



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
QUÍMICO-BIOLÓGICAS  
UMSNH

# **UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

## **INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS**

### **DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

## **T E S I S:**

# **ESTUDIO DE LA QUELACIÓN DE HIERRO EN LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE MEDIADA POR NRF2 Y LA FUNCIONALIDAD MITOCONDRIAL RENAL EN UN MODELO MURINO DE DIABETES TIPO 2**

ALUMNO QUE PRESENTA LA TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL:

**M. en C. DONOVAN JAVIER PEÑA MONTES**

DIRECTOR DE TESIS:

**D. en C. FRANCISCO ALFREDO SAAVEDRA MOLINA**

Morelia, Michoacán, México. Octubre 2024,

## La enérgica vida

En el silencio de lo invisible,  
chispea un relámpago minúsculo,  
un pulso que no cesa.  
Millones de centellas diminutas  
vibran sin trueno,  
alimentan la vida sin saberlo.  
En cada rincón de la carne,  
un circuito zumba,  
incansable, eterno.  
¿Quién orchestra esta tormenta muda?  
¿Qué corriente invisible  
teje los hilos de la existencia?  
Somos la suma de lo infinitesimal,  
un milagro constante,  
un río de electrones que fluye en la oscuridad.  
Y en cada instante,  
renovamos el pacto con la vida,  
sin palabras, sin consciencia,  
en el eterno baile de lo pequeño.

A la memoria de Sonia Mónica Clemente Guerrero

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en especial el Instituto de Investigaciones Químico Biológicas.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnología por la beca otorgada.

Al Centro de Investigaciones Biomédicas del Estado de Michoacán del Instituto Mexicano del Seguro Social.

A mi comité sinodal cuyos consejos y apoyo me han permitido alcanzar nuevos niveles de comprensión.

A mi madre, María Efigenia Montes Arredondo, a mis hermanos, Rafael y Rebeca. A mi mejor amiga Maribel Huerta, mis primos Arturo, Sinaí, Roldan.

Mi más profundo y eterno agradecimiento a mi familia y a mis amigos.

*Ad Astra per Aspera.*

## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. MARCO TEÓRICO .....	6
Factores de riesgo.....	9
Fisiopatología.....	11
Células $\beta$ pancreáticas.....	12
Disfuncionalidad de las células $\beta$ pancreáticas .....	15
Señalización de la insulina.....	19
Resistencia a la insulina .....	20
Inflamación e infiltración de células inmunitarias .....	21
Lipotoxicidad y acumulación de grasa ectópica .....	22
Estrés del retículo endoplásmico .....	23
Estrés oxidativo .....	23
Desregulación de adipocinas .....	24
Hiperinsulinemia y resistencia a la insulina.....	24
Factores genéticos y epigenéticos.....	25
Senescencia celular y envejecimiento .....	25
Complicaciones crónicas de la diabetes.....	26
Enfermedad renal diabética .....	26
Cambios metabólicos.....	27
Productos avanzados de glicación.....	28
Ruta de los polioles.....	30
Diacilglicerol y PKC.....	30
Ruta de la hexosamina .....	31
Funcionalidad mitocondrial en la enfermedad renal diabética.....	32

Estrés oxidativo en la enfermedad renal diabética .....	41
Euestrés oxidativo: los aspectos beneficiosos de las ERO .....	43
Distrés oxidativo: cuando las ERO se vuelven dañinas .....	44
Sistemas antioxidantes .....	46
Antioxidantes enzimáticos.....	46
Antioxidantes no enzimáticos en el riñón .....	51
Factores genéticos.....	52
Vía de señalización NRF2 .....	54
Alteraciones en el metabolismo de hierro en la diabetes.....	61
Perturbaciones del metabolismo de hierro en la diabetes .....	70
5. JUSTIFICACIÓN.....	72
6. HIPÓTESIS.....	73
7. OBJETIVOS.....	73
Objetivo general .....	73
Objetivos particulares.....	73
8. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	74
9. METODOLOGÍA .....	76
9.1. Aislamiento y purificación de mitocondrias .....	76
9.2. Potencial de membrana mitocondrial .....	77
9.3. Respiración mitocondrial .....	77
9.4. Determinación de la generación de especies reactivas de oxígeno .....	78
9.5. Evaluación de las actividades enzimáticas de la cadena respiratoria mitocondrial.....	78
9.6. Hinchamiento mitocondrial .....	80
9.7. Estado del glutatión mitocondrial y niveles de peroxidación lipídica .....	80
9.8. Actividad enzimática de glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y superóxido dismutasa .....	81
9.9. Análisis de inmunodetección de las proteínas de interés por Western Blot.....	81
9.10. Parámetros séricos .....	82

9.11. Análisis estadístico.....	82
10. RESULTADOS.....	83
10.1. Efectos de la restricción de hierro en la función mitocondrial y el estrés oxidativo en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina .....	83
Resumen.....	83
10.2. La quelación de hierro mitiga la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo incrementando la respuesta antioxidante mediada por NRF2 en la corteza renal de un modelo murino de diabetes tipo 2.....	92
11. DISCUSIÓN .....	105
12. CONCLUSIONES.....	114
13. ANEXO: CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS.....	117
14. ANEXO: CONTRIBUCIONES EN LA FORMACIÓN DE CAPITAL HUMANO: DIRECCIÓN DE TESIS, CAPACITACIÓN ACADÉMICA, DIVULGACIÓN CIENTÍFICA 136	
15. BIBLIOGRAFÍA .....	137

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1 Secreción de insulina.....	15
Figura 2. Esquema de la patogénesis de la enfermedad renal diabética. ....	28
Figura 3. Disfuncionalidad mitocondrial en la enfermedad renal diabética.....	40
Figura 4. Sistemas antioxidantes.....	51
Figura 5. Diseño experimental. ....	76
Figura 6. Efectos de la quelación de hierro con deferiprona en la corteza renal en un modelo murino de diabetes mellitus tipo 2.....	115
Figura 7. Efecto de la quelación de hierro con deferiprona en la corteza renal de un modelo murino.....	116
Tabla 1. Tabla I. Parámetros de diagnóstico para diabetes y prediabetes según la FID.....	7

## 1. RESUMEN

Este estudio investigó la influencia de la quelación de hierro sobre la respuesta antioxidante mediada por el factor de transcripción Nrf2 y la funcionalidad mitocondrial en el tejido renal en un modelo murino de diabetes tipo 2. La enfermedad renal diabética (ERD), una complicación microvascular frecuente de la diabetes, se caracteriza por alteraciones estructurales y funcionales del riñón, incluyendo disfunción mitocondrial y estrés oxidativo. La disfunción mitocondrial, definida como una alteración en la capacidad de las mitocondrias para generar ATP eficientemente y mantener la homeostasis celular, es un factor clave en la patogénesis de la ERD. Esta disfunción se asocia con un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y estrés oxidativo. Este estudio investigó el efecto de la quelación de hierro sobre la respuesta antioxidante mediada por Nrf2 y la funcionalidad mitocondrial en el tejido renal de un modelo murino de diabetes tipo 2. Los resultados mostraron que la diabetes perturba significativamente la homeostasis del hierro renal, conduciendo a una acumulación mitocondrial de hierro. Se evidenció que la disminución de hierro puede atenuar estas alteraciones metabólicas, previniendo la disfunción bioenergética mitocondrial, mitigando el estrés oxidativo y promoviendo la expresión de sistemas de defensa antioxidante a través de la activación de Nrf2, un regulador maestro de la respuesta antioxidante celular. No obstante, este estudio también reveló que la quelación de hierro, aunque beneficiosa en el contexto de la diabetes, puede tener efectos negativos en individuos sanos. En individuos con niveles fisiológicos de hierro, la quelación excesiva puede inducir una deficiencia iatrogénica, comprometiendo el estado redox celular, la funcionalidad mitocondrial y la producción energética.

Palabras clave: diabetes, hierro, mitocondria, estrés oxidativo, enfermedad renal diabética.

## 2. ABSTRACT

This study investigated the influence of iron chelation on the antioxidant response mediated by the transcription factor Nrf2 and mitochondrial functionality in renal tissue using a murine model of type 2 diabetes. Diabetic kidney disease (DKD), a common microvascular complication of diabetes, is characterized by structural and functional alterations of the kidney, including mitochondrial dysfunction and oxidative stress. Mitochondrial dysfunction, defined as an impairment in the mitochondria's capacity to efficiently generate ATP and maintain cellular homeostasis, is a key factor in the pathogenesis of DKD. This dysfunction is associated with increased production of reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress. This study investigated the effect of iron chelation on Nrf2-mediated antioxidant response and mitochondrial functionality in renal tissue from a mouse model of type 2 diabetes. The results demonstrated that diabetes significantly disrupts renal iron homeostasis, leading to mitochondrial accumulation of this element. It was evidenced that iron reduction can attenuate these metabolic alterations by preventing mitochondrial bioenergetic dysfunction, mitigating oxidative stress, and promoting the expression of antioxidant defense systems through the activation of Nrf2, a master regulator of cellular antioxidant response. However, this study also revealed that iron chelation, while beneficial in the context of diabetes, may have deleterious effects in normoglycemic individuals. In subjects with physiological iron levels, excessive chelation can induce iatrogenic deficiency, compromising cellular redox status, mitochondrial functionality, and consequently, energy production.

