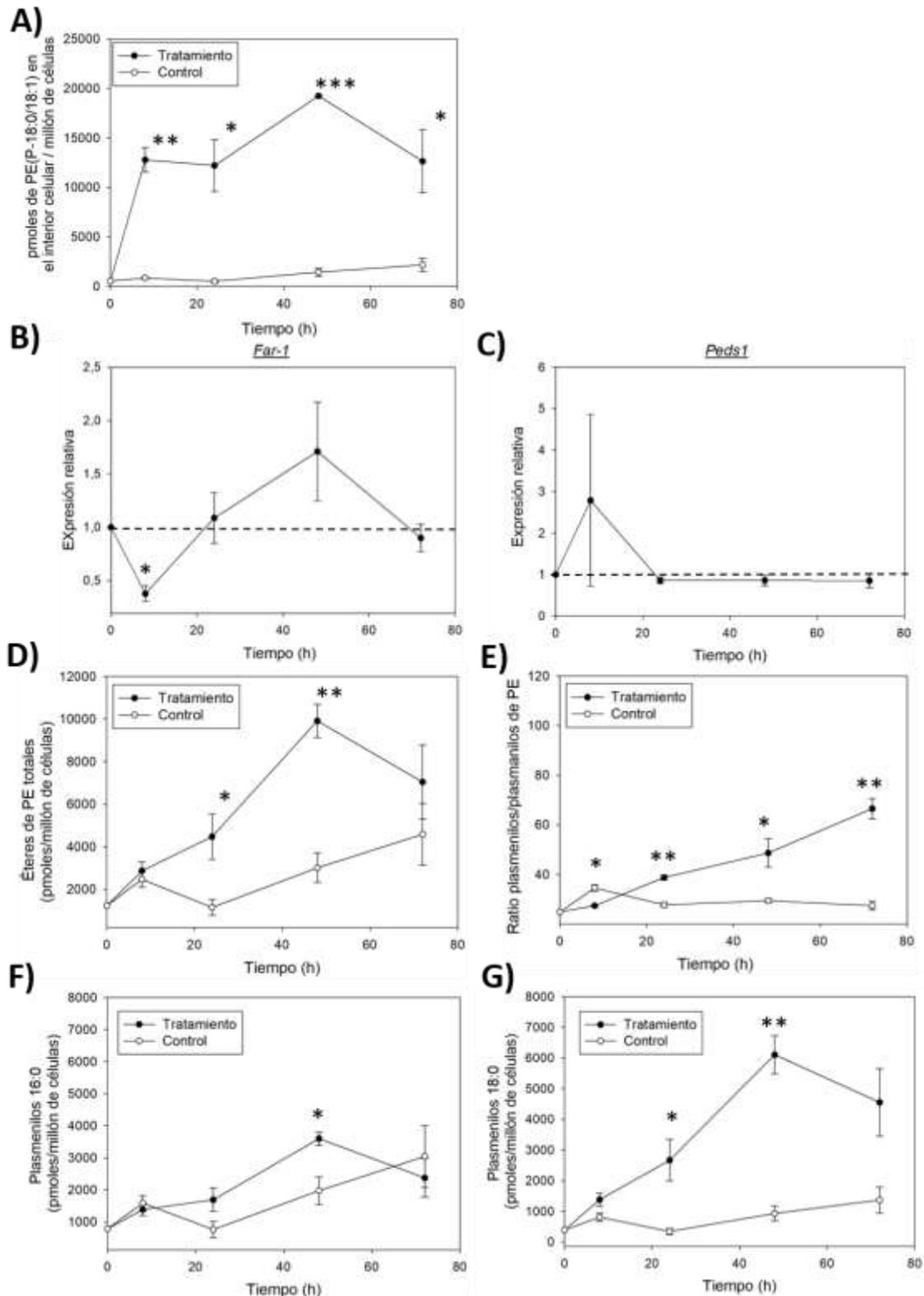
**Figura 6.** Puesta a punto la introducción de PE en la línea celular RAW264.7. **A)** Análisis mediante HPLC-MS de la especie PE(16:0/18:1) celular después de ser presentada complejada con BSA+ciclodextrina (CD). **B)** Células viables recogidas tras el tratamiento a 30 minutos, 1h, 2h, 4, y 6h con BSA y ciclodextrina (CD) para introducir PE(16:0/18:1) en el interior celular de la línea células RAW264.7. **C)** Análisis mediante HPLC-MS de la especie PE(16:0/18:1) celular después de ser presentada complejada con BSA **D)** Células viables recogidas tras el tratamiento a 30 minutos, 1h, 2h, 4, y 6h con BSA para introducir PE(16:0/18:1) en el interior celular de la línea células RAW264.7.