Keywords: diabetes, mitochondrion, iron, oxidative stress, diabetic kidney disease

### 3. INTRODUCCIÓN

La enfermedad renal diabética (ERD) representa una de las complicaciones más graves y frecuentes de la diabetes, constituyendo la principal causa de enfermedad renal crónica y terminal a nivel mundial (FID, 2023). Caracterizada por una disfunción renal progresiva y alteraciones estructurales como fibrosis intersticial, glomeruloesclerosis y proteinuria, la ERD supone un desafío significativo tanto para los pacientes como para los sistemas de salud (Agarwal, 2021). La fisiopatología de esta condición es compleja e involucra múltiples mecanismos, incluyendo hiperglucemia crónica, disfunción endotelial, estrés oxidativo, inflamación y alteraciones hemodinámicas, entre otros (Cao & Cooper, 2011; Agarwal *et al.*, 2021). En el núcleo de estos procesos patológicos se encuentra la disfuncionalidad mitocondrial, un componente crucial en la patogénesis de la ERD. Las mitocondrias, son orgánulos esenciales para la producción de energía celular, que experimentan un deterioro significativo en su capacidad para generar ATP de manera eficiente a través de la fosforilación oxidativa en condiciones de hiperglucemia crónica (Arruda & Hotamisligil, 2015; Ahmad *et al.*, 2021). Este déficit bioenergético no solo limita la capacidad de las células renales para mantener su homeostasis, sino que también desencadena una cascada de eventos que promueven la progresión de la enfermedad, incluyendo un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la activación de vías proinflamatorias y profibróticas (Forbes *et al.*, 2013; Fober & Thorburn, 2018). El estrés oxidativo, resultante de un desequilibrio entre la producción de ERO y la capacidad antioxidante celular, juega un papel central en la disfunción mitocondrial y el daño renal asociado a la ERD (Newsholme *et al.*, 2016). En este contexto, el factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2

(Nrf2) emerge como un regulador maestro de la respuesta antioxidante celular. Nrf2 promueve la expresión de genes antioxidantes y de fase de respuesta, como la superóxido dismutasa (SOD) y la enzima glutatión peroxidasa (GPx), que son cruciales para mitigar el daño oxidante (Suzuki *et al.*, 2021). Sin embargo, en la ERD, la activación inadecuada de Nrf2 puede comprometer la capacidad de las células renales para contrarrestar el estrés oxidativo, exacerbando el daño celular y acelerando la progresión de la enfermedad (Tanase *et al.*, 2022).

Un aspecto menos explorado, pero igualmente relevante en la patogénesis de la ERD es la desregulación del metabolismo del hierro, particularmente en relación con alteraciones en la hormona hepcidina ocasionadas por la falta de insulina y/o resistencia a la insulina (Wang *et al.*, 2014). La hepcidina, es un péptido regulador clave del metabolismo del hierro, se ve afectada por la disfunción metabólica característica de la diabetes, lo que puede conducir a una acumulación anormal de hierro en los tejidos renales (Dominguez *et al.*, 2015). Esta sobrecarga de hierro no solo contribuye al estrés oxidativo a través de la reacción de Fenton, sino que también puede promover un tipo específico de muerte celular regulada conocida como ferroptosis. La ferroptosis, un mecanismo patológico emergente en la ERD, es un tipo específico de muerte celular desencadenado por la descoordinación del metabolismo del hierro, el estado redox de los tioles (particularmente el sistema glutatión/GPX4) y la peroxidación lipídica (Dixon *et al.*, 2012). Este proceso se caracteriza por la acumulación excesiva de hierro libre, que cataliza la formación de ERO a través de la reacción de Fenton, promoviendo la peroxidación lipídica y la acumulación de sus productos (Li *et al.*, 2021). Simultáneamente, se observa una disfunción en las defensas antioxidantes, principalmente en el sistema glutatión/GPX4, crucial para la protección contra la

ferroptosis (Wang *et al.*, 2022). La diabetes, al alterar el metabolismo del hierro y generar un estado de estrés oxidativo crónico, crea un entorno que favorece la iniciación y propagación de la ferroptosis en el tejido renal (Li *et al.*, 2021). La acumulación de hierro, junto con la disminución de las defensas antioxidantes y el aumento de la peroxidación lipídica, forman una tríada letal que contribuye significativamente al daño celular y la progresión de la ERD (Wang *et al.*, 2022). Este escenario pro-ferroptótico en la diabetes no solo amplifica el estrés oxidativo, sino que también perpetúa un ciclo de daño celular que puede conducir a una pérdida progresiva de la función renal.

En la búsqueda de estrategias terapéuticas para mitigar el daño renal en la ERD, la quelación de hierro ha surgido como un enfoque prometedor. En particular, el quelante deferiprona ha mostrado potencial para reducir la sobrecarga de hierro y consecuentemente, disminuir el estrés oxidativo y la ferroptosis (Zou *et al.*, 2017). La deferiprona, al unirse y secuestrar el hierro libre, podría no solo reducir la formación de ERO mediada por hierro, sino también modular indirectamente la actividad de Nrf2 y mejorar la respuesta antioxidante celular (Cui *et al.*, 2012).

El estudio de la quelación de hierro en el contexto de la ERD, particularmente en relación con la respuesta antioxidante mediada por Nrf2 y la funcionalidad mitocondrial renal, representa un área de investigación novedosa y potencialmente benéfica para el tratamiento de la ERD y las enfermedades renales. Comprender cómo la modulación del metabolismo del hierro puede influir en las vías de señalización antioxidantes y en la bioenergética mitocondrial podría abrir nuevas avenidas para el desarrollo de terapias más efectivas para la ERD.

En este contexto, el objetivo de esta tesis es la de estudiar el efecto de la quelación de hierro sobre la respuesta antioxidante mediada por Nrf2 y la funcionalidad mitocondrial en el tejido renal de un modelo murino de diabetes tipo 2.

## **4. MARCO TEÓRICO**

### **Diabetes**

La diabetes es un conjunto de enfermedades metabólicas y endocrinas caracterizadas principalmente por niveles elevados de glucosa en sangre (hiperglucemia). La diabetes se ha convertido en una de las principales enfermedades crónicas no transmisibles a nivel mundial, con un impacto significativo en la salud pública y la economía global. Según la Federación Internacional de Diabetes (FID), en 2021, 537 millones de adultos (de 20 a 79 años) vivían con diabetes y se estima que esta cifra aumentará a 642 millones para 2040. Este alarmante incremento se atribuye principalmente al envejecimiento de la población, la urbanización, los cambios en los estilos de vida, como dietas poco saludables, sedentarismo y la obesidad.

La Federación Internacional de la Diabetes define la diabetes como una enfermedad que es caracterizada por un aumento de la glucosa en sangre (hiperglucemia). La hiperglucemia puede ser causada por la producción insuficiente de insulina, la resistencia a la acción de la insulina o una combinación de ambos.

De acuerdo al Atlas de la Diabetes (2021) la diabetes se clasifica en cuatro tipos principales:

**Diabetes tipo 1:** Es una enfermedad autoinmune en la que el sistema inmunitario ataca y destruye las células  $\beta$  del páncreas que producen insulina. La diabetes tipo 1 requiere la administración de insulina de por vida.

**Diabetes tipo 2:** Es la forma más común de diabetes y se caracteriza por la resistencia a la acción de la insulina. En la mayoría de los casos, la diabetes tipo 2 se puede controlar con dieta, ejercicio y medicamentos orales. Sin embargo, algunos casos pueden requerir insulina.

**Diabetes gestacional:** Es un tipo de diabetes que se desarrolla durante el embarazo. Suele desaparecer después del parto, pero las mujeres que han tenido diabetes gestacional tienen un mayor riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 en el futuro.

**Otros tipos de diabetes:** Incluyen la diabetes latente autoinmune del adulto y la diabetes monogénica (LADA y MODY, por sus siglas en inglés, respectivamente), entre otras.

**Tabla I. Parámetros de diagnóstico para diabetes y prediabetes según la FID (2021)**

	Normal	Prediabetes	Diabetes
Glucosa en ayunas (mg/dL)	< 100	100 - 125	$\geq 126$
Glucosa 2h post-pandrial (mg/dL)	< 140	140 - 199	$\geq 200$
HbA1c (%)	< 5.7	5.7 - 6.4	$\geq 6.5$
Glucosa plasmática al azar (mg/dL)	-	-	$\geq 200$ (con síntomas)

Notas: Para el diagnóstico de diabetes, se requiere la confirmación con una segunda prueba, a menos que haya síntomas claros de hiperglucemia. La prueba de glucosa 2 horas post-pandrial se refiere a la Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa (PTOG) con 75g de glucosa. Los síntomas clásicos de hiperglucemia incluyen poliuria, polidipsia y pérdida de peso inexplicable (Atlas de la Diabetes, 2021).

## **Diabetes tipo 2**

La diabetes tipo 2 (DT2) se caracteriza por una desregulación en el metabolismo de glúcidos, lípidos y proteínas, como consecuencia de un deterioro en la secreción de insulina, resistencia a la insulina o una combinación de ambas. La DT2 es la forma más frecuente de diabetes representando más del 90% de todos los casos reportados (FID, 2021; ADA, 2022). Existen diversas causas de la DT2, aunque se desconocen las etiologías específicas, no se produce una destrucción autoinmune de las células  $\beta$  pancreáticas y se encuentra fuertemente asociado con el sobrepeso y la obesidad. Su principal causa es el deterioro progresivo de la secreción de insulina por las células  $\beta$  pancreáticas, generalmente sobre un fondo de resistencia a la insulina preexistente en los tejidos dependientes de insulina como, por ejemplo: el músculo esquelético y el tejido adiposo y no dependientes como el hígado (Huang *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2022). La hiperglucemia está precedida por la prediabetes, una condición de alto riesgo que predispone a los individuos al desarrollo de la DT2. La prediabetes se caracteriza por cualquiera de los siguientes: niveles alterados de glucosa en ayunas (AGA), intolerancia a la glucosa (IGT) o niveles elevados de hemoglobina A1c (HbA1c) glicosilada. Los individuos con AGA se caracterizan por niveles de glucosa

plasmática en ayunas que son más altos de lo normal, pero no cumplen los criterios para el diagnóstico de diabetes (FID, 2021; ADA, 2022). La IGT se caracteriza por la resistencia a la insulina en el músculo y la alteración de la secreción tardía (segunda fase) de insulina después de una comida, mientras que los individuos con AGA manifiestan resistencia a la insulina hepática y alteración de la secreción temprana (primera fase) de insulina. Los individuos con prediabetes tienen niveles de HbA1c entre 5.7 y 6.4%; representan un grupo heterogéneo con respecto a la fisiopatología y son clínicamente muy diversos. Las tasas de conversión anual de la prediabetes a la DM2 oscilan entre el 3% y el 11% por año (FID, 2021, ADA, 2022). La DT2 con frecuencia pasa desapercibida durante muchos años debido a que la hiperglucemia se desarrolla paulatinamente y en etapas tempranas, no suele ser lo suficientemente grave como para que el paciente perciba los síntomas clásicos de diabetes causados por la hiperglucemia, como la deshidratación o la pérdida de peso involuntaria. Sin embargo, incluso los pacientes no diagnosticados tienen un mayor riesgo de desarrollar complicaciones hepáticas, macrovasculares y microvasculares (Colberg *et al.*, 2016; ADA, 2022).