#### 4.3. Efecto de plasménilos de PE en regulación de la síntesis de éteres de PE.

Con la finalidad de evaluar el efecto que tenía los plasménilos de PE sobre la línea celular RAW264.7, se llevó un tratamiento con la especie PE(P-18:0/18:1) en concentración 100µM complejado con BSA. Por un lado, se estudió mediante qPCR la expresión de dos genes *Peds1* y *Far-1* que codifican para las proteínas implicadas en la síntesis de estas especies (TMEM189 y Far-1, respectivamente). Por otro lado, se realizó un análisis de los éteres de PE mediante HPLC-MS para analizar la actividad de dichas enzimas.

Para comenzar, se estudió la cantidad de PE(P-18:0/18:1) que se incorporaba en la célula a lo largo del tiempo (**Figura 7A**). Se pudo ver como esta especie se incorporaba de forma creciente en la célula, teniendo su pico máximo a 48h, siendo este significativo con respecto a su control. A nivel génico se pudo observar cómo, tanto la expresión relativa de *Far-1* (**Figura 7B**) como la de *Peds1* (**Figura 7C**), no presentaban a penas variaciones significativas, a pesar del aumento significativo de la especie de PE en el interior celular con respecto al control.

A continuación, se analizaron mediante HPLC-MS los niveles de éteres de PE totales y el ratio de plasménilos/plasmanilos de PE a lo largo del tiempo sin tener en cuenta el PE que se había introducido como tratamiento. Por un lado, se observó cómo los éteres de PE totales aumentaban de forma significativa con respecto a los controles hasta las 48h (**Figura 7D**). Por otro lado, el ratio de plasménilos/plasmanilos de PE presentó una tendencia significativa de aumentar a lo largo del tiempo (**Figura 7E**). Finalmente, se analizó por separado la contribución de plasménilos de PE con 16 carbonos (**Figura 7F**) y con 18 carbonos en la cadena alquílica (**Figura 7G**). Se pudo observar como las especies con 16 carbonos apenas variaban mientras que los plasménilos de PE con 18 carbonos aumentaban de forma significativa hasta las 48h, donde dicho aumento se frenaba.

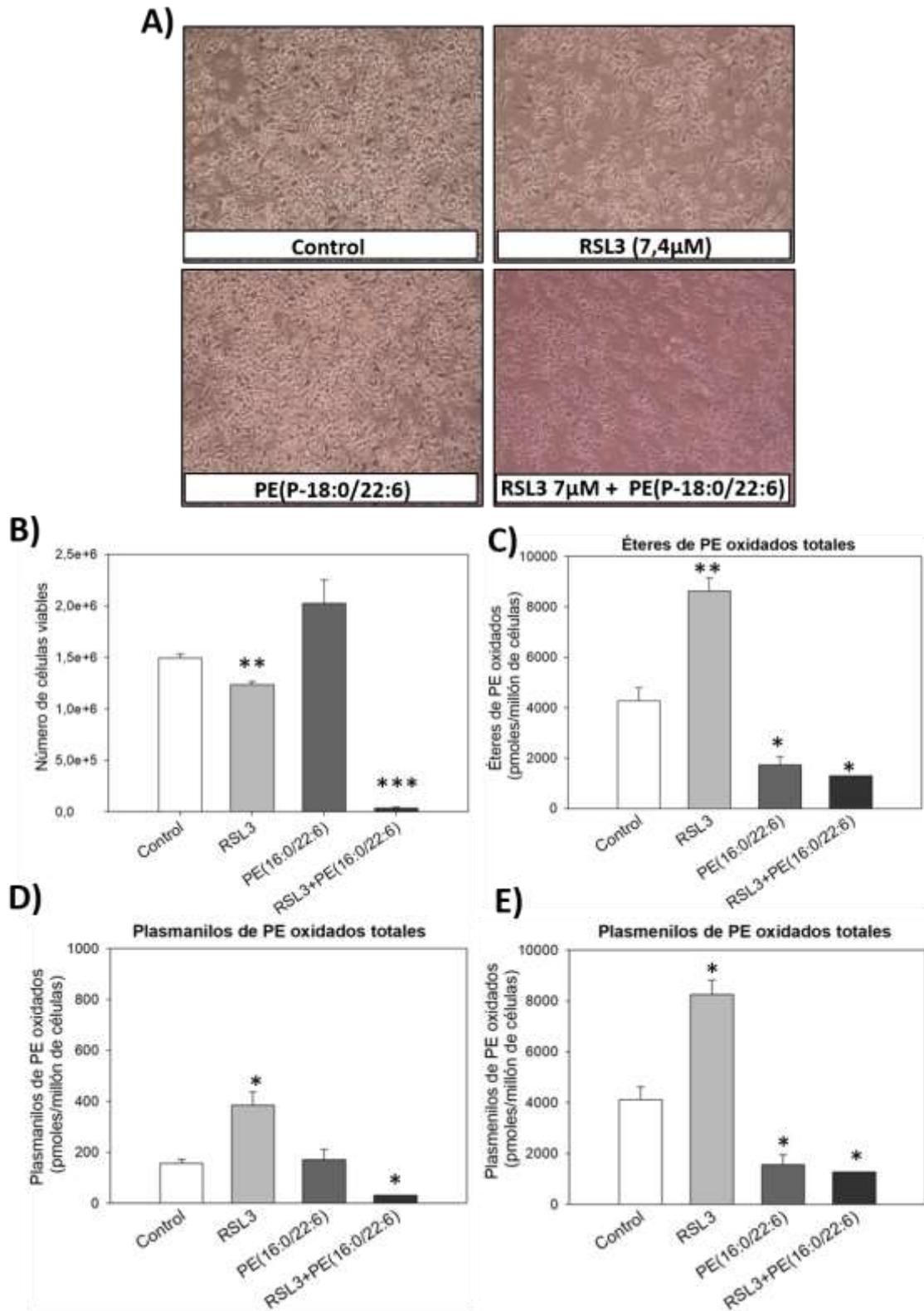


**Figura 7. Efecto de la introducción del plasmenilo PE(P-18:0/18:1) en los niveles de los éteres de PE de los macrófagos RAW264.7.** **A)** Análisis mediante HPLC-MS de la especie PE(P-18:0/18:1) en el interior celular de células RAW264.7. **B) y C)** Análisis del nivel de mRNA de Far-1 y Tmem189 mediante qPCR en la línea celular RAW264.7 tras introducir PE(P-18:0/18:1), respectivamente. **D)** Análisis mediante HPLC-MS de los éteres de PE totales excluyendo el PE(P-18:0/18:1) del tratamiento. **E)** Análisis mediante HPLC-MS del ratio plasmenilos/plasmanilos de PE excluyendo el PE(P-18:0/18:1) del tratamiento. **F) y G)** Análisis mediante HPLC-MS de los plasmenilos de PE con cadenas alquílicas de 16:0 y 18:0 tras introducir PE(P-18:0/18:1), respectivamente. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,0005$  mediante t-student.

#### 4.4. Efecto de plasmenilos de PE en situación de ferroptosis.

Con el fin de averiguar si los éteres de PE pueden ser un posible tratamiento en una situación de ferroptosis para los macrófagos murinos de la línea celular RAW264.7, se realizó un experimento en el que se indujo muerte celular con el inductor ferroptótico RSL3 (7,4 $\mu$ M) y se estudió el efecto que tenía el PE(P-18:0/22:6) (100 $\mu$ M) en dicha situación. En la **Figura 8A** se puede observar el efecto de cada una de las condiciones en las células. Por otro lado, se volvió a corroborar que el RSL3 disminuía la viabilidad celular de estas células. Además, se pudo observar un aumento del número de células cuando únicamente estaban tratadas con PE(P-18:0/22:6), lo que sugiere que este fosfolípido aislado podría favorecer el crecimiento celular. Por último, se observó una alta tasa de mortalidad producida cuando las células fueron tratadas con ambos compuestos simultáneamente. Estos resultados se ven reflejados en la **Figura 8B**, cuando las células fueron recogidas y cuantificadas.