### **Factores de riesgo**

A nivel mundial, la prevalencia e incidencia de la DT2 puede variar ampliamente según la región geográfica o subgrupos raciales/étnicos (FID, 2021; Stumvoll *et al.*, 2005). Los hispanos/latinos, nativos americanos, afroamericanos, japoneses, asiáticos-americanos presentan mayor riesgo de padecer diabetes. El riesgo de desarrollar DT2 aumenta con la edad, la obesidad y la falta de actividad física. También ocurre más frecuentemente en mujeres que han presentado diabetes

mellitus gestacional (DG) o síndrome de ovario poliquístico, mientras que la obesidad (índice de masa corporal [IMC]  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>) es el factor de riesgo más importante para la DM2 y se asocia con anomalías metabólicas que resultan en resistencia a la insulina (RI) (Zheng *et al.*, 2018). Un estilo de vida sedentario es otro factor de riesgo para la DM2. La actividad física tiene beneficios principales en el retraso de la aparición de la DM2 (Colberg *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2018). En primer lugar, la contracción de las células musculares esqueléticas induce un aumento del flujo sanguíneo al músculo, mejorando la captación de glucosa del plasma y la actividad física reduce la conocida grasa abdominal, que es un factor de riesgo conocido que promueve la RI (Galicia-García *et al.*, 2020).

Adicional a esto, la predisposición genética juega un papel importante en el riesgo de desarrollar DT2. Los datos obtenidos de los estudios de asociación de genoma completo (GWAS) para la DT2, sugieren que una fracción considerable de las señales de asociación se deben a la desregulación del desarrollo y la secreción de insulina por las células  $\beta$ , en lugar de afectar los tejidos que responden a la insulina como la grasa, el músculo y el hígado (DeFronzo *et al.*, 2015; Shojima & Yamauchi, 2023). Hasta la fecha, los principales genes candidatos asociados con la DM2 que tienen un impacto negativo en la función de las células  $\beta$  incluyen ABO, IGF2BP2, MTNR1B, TCF7L2, HNF1A, HNF1B, ADCY5, SLC30A8, CCND2 y PAM. Las variantes en WFS1 también se asocian con un mayor riesgo de DT2 mediante la modulación de la secreción de insulina (Shojima & Yamauchi, 2023). La comparación de mapas de elementos reguladores no codificantes en los islotes con las señales GWAS de la DT2 ha implicado la función no codificante específica de los islotes con la susceptibilidad genética a la DT2 (Shojima & Yamauchi, 2023). Estos estudios demuestran el papel central de los islotes en la DT2 y

sugieren que la interrupción de los elementos reguladores específicos de los islotes por variantes comunes es un mecanismo patogénico importante. Por ejemplo, rs58692659 (locus ZFAND3), rs1635852 (locus JAZF1), rs11257655 (locus CDC123) (126), rs11603334 y rs1552224 (locus ARAP1), rs231362 (locus KCNQ1), rs7732130 (locus ZBED3/PDE8B) y rs7903146 (locus TCF7L2) son ejemplos de variantes asociadas con la DT2 que alteran las funciones reguladoras de los islotes (DeFronzo *et al.*, 2015; Shojima & Yamauchi, 2023). La epigenética, que abarca modificaciones del ADN que no alteran la secuencia de bases, ha emergido como un factor crucial en la patogénesis de la DT2 (Mannar *et al.*, 2023; Sandholm *et al.*, 2023). La metilación del ADN y los microARN (miARN) alteran la expresión génica, impactando negativamente en la producción y acción de la insulina. La metilación excesiva de genes como PPARGC1A, INS, PDX1, NDUF6, COX5a, OXPHOS, PGC-1 $\alpha$ , PDK4, PPAR- $\delta$ , PPARG, KCNQ1, TCF7L2 e IRS1 se ha asociado con la DT2 en diferentes tejidos. Diversos miARNs, como MiR-375, MiR-124a, MiR-29a, MiR-29b y MiR-184, también participan en la patogénesis de la enfermedad al regular la función y supervivencia de las células  $\beta$  (Mannar *et al.*, 2023).

## **Fisiopatología**

La fisiopatología de la DT2 se caracteriza por un desequilibrio entre la acción de la insulina y la secreción de la insulina lo que resulta en niveles anormalmente elevados de glucosa sanguínea (Petersen & Shulman, 2018). La disfuncionalidad de las células  $\beta$  afecta la producción de la insulina, limitando la capacidad para mantener los niveles de glucosa dentro de los parámetros fisiológicos. Por otro lado, la resistencia a la insulina contribuye al aumento de la producción de glucosa

en el hígado y a la disminución de la captación de glucosa tanto en el tejido adiposo y en el músculo. Aunque ambos procesos se manifiestan tempranamente en la patogénesis y contribuyen al desarrollo de la enfermedad, la disfuncionalidad de las células  $\beta$  suele ser más severa que la resistencia a la insulina. No obstante, cuando ambas condiciones están presentes la hiperglucemia se agrava acelerando la progresión de la DT2 (DeFronzo *et al.*, 2015).

### **Células $\beta$ pancreáticas**

La insulina es una hormona peptídica producida y secretada únicamente por las células  $\beta$  pancreáticas en respuesta a niveles elevados de glucosa en sangre en el organismo (Wondmkun, 2020). La insulina actúa en órganos como el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo para promover el almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno y/o lípidos, lo que reduce los niveles de glucosa en sangre (Wondmkun, 2020). Además, la insulina atraviesa la barrera hematoencefálica regulando funciones clave en el sistema nervioso central como la ingesta de alimentos, el metabolismo periférico, la memoria y la cognición (Van Niekerk *et al.*, 2020).

Las células  $\beta$  son las únicas responsables de la producción de insulina, la cual es sintetizada como preproinsulina. En el proceso de maduración, la preproinsulina sufre una serie de modificaciones conformacionales realizadas en el retículo endoplasmático (RE) para producir proinsulina. Posteriormente, la proinsulina es translocada desde el RE al aparato de Golgi. Ingresa a las vesículas secretoras inmaduras y es escindida en péptido C e insulina y una vez madura, la insulina se almacena en gránulos hasta su liberación (Wondmkun, 2020). La liberación de insulina es principalmente desencadenada por una respuesta a

concentraciones elevadas de glucosa, no siendo excluyentes otros estímulos que resultan en su liberación, como aminoácidos, ácidos grasos y las hormonas (Huang *et al.*, 2020). Cuando los niveles circulantes de glucosa aumentan, las células  $\beta$  absorben la glucosa principalmente a través del transportador de glucosa 2 (GLUT2), que es una proteína transportadora de solutos que también funciona como sensor de glucosa para las células  $\beta$ . Una vez que la glucosa es internalizada, se fosforila en glucosa-6-fosfato (G6P) por la enzima glucocinasa; la G6P genera piruvato a través de la glucólisis y continua su oxidación en la mitocondria para producir trifosfato de adenosina (ATP) a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) aumentando la relación ATP/ADP intracelular, lo que induce el cierre de los canales de potasio ( $K^+$ ) tipo dependientes de ATP de la membrana plasmática. Esto conduce a la despolarización de la membrana y a la apertura de los canales de calcio ( $Ca^{2+}$ ) tipo L dependientes de voltaje, lo que permite que el  $Ca^{2+}$  ingrese a la célula. El aumento en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  es un factor clave en la exocitosis, movilizándolo los gránulos secretores que contienen insulina hacia la membrana plasmática. Estos gránulos son transportados a lo largo de elementos del citoesqueleto, incluidos microtúbulos y filamentos de actina, antes de acoplarse a la membrana plasmática fig. 1 (Campbell & Newgard, 2021). Este proceso está mediado por las proteínas SNARE (receptores solubles de factor de sensibilidad a N-etilmaleimida), las cuales facilitan la fusión de la membrana vesicular con la membrana plasmática (Jahn & Scheller, 2006). La interacción entre las proteínas SNARE presentes en los gránulos de insulina, como la sinaptobrevina, y aquellas presentes en la membrana plasmática, como syntaxina y SNAP-25, forma un complejo que acerca ambas membranas, preparándolas para la fusión (Barg, 2003). Además, los iones

de calcio se unen a la sinaptotagmina, una proteína sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  en la vesícula, lo que desencadena el paso final de la fusión (Sudhof & Rothman, 2009). A medida que la membrana vesicular se fusiona con la membrana plasmática, la insulina es liberada al espacio extracelular a través de la formación de un poro de fusión. Una vez liberada, la insulina difunde hacia los capilares cercanos y se distribuye a los tejidos diana, como el músculo esquelético, el tejido adiposo, donde promueve la captación y el metabolismo de la glucosa (Barg, 2003; Campbell & Newgard, 2021). La secreción de insulina presenta dos fases: una liberación inicial rápida de insulina desde un grupo de vesículas previamente acopladas a la membrana, conocido como el pool de liberación inmediata (RRP, por sus siglas en inglés), seguida de una liberación más lenta y sostenida desde un grupo de reserva de gránulos, los cuales deben movilizarse antes de acoplarse a la membrana (Henquin, 2009). Este patrón bifásico de secreción es esencial para mantener la homeostasis de la glucosa a lo largo del tiempo (Campbell & Newgard, 2021).

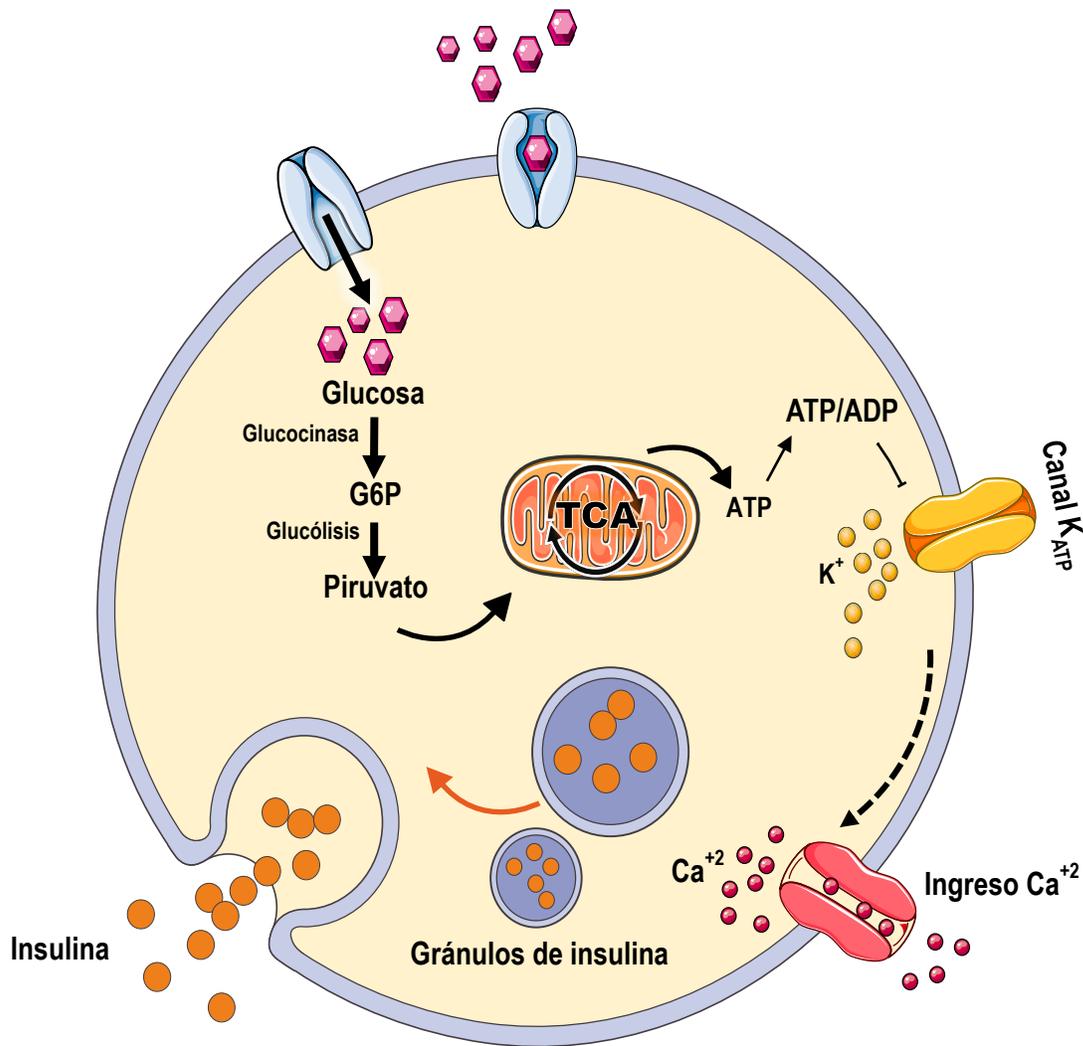


Figura 1. Secreción de insulina en respuesta a la glucosa en las células  $\beta$  pancreáticas. Tras la absorción de glucosa a través de los transportadores de glucosa 2 (GLUT2) ubicados en la membrana plasmática. Una vez que la glucosa es internalizada, se fosforila a glucosa-6-fosfato (G6P) por acción de la glucocinasa. La G6P genera piruvato por la glucólisis. El piruvato ingresa a la mitocondria y produce ATP a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) aumentando la relación ATP/ADP. Este aumento cierra el canal de potasio dependiente de ATP, lo que resulta en la despolarización de la membrana plasmática, bloqueando la salida de potasio de las células  $\beta$ . Esto provoca un ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula, lo que desencadena la exocitosis de los gránulos de insulina y es liberada de los gránulos y secretada al torrente sanguíneo.

## Disfuncionalidad de las células $\beta$ pancreáticas

Las células  $\beta$  regulan la secreción de insulina en respuesta a la concentración plasmática de glucosa para mantener la concentración en un rango fisiológico. Sin embargo, en pacientes diabéticos las células  $\beta$  son incapaces de secretar insulina

para satisfacer la demanda aumentada de insulina en respuesta a la glucosa y otros secretagogos (Huang *et al.*, 2020). La disfuncionalidad de las células  $\beta$  en la DT2 se debe a una compleja interacción entre el entorno y diferentes rutas moleculares. La patogénesis de la DT2 generalmente comienza con resistencia a la insulina y hay un aumento en la secreción de insulina por parte de las células beta para compensar esta resistencia, manteniendo así los niveles normales de glucosa en sangre (Lee *et al.*, 2022). Sin embargo, la función y masa de las células  $\beta$  disminuyen continuamente, exacerbando así la secreción inadecuada de insulina. Esto eventualmente conduce a la falla de las células beta para compensar la resistencia a la insulina, lo que resulta en diabetes manifiesta. Adicional a esto, un estado nutricional excesivo, como el encontrado en la obesidad, la hiperglucemia e hiperlipidemia suelen estar presentes, favoreciendo la resistencia a la insulina y la inflamación crónica. En estas circunstancias las células  $\beta$  debido a diferencias en su susceptibilidad genética, están sujetas a diferentes situaciones de estrés como la inflamación, el estrés en el RE, el estrés metabólico/oxidante y estrés amiloide (Huang *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2022).

La lipotoxicidad debido a un exceso de ácidos grasos libres (AGL) y glucotoxicidad inducida por la hiperglucemia llevan a la disfunción en estas células al inducir estrés en el retículo endoplásmico a través de la activación proapoptótica de la vía de respuesta a proteínas desplegadas (UPR) como se ha observado también en la obesidad. El estrés derivado de la lipotoxicidad puede activar la vía UPR mediante varios mecanismos, incluida la inhibición de la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del sarco/retículo endoplasmático (SERCA), responsable de la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, además de la activación de los receptores IP3 e incluso de un deterioro directo de la homeostasis del RE (Zarain-Herzberg *et al.*, 2014). Adicionalmente,

la hiperglucemia sostenida aumenta la producción de ERO a través de la oxidación de proteínas. Estos efectos alteran la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE y favorecen señales proapoptóticas, degradación del ARNm de la proinsulina e inducen la liberación de interleucina (IL)-1 $\beta$  que recluta a los macrófagos y aumenta la inflamación local del islote. Ya que la secreción de insulina debe estar finamente regulada para satisfacer de manera precisa la demanda metabólica, la integridad del islote debe ser conservada para permitir que las células  $\beta$  respondan a las necesidades metabólicas. Bajo condiciones patogénicas, el mecanismo descrito anteriormente puede llevar en última instancia a la alteración de la integridad/organización del islote, afectando la comunicación óptima de célula a célula dentro de los islotes pancreáticos, contribuyendo a la regulación deficiente de la liberación de insulina y glucagón y en última instancia, exacerbando la hiperglucemia. Los defectos en la síntesis de cualquier precursor de insulina, o la propia insulina, así como la alteración del mecanismo de secreción, pueden conducir a la disfunción secretora de insulina, el principal impulsor del fallo de las células  $\beta$  y una base de la DT2 (Donath *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2022).

Otros mecanismos moleculares fuertemente asociados con la disfuncionalidad de las células  $\beta$  son la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y la desregulación de la autofagia. En las células  $\beta$ , las mitocondrias desempeñan un papel clave en el metabolismo de la glucosa y la secreción de la insulina. Las mitocondrias son además las principales generadoras de ERO intracelulares y los defectos en la función mitocondrial generan deficiencias bioenergéticas, lo que eventualmente lleva a la muerte celular, trastornos metabólicos y diabetes. Bajo condiciones de hiperglucemia crónica, la densidad mitocondrial disminuye y la morfología

mitocondrial cambia, lo que permite la liberación de mediadores apoptóticos. Las ERO son moléculas señalizadoras esenciales para regular funciones celulares fisiológicas, pero la sobreproducción de ERO en condiciones patológicas provoca estrés, daños oxidantes y muerte celular. El cambio en el equilibrio entre antioxidantes y la producción de ERO, como el superóxido y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), provoca estrés oxidativo que conduce a una falla en las células beta funcionales y por lo tanto, a la muerte celular (Eguchi *et al.*, 2021). La autofagia es un mecanismo celular fisiológicamente regulado que equilibra la síntesis, degradación y reciclaje de componentes celulares. Permite la degradación y el reciclaje ordenados bajo condiciones de inanición, manteniendo orgánulos celulares clave como las mitocondrias o el RE responsables de la supervivencia o la función celular en las células  $\beta$  y la disfunción o muerte de las células  $\beta$ . En los pacientes con DT2, la autofagia está desregulada, se incrementa el número de vacuolas autofágicas y autofagosomas, mientras que la expresión de la proteína de membrana asociada a lisosomas 2 (LAMP2) y la catepsina disminuyen. La exposición a concentraciones altas de glucosa y palmitato aumenta los niveles de la proteína ligera de cadena 3 asociada a microtúbulos (LC3) II en relación con los de LC3 I y suprime varios genes involucrados en la autofagia y la función lisosomal. La incidencia de la autofagia se evalúa frecuentemente midiendo la tasa de conversión de la forma citosólica (LC3 I) a su forma lipídica, LC3 II, que es un paso necesario para la formación de autofagosomas (Yao *et al.*, 2021).

## Señalización de la insulina

El receptor de insulina es un heterotetrámero conformado por 2 subunidades  $\alpha$  y 2 subunidades  $\beta$  unidas por enlaces disulfuro perteneciente a la súper familia de receptores tirosina cinasa (RTK). La insulina interacciona extracelularmente con el receptor de insulina uniéndose a la subunidad  $\alpha$  del receptor y activando la tirosina cinasa en la subunidad  $\beta$ . Una vez que la tirosina cinasa del receptor de insulina está activada, promueve la autofosforilación de la subunidad  $\beta$ , dando lugar a la fosforilación de tres residuos de tirosina (Tyr-115, Tyr-1162 y Tyr 1163) y a una amplificación de la actividad cinasa. Los residuos fosforilados son reconocidos posteriormente por varias proteínas adaptadoras, incluyendo miembros de la familia de sustratos del receptor de insulina (IRS), en la que IRS-1 y IRS-2 son los intermediarios principales, así como a la proteína adaptadora Shc (proteína con dominio de homología 2 a Src). El IRS funciona como una molécula adaptadora que facilita la formación de complejos moleculares y desencadena cascadas de señalización intracelular. Una vez iniciado el encendido de las cascadas de señalización dos vías principales de transducción son activadas por acción de la insulina: Dos vías principales resultan de la interacción entre el receptor de insulina y el IRS: la vía PI3K/AKT (también conocida como proteína cinasa B o PKB) y la vía Ras/MAPK (también conocida como cinasa regulada por señales extracelulares o ERK). La vía PI3K (fosfoinositol 3-cinasas) se vincula exclusivamente a través del IRS y es responsable de la mayoría de los efectos metabólicos de la insulina en la célula. Por otro lado, la vía MAPK se deriva tanto del IRS como de Shc y está involucrada en la regulación de la expresión génica y en cooperación con la vía PI3K, también

regula el crecimiento y la diferenciación celular. La señal de insulina se termina a través de varios mecanismos para asegurar una regulación temporal apropiada:

a) Internalización del Receptor: El complejo insulina-receptor se internaliza, lo que conduce a la degradación de la insulina y al reciclaje o degradación del receptor (Di Guglielmo *et al.*, 1998).

b) Proteínas Tirosina Fosfatasas: Enzimas como la PTP1B desfosforilan el receptor de insulina y a las proteínas IRS, atenuando la señal (Goldstein *et al.*, 2000).

c) Fosfatasas de Lípidos: PTEN y SHIP2 desfosforilan PIP3, reduciendo la activación de Akt (Dumont, 2002).

d) Bucles de Retroalimentación Negativa: La cinasa S6 activada, es un efector posterior de mTORC1, que puede fosforilar las proteínas IRS en residuos de serina, reduciendo su capacidad para transducir la señal de insulina (Um *et al.*, 2006).