Para terminar el estudio, se midieron los éteres de PE oxidados totales (**Figura 8C**) presentes en cada uno de los tratamientos. Además, se cuantificó la contribución de los plasmanilos de PE (**Figura 8D**) y plasmenilos de PE (**Figura 8E**) en cada uno de los casos, siendo éstos últimos los mayoritarios. Como ya se había visto en experimentos anteriores, se confirmó el aumento significativo de especies oxidadas durante el tratamiento con RSL3 con respecto a las células sin tratamiento. En cambio, los niveles de estas especies oxidadas disminuyen significativamente cuando se trata a las células solo con PE(P-18:0/22:6), contribuyendo mayoritariamente también los plasmenilos de PE. Sorprendentemente, los éteres de PE oxidados no se vieron aumentados con el tratamiento combinado, sino que estas especies disminuyen de forma significativa con respecto a las células control.



**Figura 8. Efecto de la introducción de PE(P-18:0/22:6) en la sensibilidad a ferroptosis de macrófagos RAW264.7.** **A)** Imágenes de las células RAW264.7 tras las 24h de incubación con RSL3 (7,4 $\mu$ M), con el PE(P-18:0/22:6) (100  $\mu$ M) y con ambos. Control con DMSO y BSA. **B)** Células viables recogidas tras 24h de tratamiento **C)** Análisis mediante HPLC-MS de los éteres de PE oxidados totales tras 24h de tratamiento. **D)** Análisis mediante HPLC-MS de los plasmanilos de PE oxidados totales tras 24h de tratamiento. **E)** Análisis mediante HPLC-MS de los plasmenilos de PE oxidados totales tras 24h de tratamiento. \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,005; \*\*\* $p$ <0,0005 mediante t-student.

## 5. DISCUSION

La ferroptosis, altamente estudiada en el contexto del cáncer, empieza a cobrar importancia en otros campos de la salud, cómo en el sistema inmune. Estudios recientes evidencian la relación de este tipo de muerte celular con enfermedades con un componente inflamatorio. Es por ello que en el laboratorio se planteó el conocer más en detalle la ferroptosis y su papel en células del sistema inmunitario. Esta idea va a ser clave para poder entender posibles enfermedades relacionadas y crear nuevas estrategias terapéuticas para ellas.

Inicialmente, se necesitó asentar las bases para inducir ferroptosis en una línea celular de macrófagos, siendo los resultados más remarcables de este trabajo. Conocer dichas condiciones va a servir para poder estudiar más a fondo los puntos clave del proceso ferroptótico en un futuro. En el presente trabajo hemos revelado como la molécula RSL3 es el inductor que nos ofrece las mejores condiciones de muerte celular a diferencia de autores como Zhao *et al.*, que utilizan la erastina como el inductor clásico de ferroptosis. **(Figura 5)**. El RSL3 actúa inhibiendo directamente uno de los mecanismos antioxidantes principales de la célula, el sistema GPX4 [21]. En cambio, la erastina actúa inhibiendo el sistema Xc<sup>-</sup> [20], punto de inicio del mecanismo de ferroptosis. Estos resultados sugieren que el RSL3 es un inductor más potente que otros conocidos, debido a su mecanismo de acción en un punto final del sistema antioxidante de la célula. Además, los macrófagos RAW264.7 en cultivo poseen un bajo contenido en ácidos grasos poliinsaturados por lo que necesitan de inductores más potentes, como el RSL3, para poder provocar en ellos una muerte por ferroptosis [44].

En este estudio, se ha visto como el RSL3 a una concentración de 7,4 µM es capaz de inducir una muerte celular del 50% en la línea de macrófagos murinos RAW264.7. A diferencia de las concentraciones presentadas en otro estudio con la misma línea celular, encontramos que una dosis mayor de RSL3 fue necesaria para inducir el mismo porcentaje de muerte celular [45]. Este hecho puede deberse a los diferentes análisis que se llevan a cabo en ambos estudios relacionados con la muerte celular. En nuestros resultados, la muerte celular se confirma tanto en el aumento de especies de éteres de fosfolípidos de etanolamina (PE) oxidados como en el aumento de la transcripción del gen del receptor de transferrina, eventos principales que se desarrollan durante el proceso ferroptótico [11,21]. Es por ello, que cabe pensar que para estudiar dichos eventos celulares, es necesario inducir la ferroptosis con dosis de RSL3 más elevadas.

El papel protector de la ferrostatina-1 frente a la ferroptosis [29], se ve reflejado en el estudio presente. Este fármaco atrapa a los radicales hidroxilos que se producen en el inicio del proceso ferroptótico, de tal forma que disminuye los éteres de PE oxidados y, en nuestro estudio, genera un aumento del 16,4% de la viabilidad células tratadas con RSL3 en la concentración determinada. A pesar de la disminución de los éteres de PE oxidados, la viabilidad celular recuperada es limitada. Este hecho nos sugiere que estarían sucediendo otras vías de muerte celular independientemente de la peroxidación lipídica [1,46]. Estos resultados también nos sugieren que el aumento del gen de transferrina durante la ferroptosis es independiente de la peroxidación lipídica, ya que se ve el mismo efecto cuando las células son tratadas con el inhibidor de ferroptosis, ferrostatina-1 **(Figura 5)** [11]. El estudio de este mecanismo sería una línea de investigación interesante para continuar dicha investigación.

El aumento de éteres de PE intracelulares tras la incorporación del PE(P-18:0/18:1) en la línea celular RAW264.7 es un hecho remarcable entre nuestros resultados. En dicho aumento, contribuyen principalmente los plasmenilos de PE con 18C. (**Figura 7**). Hay estudios relacionados que describen una relación inversa entre la presencia de plasmenilos en la cara interna de la membrana celular y la síntesis de estas especies [39], efecto contrario a lo que se ve reflejado en los datos que hemos obtenido en este estudio. Estos resultados nos hacen pensar en que la especie lipídica exógena que estamos introduciendo está viéndose afectada por diferentes eventos intracelulares. El aumento de éteres con cadena de 18C en la posición sn-1 indica que la acción de una fosfolipasa sobre el PE introducido estaría liberando el ácido graso de la posición sn-2. En este caso se trataría de la fosfolipasa A<sub>2</sub> independiente de calcio (iPLA<sub>2</sub>), ya que la fosfolipasa citosólica (cPLA<sub>2</sub>) requiere de la activación de los macrófagos para llevar a cabo su función [47]. La iPLA<sub>2</sub> estaría hidrolizando la posición sn-2 del PE(P-18:0/18:1), liberando un lisofosfolípido y un ácido graso libre 18:1. El lisofosfolípido se podría estar reacidando, y es por ello, que aumenta la suma total de plasmenilos de PE con cadena alquílica de 18C. Para confirmar dicha teoría, podría llevarse a cabo un experimento en el que las células fueran tratadas con un inhibidor de la iPLA<sub>2</sub>, como bromoenol lactona (BEL), donde cabría esperar no ver cambio en el número total de plasmenilos de PE con 18C en la posición sn-1 [48].

Por último, se ha de destacar el efecto nocivo de la especie PE(P-18:0/22:6) en los macrófagos durante la ferroptosis inducida con RSL3, a pesar de que los éteres de PE oxidados totales no se ven aumentados (**Figura 8**). Actualmente, nuestro método de detección solo es capaz de detectar especies oxidadas de uno y de dos oxígenos, es por ello que cabría pensar que la muerte celular podría estar siendo producida por otro tipo de especies tóxicas no detectadas por nuestro método. Para explicar nuestros resultados, hipotetizamos que la especie de PE introducida PE(P-18:0/22:6) –que presenta alta tendencia a la oxidación– está apantallando la oxidación de los PUFAs nativos. Además, estos PUFA altamente oxidables pueden sufrir una rotura, liberando especies como 4-hidrononanal (si se trata de un PUFA ω-6) y 4-hidroxihexanal (si se trata de un PUFA ω-3, como el FA 22:6). Generar un nuevo método que permitiese analizar la ruptura del PE(P-18:0/22:6) y determinar si su alta capacidad de oxidación está apantallando la oxidación de especies nativas, y por consiguiente, siendo el actor principal de la ferroptosis cuando es introducido, aportaría información muy interesante a la hora de continuar con esta investigación.

A pesar de que este trabajo muestra el inicio de una línea de investigación, aporta una serie de datos importantes e interesantes en el campo de estudio en el que vinculan la ferroptosis y las células del sistema inmune. Su continuación asentará las bases de inducción de ferroptosis en macrófagos y la relación de los éteres de PE en este contexto de muerte celular.

Para concluir, podríamos remarcar la importancia de los datos de este trabajo, ya que permite continuar el estudio del mecanismo de ferroptosis en las células del sistema inmune. Además, hay que señalar la importancia que esto tiene en relación con ciertas enfermedades inflamatorias, ya que gracias a esto se podrán generar nuevas estrategias terapéuticas a largo plazo.