## **Resistencia a la insulina**

Otra de las aristas importantes en la patogénesis de la DT2 es la resistencia a la insulina. La resistencia a la insulina (RI) se refiere a una disminución en la respuesta metabólica de las células sensibles a la insulina o, a nivel sistémico, una respuesta disminuida o alterada a la insulina circulante (Petersen y Shulman, 2018). La obesidad y el sedentarismo junto con una predisposición genética ejercen presión sobre las células beta, lo que resulta en un fallo de la función de estas células y en una disminución progresiva en la secreción de insulina (Lee *et al.*, 2022). En estados de resistencia a la insulina, varios componentes de esta vía están desregulados:

a) **Proteínas Sustrato del Receptor de Insulina (IRS):** Las proteínas IRS, particularmente IRS-1 e IRS-2, son mediadores críticos de la señalización de la insulina. En la resistencia a la insulina, estas proteínas suelen estar fosforiladas en residuos de serina en lugar de tirosina, lo que conduce a una activación reducida y una degradación incrementada (Coppes & White, 2012). Este deterioro puede ser inducido por diversos factores, incluidos citocinas inflamatorias, ácidos grasos libres y estrés celular.

b) **Vía PI3K/Akt:** La vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K)/Akt es crucial para los efectos metabólicos de la insulina. En estados de resistencia a la insulina, la activación de esta vía está reducida, lo que lleva a una disminución en la captación de glucosa, una síntesis de glucógeno deteriorada y un aumento de la gluconeogénesis (Haeusler *et al.*, 2018).

c) **Translocación de GLUT4:** La insulina estimula la captación de glucosa en el músculo y el tejido adiposo principalmente promoviendo la translocación de los transportadores de glucosa GLUT4 a la superficie celular. En la resistencia a la insulina, este proceso está deteriorado, lo que reduce la captación de glucosa (Jaldin-Fincati *et al.*, 2017).

### **Inflamación e infiltración de células inmunitarias**

La inflamación crónica de bajo grado es una característica distintiva de la resistencia a la insulina y la DT2. Este estado inflamatorio se caracteriza por:

a) **Inflamación del Tejido Adiposo:** En la obesidad, la expansión del tejido adiposo conduce a hipoxia, muerte celular y reclutamiento de células inmunitarias proinflamatorias, particularmente macrófagos. Estas células producen citocinas

como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , que pueden interferir directamente con la señalización de la insulina (Reilly & Saltiel, 2017).

b) Inflamación Hepática: Similar al tejido adiposo, el hígado en estados de resistencia a la insulina muestra un aumento en la inflamación y la infiltración de células inmunitarias. Esto contribuye a la resistencia a la insulina hepática y al aumento de la producción de glucosa (Perry *et al.*, 2015).

c) Efectos Sistémicos: Las citocinas proinflamatorias pueden actuar de manera sistémica, afectando la sensibilidad a la insulina en tejidos distantes y contribuyendo a un estado de inflamación crónica de bajo grado (Hotamisligil, 2017).

### **Lipotoxicidad y acumulación de grasa ectópica**

La acumulación excesiva de lípidos, particularmente en tejidos no adiposos, juega un papel significativo en la resistencia a la insulina:

a) Lípidos Intramiocelulares: La acumulación de lípidos dentro de las fibras musculares esqueléticas, particularmente diacilgliceroles (DAG) y ceramidas, puede interferir con la señalización de la insulina. Estos intermediarios lipídicos pueden activar isoformas de la proteína cinasa C (PKC), lo que conduce a la fosforilación de serina de las proteínas IRS y a una sensibilidad reducida a la insulina (Samuel & Shulman, 2016).

b) Esteatosis Hepática: La acumulación excesiva de lípidos en el hígado contribuye a la resistencia a la insulina hepática. Esto puede llevar a un aumento en la producción de glucosa hepática y a la dislipidemia (Petersen & Shulman, 2018).

c) **Ácidos Grasos Libres (AGLs):** Los niveles elevados de AGLs circulantes, a menudo observados en la obesidad y la DM2, pueden afectar directamente la señalización de la insulina en múltiples tejidos y contribuir a la lipotoxicidad (Chávez & Summers, 2010).

### **Estrés del retículo endoplásmico**

El estrés del retículo endoplásmico y la respuesta de proteínas desplegadas (UPR, por sus siglas en inglés) resultante, son cada vez más reconocidos como importantes contribuyentes a la resistencia a la insulina:

a) **Activación de Cinasas de Estrés:** el estrés del ER activa cinasas de estrés como JNK e IKK, que pueden fosforilar las proteínas IRS en residuos de serina, deteriorando la señalización de la insulina (Flamment *et al.*, 2012).

b) **Alteración de la Síntesis de Proteínas:** el estrés crónico del ER puede llevar a una reducción en la síntesis de proteínas clave involucradas en la señalización de la insulina, contribuyendo aún más a la resistencia a la insulina (Salvadó *et al.*, 2015).

### **Estrés oxidativo**

El aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y/o la disminución en la capacidad antioxidante contribuyen a la resistencia a la insulina:

a) **Disfunción mitocondrial:** la función mitocondrial deteriorada puede llevar a un aumento en la producción de ERO, lo que puede dañar componentes celulares e interferir con la señalización de la insulina (Montgomery & Turner, 2015).

b) Activación de vías sensibles al estrés: las ERO pueden activar vías de señalización sensibles al estrés, incluidas JNK y NF- $\kappa$ B, que pueden deteriorar la señalización de la insulina (Newsholme *et al.*, 2016).

### **Desregulación de adipocinas**

El tejido adiposo es un órgano endocrino activo que produce diversas adipocinas, las cuales pueden influir en la sensibilidad a la insulina:

a) Resistencia a la leptina: a pesar de los niveles elevados de leptina en la obesidad, se desarrolla resistencia a la leptina, lo que conduce a un deterioro en la homeostasis energética y contribuye a la resistencia a la insulina (Friedman, 2016).

b) Reducción de la adiponectina: la adiponectina, una adipocina sensibilizadora de la insulina, típicamente se reduce en la obesidad y la DM2, contribuyendo a la resistencia a la insulina (Esmaili *et al.*, 2020).

### **Hiperinsulinemia y resistencia a la insulina**

La hiperinsulinemia crónica, inicialmente un mecanismo compensatorio, puede contribuir por sí misma a la resistencia a la insulina:

a) Regulación a la baja de los receptores de insulina: la exposición prolongada a niveles altos de insulina puede llevar a una regulación a la baja de los receptores de insulina, contribuyendo a la resistencia a la insulina (Shanik *et al.*, 2008).

b) Alteración en la sensibilidad de los tejidos: la hiperinsulinemia crónica puede llevar a cambios diferenciales en la sensibilidad a la insulina entre los tejidos, lo que potencialmente exacerba la disfunción metabólica (Templeman *et al.*, 2017).

## **Factores genéticos y epigenéticos**

La predisposición genética y las modificaciones epigenéticas juegan un papel en la resistencia a la insulina:

a) Variantes genéticas: se han asociado numerosas variantes genéticas con un mayor riesgo de resistencia a la insulina y DM2, afectando varios aspectos del metabolismo de la glucosa y los lípidos (Barroso & McCarthy, 2019).

b) Modificaciones epigenéticas: los factores ambientales pueden inducir cambios epigenéticos que afectan la expresión génica relacionada con la señalización de la insulina y el metabolismo, contribuyendo potencialmente a la resistencia a la insulina (Ling & Rönn, 2019).

## **Senescencia celular y envejecimiento**

La senescencia celular y los cambios relacionados con el envejecimiento contribuyen a la resistencia a la insulina:

a) Acumulación de células senescentes: las células senescentes se acumulan en varios tejidos con la edad y en la obesidad, secretando factores proinflamatorios (fenotipo secretor asociado a la senescencia, SASP) que pueden contribuir a la resistencia a la insulina (Palmer *et al.*, 2019).

b) Disfunción mitocondrial relacionada con la edad: el envejecimiento está asociado con una disminución en la función mitocondrial, lo que puede contribuir a la resistencia a la insulina mediante un aumento en la producción de ERO y una alteración en el metabolismo energético (Bratic & Larsson, 2013).

## **Complicaciones crónicas de la diabetes**

Las complicaciones microvasculares diabéticas están estrechamente relacionadas con la duración e intensidad de la hiperglucemia (Forbes & Cooper, 2013). La hiperglucemia promueve el desarrollo de complicaciones microvasculares a través de la activación de diversas rutas metabólicas, que incluyen el aumento del flujo de la ruta de los polioles, incremento en la formación de productos finales de glicación avanzada (AGE), así como el aumento de los receptores de estos últimos, el aumento del flujo de la hexosamina y un incremento de las ERO intracelulares y activación de las isoformas de PKC (Forbes & Cooper, 2013; Cole y Florez, 2020). Los factores genéticos juegan un papel importante en la susceptibilidad a las complicaciones microvasculares. La DT2 también afecta la macrovasculatura, adicionalmente por la incidencia de infarto al miocardio, la enfermedad vascular periférica y el accidente cerebrovascular aumentan notablemente (Cole & Florez, 2020). Las ERO deterioran la angiogénesis, activan rutas proinflamatorias y cambios epigenéticos que resultan en la expresión de genes proinflamatorios (Demir *et al.*, 2021). Estos mismos mecanismos bioquímicos y moleculares que contribuyen a las complicaciones microvasculares también contribuyen a las complicaciones macrovasculares y guardan una relación bidireccional en el deterioro de la salud.