## 6. CONCLUSIONES

- La estrategia para inducir ferroptosis en la línea celular RAW264.7 llevada a cabo en este estudio fue la adecuada. El inductor RSL3 a una concentración 7,4  $\mu\text{M}$  durante 24h fue efectivo para inducir un 50% de muerte celular en dichas células, además de verse un aumento de las especies de PE oxidadas en dicha situación.
- El efecto de las especies de PE en la línea celular RAW264.7 mostró una alta complejidad, lo que justifica continuar su estudio, incluyendo la localización y el destino metabólico del PE al incorporarse en la célula.
- No se observaron cambios de regulación génica de las enzimas implicadas en la síntesis de éteres de PE, Far-1 y TMEM189. Este hecho podría ser debido a que el éter de PE exógeno, a pesar de llegar a la membrana plasmática, estaría siendo hidrolizando rápidamente y no se podría llevar a cabo la regulación a nivel génico de estas enzimas.
- En este estudio se han podido asentar las bases del estudio de potenciación de la ferroptosis en macrófagos mediante éteres de PE. Con investigaciones futuras acerca del mecanismo y la localización de las especies lipídicas incorporadas permitirá entender el papel de los éteres de PE en el proceso de regulación de la ferroptosis.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Bertheloot, D. *et al.* (2021) Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cell. Mol. Immunol.* 18, 1106–1121
2. Gudipaty, S.A. *et al.* (2018) Unconventional Ways to Live and Die: Cell Death and Survival in Development, Homeostasis, and Disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 34, 311–332
3. Barbano, P.E. *et al.* (2005) A coherent framework for multiresolution analysis of biological networks with “memory”: Ras pathway, cell cycle, and immune system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 6245–6250
4. Li, M. *et al.* (2022) Programmed cell death in atherosclerosis and vascular calcification. *Cell Death Dis.* 13, 467
5. Nikolettou, V. *et al.* (2013) Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1833, 3448–3459
6. Galluzzi, L. *et al.* (2018) Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 25, 486–541
7. Tang, D. *et al.* (2019) The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res.* 29, 347–364
8. Dixon, S.J. *et al.* (2012) Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Non-Apoptotic Cell Death. *Cell* 149, 1060–1072
9. Chen, X. *et al.* (2021) Ferroptosis: machinery and regulation. *Autophagy* 17, 2054–2081
10. Dai, C. *et al.* (2020) Transcription factors in ferroptotic cell death. *Cancer Gene Ther.* 27, 645–656
11. Wu, J. *et al.* (2019) Intercellular interaction dictates cancer cell ferroptosis via Merlin-YAP signalling. *Nature* 572, 402–406
12. Yan, H. *et al.* (2021) Ferroptosis: mechanisms and links with diseases. *Signal Transduct. Target. Ther.* 6, 49
13. Dixon, S.J. (2017) Ferroptosis: bug or feature? *Immunol. Rev.* 277, 150–157
14. Mou, Y. *et al.* (2019) Ferroptosis, a new form of cell death: opportunities and challenges in cancer. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* 12, 34
15. Chen, X. *et al.* (2021) Ferroptosis in infection, inflammation, and immunity. *J. Exp. Med.* 218, e20210518
16. Maiorino, M. *et al.* (2018) GPx4, Lipid Peroxidation, and Cell Death: Discoveries, Rediscoveries, and Open Issues. *Antioxid. Redox Signal.* 29, 61–74
17. Xu, C. *et al.* (2021) The glutathione peroxidase Gpx4 prevents lipid peroxidation and ferroptosis to sustain Treg cell activation and suppression of antitumor immunity. *Cell Rep.* 35, 109235
18. Chen, X. *et al.* (2021) Cellular degradation systems in ferroptosis. *Cell Death Differ.* 28, 1135–1148
19. Xu, T. *et al.* (2019) Molecular mechanisms of ferroptosis and its role in cancer therapy. *J. Cell. Mol. Med.* 23, 4900–4912
20. Zhao, Y. *et al.* (2020) The Role of Erastin in Ferroptosis and Its Prospects in Cancer Therapy. *OncoTargets Ther.* 13, 5429–5441
21. Sui, X. *et al.* (2018) RSL3 Drives Ferroptosis Through GPX4 Inactivation and ROS Production in Colorectal Cancer. *Front. Pharmacol.* 9, 1371
22. Gaschler, M.M. *et al.* (2018) FINO2 initiates ferroptosis through GPX4 inactivation and iron oxidation. *Nat. Chem. Biol.* 14, 507–515
23. Zhang, X. *et al.* (2021) FIN56, a novel ferroptosis inducer, triggers lysosomal membrane permeabilization in a TFEB-dependent manner in glioblastoma. *J. Cancer* 12, 6610–6619
24. van Meer, G. *et al.* (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 112–124
25. Leuti, A. *et al.* (2020) Bioactive lipids, inflammation and chronic diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 159, 133–169