## **Enfermedad renal diabética**

La enfermedad renal diabética (ERD) también conocida como nefropatía diabética (ND) es la principal complicación microvascular reportada en pacientes con diabetes mellitus y representa la principal causa de enfermedad renal crónica y

terminal en todo el mundo de acuerdo al Informe del Atlas sobre la Diabetes y la Enfermedad Renal de la FID (2023).

Los mecanismos patogénicos de la enfermedad renal diabética, tratan de una enfermedad compleja y heterogénea con múltiples factores patogénicos que se superponen (Forbes & Thorburn, 2018). Pueden clasificarse ampliamente en factores metabólicos, hemodinámicos, de crecimiento y factores proinflamatorios o profibróticos, mecanismos epigenéticos y anomalías de histonas y cromosomas que además convergen en la generación de estrés oxidativo (Forbes & Thorburn, 2018; Agarwal, 2021; Sakashita *et al.*, 2021). Estos factores patogénicos producen lesiones en diferentes compartimientos renales: glomérulos, túbulos, intersticio y vasculatura. Una miríada de moléculas, receptores, enzimas y factores de transcripción participan en el proceso que conduce desde las primeras etapas de la enfermedad renal hasta el agrandamiento de los riñones por la hipertrofia, matriz extracelular expandida, glomeruloesclerosis, hialinosis vascular, fibrosis intersticial y atrofia tubular y la pérdida de la funcionalidad renal que culmina en enfermedad renal terminal (Cao y Cooper, 2011).

### **Cambios metabólicos**

Los cambios tempranos en la ERD son desencadenados por los factores metabólicos, siendo la hiperglucemia el principal factor desencadenante provocando daños estructurales y funcionales en el riñón o también pueden ser inducidos por los productos del metabolismo energético, incluido el de la glucosa (Forbes & Thorburn, 2018) (fig. 2).

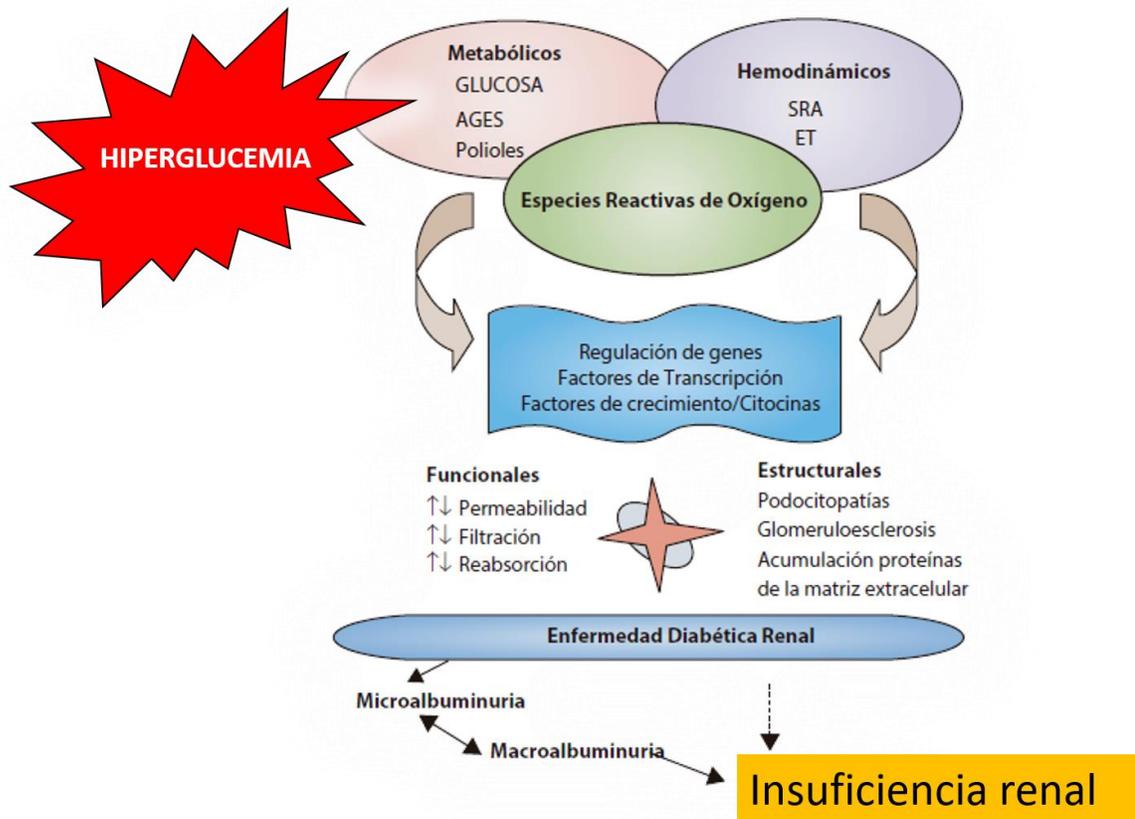


Figura 4. Esquema de la patogénesis de la enfermedad renal diabética. Modificado de Cao y Cooper, 2011

## Productos avanzados de glicación

Durante eventos hipoglucémicos, la glucosa *per se* a través de mecanismos no enzimáticos da lugar a la producción de productos finales de glicación avanzada (AGE). Tanto las proteínas y los lípidos intracelulares como extracelulares se modifican negativamente en AGE alterando su funcionalidad cuando sus grupos constituyentes interactúan con precursores de AGE (glúcidos reductores) como el glicoxal, metilglicoxal y deoxiglucosona, los ácidos nucleicos y los glúcidos y otros

componentes de la matriz extracelular pueden ser modificados en AGE (Thomas *et al.*, 2005). Una vez formados los AGE pueden unirse con diferentes receptores de AGE (RAGE) o interaccionar anormalmente con los componentes celulares (Vlassara & Palace, 2002; Coughlan *et al.*, 2008). La glicación de las moléculas provoca lesiones por dos mecanismos principales: mediado por receptores y no mediada por receptores. La activación de estos receptores en las células desencadena la activación de rutas de señalización como por ejemplo NFκB, PI3K/Akt y MAPK/ERK y la generación de ERO por acción de las NADPH oxidasas provocando la proliferación e hipertrofia celular, inflamación, angiogénesis, disfunción endotelial y la producción de matriz celular (Vlassara, 2014; Khalid *et al.*, 2022).

Desde un punto de vista central del metabolismo en el desarrollo de la ERD, el factor más importante en la generación excesiva de ERO por la hiperglucemia es el metabolismo de la glucosa por los diferentes tipos celulares. Para salvaguardar la homeóstasis celular es fundamental que las células sean capaces de disminuir el transporte excesivo de glucosa a través de la membrana plasmática hacia el citosol (Forbes *et al.*, 2008; Flemming *et al.*, 2018). Sin embargo, ciertas poblaciones celulares, incluidas las células endoteliales, las células mesangiales en los glomérulos renales y de Schwann en los nervios periféricos, no son capaces de disminuir adecuadamente las tasas de transporte de glucosa para evitar cambios excesivos en las concentraciones intracelulares de glucosa e incluso se ha identificado un aumento en la captación de la glucosa en muchas poblaciones celulares del riñón diabético, incluidas las células epiteliales glomerulares, las células mesangiales y las células epiteliales tubulares proximales y por lo tanto, estas poblaciones celulares específicas pueden ser

particularmente susceptibles al medio diabético (Flemming *et al.*, 2018; Fan *et al.*, 2024).

### **Ruta de los polioles**

El incremento de glucosa en el medio diabético, consecuentemente incrementa el flujo de la glucosa hacia esta ruta. En esta ruta la enzima aldosa reductasa convierte la glucosa en sorbitol, el cual es oxidado por acción de la sorbitol deshidrogenasa a fructosa. Esta ruta metabólica es dependiente de NADPH y NAD<sup>+</sup> como cofactores enzimáticos. Una excesiva tasa de conversión de glucosa por esta ruta agota los niveles de NADPH, cofactor necesario para la regeneración del antioxidante más abundante en el organismo el glutatión por la enzima glutatión reductasa. Adicionalmente, el sorbitol generado por esta ruta es altamente hidrofílico y su acumulación intracelular, al igual que la fructosa resulta en estrés y daño osmótico en las células. En los riñones dicha acumulación afecta la osmolaridad renal y causar lesiones glomerulares, tubulares y tubulointersticiales (Yan, 2018).

### **Diacilglicerol y PKC**

La proteína cinasa C (PKC) es una familia clave de enzimas involucradas en vías de señalización intracelulares críticas lo que influye en una variedad de eventos celulares como la proliferación celular y la regulación de la expresión génica y en el riñón son importantes para la función vascular, en el estado fisiológico, las isoformas de PKC, incluyendo  $\alpha$ ,  $\beta$  (I y II) y  $\gamma$ , contienen motivos de unión a diacilglicerol (DAG) y fosfolípidos dependientes de calcio, por lo que requieren tanto DAG como calcio para que ocurra la activación (Jubaidi *et al.*, 2022). En la

diabetes, la producción de DAG se incrementa debido a un aumento en la glucólisis y un nivel elevado de gliceraldehído-3-fosfato y glicerol-3-fosfato intracelulares. PKC también puede ser activado por ERO y AGE. En la diabetes el aumento de la actividad de la PKC puede potenciar la síntesis de angiotensina II y prostaglandinas vasodilatadoras, lo que conduce a un aumento de la tasa de filtración glomerular (TFG) y la presión de filtración, predisponiendo a los individuos al desarrollo de la enfermedad renal diabética (ERD). La sobreexpresión inducida por la PKC de factores de crecimiento fibrosos, particularmente el factor de crecimiento transformante- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), contribuye a la acumulación de la MEC, una característica de la ERD. La activación de PKC induce la fosforilación de las subunidades de la NADPH oxidasa, lo que resulta en una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el riñón. Este estrés oxidativo conduce a la disfunción mitocondrial, daño del ADN y apoptosis de las células renales, exacerbando el deterioro de la función renal (Pan *et al.*, 2022).