26. Fahy, E. *et al.* (2011) Lipid classification, structures and tools. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1811, 637–647
27. Harayama, T. and Riezman, H. (2018) Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 281–296
28. Innes, J.K. and Calder, P.C. (2018) Omega-6 fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 132, 41–48
29. Miotto, G. *et al.* (2020) Insight into the mechanism of ferroptosis inhibition by ferrostatin-1. *Redox Biol.* 28, 101328
30. Cui, W. *et al.* (2021) Peroxisome-driven ether-linked phospholipids biosynthesis is essential for ferroptosis. *Cell Death Differ.* 28, 2536–2551
31. da Silva, T.F. *et al.* (2012) The importance of ether-phospholipids: A view from the perspective of mouse models. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1822, 1501–1508
32. Zou, Y. *et al.* (2020) Plasticity of ether lipids promotes ferroptosis susceptibility and evasion. *Nature* 585, 603–608
33. Cheng, J.B. and Russell, D.W. (2004) Mammalian Wax Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 279, 37789–37797
34. Honsho, M. *et al.* (2013) Topogenesis and Homeostasis of Fatty Acyl-CoA Reductase 1. *J. Biol. Chem.* 288, 34588–34598
35. Honsho, M. *et al.* (2010) Posttranslational Regulation of Fatty Acyl-CoA Reductase 1, Far1, Controls Ether Glycerophospholipid Synthesis. *J. Biol. Chem.* 285, 8537–8542
36. Buchert, R. *et al.* (2014) A Peroxisomal Disorder of Severe Intellectual Disability, Epilepsy, and Cataracts Due to Fatty Acyl-CoA Reductase 1 Deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 95, 602–610
37. Werner, E.R. *et al.* (2020) The TMEM189 gene encodes plasmalogen desaturase which introduces the characteristic vinyl ether double bond into plasmalogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 7792–7798
38. Lorent, J.H. *et al.* (2020) Plasma membranes are asymmetric in lipid unsaturation, packing and protein shape. *Nat. Chem. Biol.* 16, 644–652
39. Honsho, M. *et al.* (2017) Plasmalogen biosynthesis is spatiotemporally regulated by sensing plasmalogens in the inner leaflet of plasma membranes. *Sci. Rep.* 7, 43936
40. Lei, G. *et al.* (2022) Targeting ferroptosis as a vulnerability in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 22, 381–396
41. Liang, D. *et al.* (2022) Ferroptosis at the intersection of lipid metabolism and cellular signaling. *Mol. Cell* 82, 2215–2227
42. O'Donnell, V.B. *et al.* (2019) Phospholipid signaling in innate immune cells. *J. Clin. Invest.* 128, 2670–2679
43. Sun, Y. *et al.* (2020) The emerging role of ferroptosis in inflammation. *Biomed. Pharmacother.* 127, 110108
44. Chen, L. *et al.* (2023) GC-MS analysis of fatty acid metabolomics in RAW264.7 cell inflammatory model intervened by non-steroidal anti-inflammatory drugs and a preliminary study on the anti-inflammatory effects of NLRP3 signaling pathway. *PLOS ONE* 18, e0290051
45. Kapralov, A.A. *et al.* (2020) Redox lipid reprogramming commands susceptibility of macrophages and microglia to ferroptotic death. *Nat. Chem. Biol.* 16, 278–290
46. D'Arcy, M.S. (2019) Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol. Int.* 43, 582–592
47. Aloulou, A. *et al.* (2018) Phospholipases: An Overview. In *Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols* (Sandoval, G., ed), pp. 69–105, Springer
48. Balgoma, D. *et al.* (2008) Calcium-independent phospholipase A2-mediated formation of 1,2-diarachidonoyl-glycerophosphoinositol in monocytes. *FEBS J.* 275, 6180–6191