### **Ruta de la hexosamina**

La mayoría de la glucosa es metabolizada a través de la glucólisis y únicamente 2-5% de la glucosa ingresa en la ruta de la hexosamina cuando los niveles de glucosa son normales (Buse, 2006). Sin embargo, en condiciones de hiperglucemia esta ruta se activa significativamente en detrimento de la salud. La activación de la vía de la hexosamina permite el ingreso de glucosa a la célula, donde se metaboliza por glucólisis, convirtiendo fructosa-6-fosfato en glucosamina-6-fosfato (GlucN-6-P) a través de la enzima glutaminasa: fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFAT). Este paso representa la etapa limitante de la

velocidad en la ruta. La GlucN-6-P se procesa posteriormente hasta convertirse en uridina-5'-difosfato-N-acetilglucosamina (UDP-GlucNAc). UDP-GlucNAc es el precursor de todos los azúcares amino involucrados en la producción de glicoproteínas, glicolípidos, proteoglicanos y glicosaminoglicanos. Se ha demostrado que un flujo incrementado de glucosa a través de esta vía participa en la resistencia a la insulina y en la producción de citocinas, factores de crecimiento y ERO (Schleicher & Weigert, 2000; Buse, 2006). La hiperactividad de esta enzima y la vía de la hexosamina se han asociado con alteraciones en la expresión génica y un aumento en la expresión de factores de transcripción como TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ 1, que inhiben la división de las células mesangiales y activan la proliferación de la matriz de colágeno y el engrosamiento de la membrana basal (Shi *et al.*, 2018). Todo esto es responsable del papel tóxico y prooxidante de la vía de la hexosamina en la diabetes y especialmente la ERD.

### **Funcionalidad mitocondrial en la enfermedad renal diabética**

Los riñones son órganos altamente demandantes de energía y requieren una alta densidad mitocondrial para el mantenimiento de las funciones renales (Chevalier, 2023). Los riñones son los segundos órganos con mayor contenido mitocondrial después del corazón y de consumo de oxígeno molecular (Bhargava & Schnellmann, 2017). El metabolismo basal de los riñones es elevado debido a la gran necesidad de mitocondrias para garantizar la energía suficiente para permitir su funcionamiento. Dentro de las principales funciones de los riñones es la eliminación de los desechos sanguíneos, reabsorción de nutrientes como la glucosa y iones, regulación del equilibrio de electrolitos, así como de líquidos, el mantenimiento de la homeostasis ácido-base y la regulación de la presión

sanguínea (Bhargava & Schnellmann, 2017). En los riñones, las mitocondrias son más abundantes en los túbulos proximales y en la rama ascendente gruesa del asa de Henle, donde sustentan las altas demandas energéticas de los mecanismos de transporte activo (Emma *et al.*, 2016). La mayoría del oxígeno molecular consumido por los riñones es metabolizado a través de la fosforilación oxidativa (Bhargava & Schnellmann, 2017). En la mayoría de las células eucariontas, con algunas excepciones dirigen la mayoría de los sustratos hacia la mitocondria, donde se genera energía gracias al ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) y la fosforilación oxidativa (OXPHOS), siendo hasta más efectivo que otros procesos como la glucólisis (Galvan *et al.*, 2021). La OXPHOS se conforma de dos componentes estrechamente relacionados: la cadena de transporte de electrones y la quimiosmosis. La cadena de transporte de electrones, implica una serie de reacciones de oxido-reducción finamente reguladas. En este proceso el oxígeno actúa como el aceptor electrónico por los complejos proteicos I al IV y la energía liberada cuando se transfieren los electrones para formar un gradiente electroquímico (Vercellino & Sazanov 2022). En la quimiósmosis, la energía almacenada en el gradiente se utiliza para sintetizar ATP por acción de la ATP sintasa a través de la fuerza protón-motriz. Estos complejos proteicos se encuentran unidos a la membrana mitocondrial interna y se encuentran conectados entre sí por acarreadores de electrones como la coenzima Q10 y el citocromo c. El primer complejo de OXPHOS, el complejo I (NADH: ubiquinona oxidoreductasa), consta de aproximadamente 45 subunidades, una de las cuales está presente en dos copias por complejo. En el complejo I, el NADH proporciona dos electrones (producidos a partir de los combustibles que ingresaron al ciclo de Krebs), que se transfieren a la coenzima Q. Las reacciones reductoras

subsiguientes conducen a la translocación de cuatro protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranoso, produciendo un gradiente de protones. En el complejo II (succinato: ubiquinona oxidorreductasa o succinato deshidrogenasa, que comprende cuatro subunidades), electrones adicionales que provienen del succinato proporcionado por el ciclo de Krebs se entregan a la coenzima Q. En el complejo III (ubiquinol: citocromo *c* oxidorreductasa), se translocan seis protones hacia el espacio intermembranoso como resultado del transporte de electrones para reducir el citocromo *c*. El complejo IV (citocromo *c* oxidasa) elimina cuatro electrones de cuatro moléculas de citocromo *c* reducido, que luego se transfieren al oxígeno molecular (O<sub>2</sub>), produciendo dos moléculas de agua. Al mismo tiempo, se translocan cuatro protones a través de la membrana hacia el espacio intermembranoso. Finalmente, el ATP se sintetiza a partir de ADP más Pi por el complejo V (ATP sintasa F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>), que utiliza un par de torsión mecánica similar a la vista en un motor de combustión. Para generar energía para este proceso, el gradiente de protones generado por los complejos I–IV se utiliza para impulsar los protones de vuelta hacia la matriz mitocondrial desde el espacio intermembranoso, generando el potencial de membrana. Finalmente, la ATP sintasa (Complejo V) luego utiliza este gradiente para generar ATP (Bhargava & Schnellmann, 2017).

Más allá de la producción de energía, las mitocondrias en las células renales están involucradas en:

Homeostasis del calcio: las mitocondrias actúan como amortiguadores de calcio, ayudando a regular los niveles intracelulares de calcio, cruciales para diversas vías de señalización (Szabadkai & Duchon, 2008).

Producción de especies reactivas de oxígeno: aunque a menudo se considera negativamente, la producción controlada de ERO es esencial para la señalización celular y la adaptación al estrés (Schieber & Chandel, 2014).

Regulación de la apoptosis: las mitocondrias desempeñan un papel central en la vía intrínseca de la apoptosis, lo cual es importante para el desarrollo normal del riñón y la homeostasis tisular (Tait & Green, 2010).

Flexibilidad metabólica: las mitocondrias renales pueden adaptarse para utilizar diferentes sustratos en la producción de energía, lo que permite a las células renales responder a condiciones metabólicas cambiantes (Galvan *et al.*, 2017).

Metabolismo del hierro: las mitocondrias son esenciales en el metabolismo del hierro, ya que participan en la síntesis de grupos hierro-azufre (Fe-S) y hemo, ambos fundamentales para numerosas enzimas y proteínas involucradas en procesos celulares clave. El transporte y almacenamiento adecuado de hierro dentro de las mitocondrias es crucial para prevenir la acumulación de hierro libre, que puede catalizar la formación de especies reactivas de oxígeno, contribuyendo a la disfunción mitocondrial y el daño celular (Paul *et al.*, 2017).

En el contexto de la diabetes, la hiperglucemia crónica y las alteraciones metabólicas asociadas crean un entorno particularmente perjudicial para la función mitocondrial. El exceso de glucosa disponible lleva a un aumento del flujo a través de la cadena de transporte de electrones, lo que resulta en una mayor producción de ERO (Brownlee, 2005). Este estrés oxidativo, junto con otros factores relacionados con la diabetes, como la lipotoxicidad y la inflamación, puede deteriorar gravemente la función y estructura mitocondrial (Forbes & Thorburn, 2018). La relación entre la disfunción mitocondrial y la nefropatía

diabética (ERD) es bidireccional y se auto-refuerza. Las alteraciones metabólicas iniciales provocan daño mitocondrial, lo que a su vez agrava la disfunción celular y contribuye a la progresión de la enfermedad renal. Este ciclo vicioso involucra múltiples mecanismos, incluyendo la alteración de la dinámica mitocondrial, la biogénesis mitocondrial deficiente y las modificaciones en el ADN mitocondrial (Higgins & Coughlan, 2014). En la ERD, se ha reportado que las mitocondrias experimentan alteraciones estructurales significativas, en la dinámica mitocondrial y en la biogénesis mitocondrial. La diabetes promueve una fisión mitocondrial excesiva, lo que resulta en redes mitocondriales fragmentadas (Galvan *et al.*, 2021). La membrana interna mitocondrial muestra una estructura de crestas desorganizada, lo que afecta la eficiencia de la cadena de transporte de electrones (Coughlan *et al.*, 2016). Se observa hinchazón mitocondrial en las células renales expuestas a condiciones de alta glucosa, lo que indica una integridad de la membrana comprometida (Czajka *et al.*, 2015).

La dinámica mitocondrial, que incluye los procesos de fisión y fusión, se ve alterada en la nefropatía diabética (ERD). La sobreexpresión de proteínas de fisión, como Drp1, conduce a una fragmentación mitocondrial excesiva (Ayanga *et al.*, 2016). La regulación negativa de las proteínas de fusión (Mfn1, Mfn2, OPA1) resulta en una reducción de la interconexión mitocondrial y un control de calidad deficiente (Kim & Lee, 2021). Los cambios en la funcionalidad mitocondrial afectan su distribución dentro de las células, lo que podría impactar la provisión local de energía (Fan *et al.*, 2024).

La biogénesis mitocondrial, el proceso de generación de nuevas mitocondrias, está comprometida en la DKD. El regulador clave de la biogénesis mitocondrial,

PGC-1 $\alpha$ , está disminuido en la nefropatía diabética (Fontecha-Barriuso *et al.*, 2020). Se observa una reducción en el número de copias de ADN mitocondrial, lo que indica una renovación mitocondrial deficiente (Czajka *et al.*, 2015). La proteína quinasa activada por AMP (AMPK), un sensor energético en respuesta a la disminución de ATP y el aumento de ADP y ATP y es un regulador importante de la biogénesis mitocondrial, la disfunción contribuye a la reducción del contenido mitocondrial (Dugan *et al.*, 2013). Estas alteraciones en la estructura, dinámica y biogénesis mitocondrial contribuyen colectivamente a la disfunción general de las mitocondrias en la nefropatía diabética, preparando el terreno para un mayor daño celular y la progresión de la ERD.

El estrés oxidativo es un factor clave en la disfunción mitocondrial en la enfermedad renal diabética. El aumento de la producción de ERO por la hiperglucemia genera un aumento del flujo de electrones a través de la cadena de transporte de electrones, lo que resulta en una mayor producción de superóxido, particularmente en los complejos I y III (Brownlee, 2005). La diabetes reduce la actividad de enzimas antioxidantes clave, como la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa, comprometiendo la capacidad de la célula para neutralizar los ERO (Forbes *et al.*, 2008). El ADN mitocondrial (ADNmt) es particularmente susceptible al daño oxidativo debido a su proximidad a los sitios de producción de ERO y a sus limitados mecanismos de reparación, lo que lleva a una mayor disfunción mitocondrial (Coughlan *et al.*, 2016).

Las alteraciones en el manejo del calcio contribuyen al deterioro mitocondrial. La diabetes altera la asociación entre el retículo endoplásmico y las mitocondrias, afectando la transferencia y señalización del calcio (Arruda & Hotamisligil, 2015).

La captación excesiva de calcio por las mitocondrias desencadena la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, lo que lleva al hinchamiento mitocondrial y potencialmente a la muerte celular (Szabadkai & Duchon, 2008). Las alteraciones en los niveles de calcio mitocondrial afectan la actividad de las deshidrogenasas dependientes de calcio en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), impactando la producción de energía (Bhargava & Schnellmann, 2017).

El ADN mitocondrial es particularmente vulnerable en el medio diabético. El aumento del estrés oxidativo conduce a una mayor tasa de mutaciones en el ADNmt, afectando la expresión de proteínas codificadas por mitocondrias (Czajka *et al.*, 2015). La diabetes se asocia con una disminución en el número de copias de ADNmt posiblemente debido a una biogénesis mitocondrial deteriorada o un aumento en la degradación de ADNmt (Sharma *et al.*, 2013). Se han observado alteraciones en los patrones de metilación del ADNmt en condiciones de diferentes estreses metabólicos, lo que podría afectar la expresión de genes mitocondriales, por ejemplo, alteraciones en los perfiles de metilación del gen MT-TF, MT-TF codifica para un ARN de transferencia (ARNt) específico del aminoácido fenilalanina se ha visto asociada con epilepsia y nefritis intersticial (Mishra & Kowluru, 2015; Sharma *et al.*, 2019).

La mitofagia, la degradación selectiva de mitocondrias dañadas, está desregulada en la DKD. La vía PINK1/Parkin, crucial para la iniciación de la mitofagia, está deteriorada en la nefropatía diabética, lo que lleva a la acumulación de mitocondrias disfuncionales (Xiao *et al.*, 2017). La diabetes afecta la formación y maduración de los autofagosomas, comprometiendo la capacidad de la célula para eliminar mitocondrias dañadas (Lenoir *et al.*, 2015). La fisión excesiva sin

una mitofagia adecuada puede llevar a la acumulación de mitocondrias fragmentadas y disfuncionales (Zhan *et al.*, 2015). La disfunción mitocondrial conduce a déficits energéticos significativos. La fosforilación oxidativa deteriorada resulta en niveles disminuidos de ATP, afectando los procesos dependientes de energía en el riñón (Bhargava & Schnellmann, 2017) (fig. 3). Otra consecuencia de la diabetes es la inflexibilidad metabólica; las mitocondrias disfuncionales son menos capaces de cambiar entre diferentes fuentes de combustible, lo que compromete la capacidad del riñón para adaptarse a condiciones metabólicas cambiantes (Galvan *et al.*, 2017). La depleción energética afecta la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa, crucial para mantener los gradientes iónicos celulares y la función tubular (Dugan *et al.*, 2013; Galvan *et al.*, 2021).

El deterioro mitocondrial contribuye a la muerte celular y al envejecimiento prematuro. La disfunción mitocondrial desencadena la liberación de factores proapoptóticos, lo que conduce a un aumento de la muerte celular en el riñón diabético (Ahmad *et al.*, 2021). El estrés mitocondrial crónico promueve la senescencia celular, contribuyendo a la progresión de la fibrosis renal (Zhan *et al.*, 2015). La depleción energética y el aumento del estrés oxidativo afectan la progresión del ciclo celular, lo que podría deteriorar la reparación y regeneración tisular (Czajka & Malik, 2016; Forbes & Thorburn, 2018).

La disfunción mitocondrial exacerba los procesos inflamatorios y fibróticos. El daño mitocondrial y la producción de ERO activan el inflamosoma NLRP3, promoviendo la inflamación en el riñón diabético (Shahzad *et al.*, 2015). La disfunción mitocondrial aumenta la señalización de TGF- $\beta$  y la transición epitelio-mesenquimal, contribuyendo a la fibrosis renal (Wang *et al.*, 2021). Además, la función mitocondrial deteriorada en las células endoteliales promueve la inflamación vascular y contribuye a las complicaciones microvasculares (Garcias-Garcia *et al.*, 2014). Estos mecanismos y consecuencias de la disfunción mitocondrial forman una red compleja e interconectada que impulsa la progresión de la ERD.

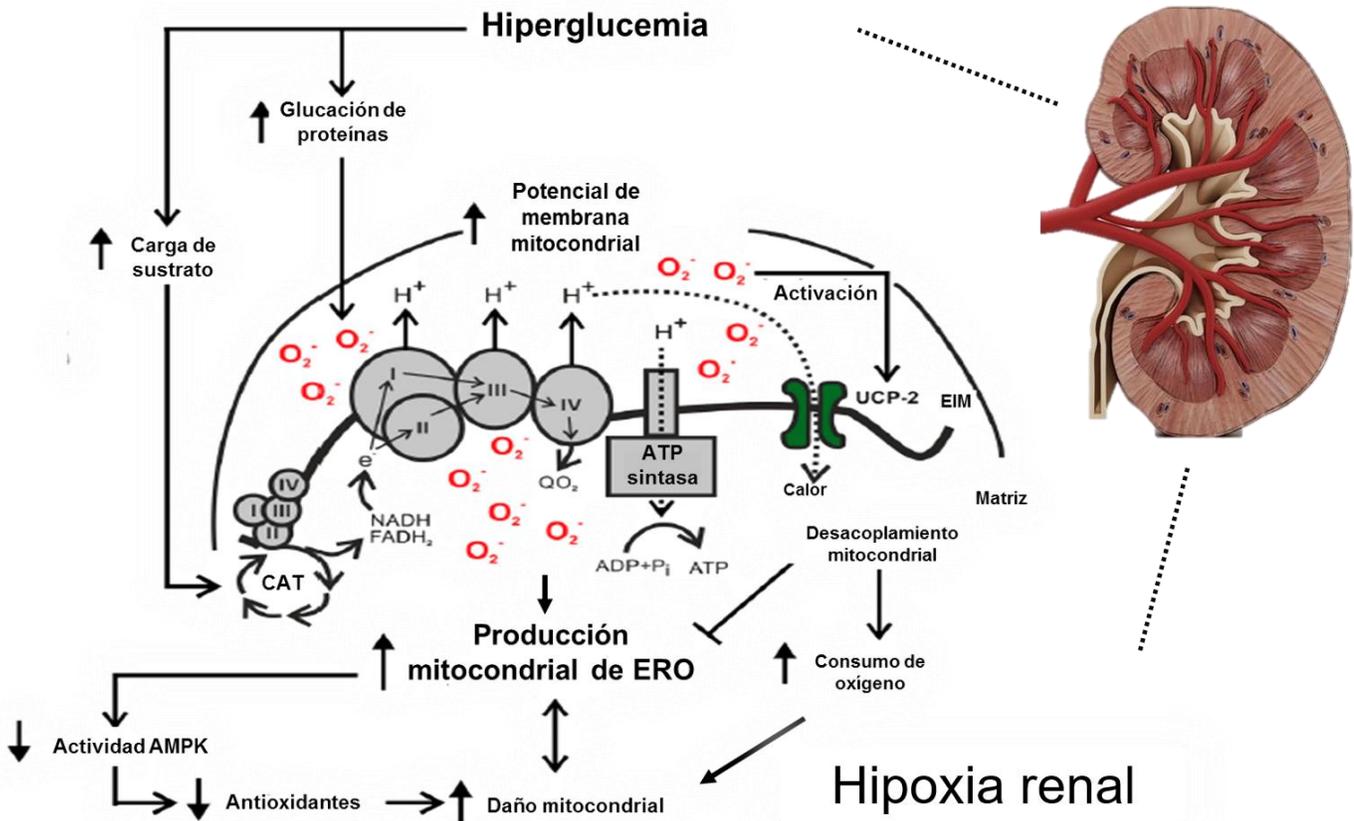


Figura 5. Disfuncionalidad mitocondrial en la enfermedad renal diabética.

## **Estrés oxidativo en la enfermedad renal diabética**

El concepto de estrés oxidativo tiene sus raíces a mediados del siglo XX, con el surgimiento de la biología de los radicales libres. En 1954, Rebeca Gerschman y col. propusieron que la toxicidad del oxígeno y la toxicidad por radiación compartían un mecanismo común que involucraba a los radicales libres (Gerschman *et al.*, 1954). Esta idea innovadora sentó las bases para futuras investigaciones sobre los efectos biológicos de las especies reactivas de oxígeno (ERO). Poco después, en 1956, Denham Harman introdujo la teoría de los radicales libres del envejecimiento, postulando que la acumulación de daños por radicales libres a lo largo del tiempo contribuye al proceso de envejecimiento y las enfermedades relacionadas con la edad (Harman, 1956). Estos trabajos tempranos despertaron un gran interés en el papel de los radicales libres en los sistemas biológicos y sus posibles implicaciones para la salud y la enfermedad.

El concepto de estrés oxidativo continuó evolucionando durante las décadas de 1960 y 1970, con investigadores que descubrieron diversas fuentes de radicales libres en los sistemas biológicos y sus efectos sobre los componentes celulares. El descubrimiento de la superóxido dismutasa (SOD) por McCord y Fridovich en 1969 fue un hito crucial, proporcionando evidencia de la existencia de radicales superóxido en sistemas biológicos y demostrando la presencia de defensas antioxidantes endógenas (McCord & Fridovich, 1995). Este descubrimiento no solo confirmó la relevancia biológica de los radicales libres, sino que también destacó la importancia de los sistemas antioxidantes en el mantenimiento de la homeostasis celular. El término "estrés oxidativo" fue introducido formalmente por Helmut Sies en 1985, definiéndolo como "una alteración en el equilibrio

prooxidante-antioxidante a favor del primero". Esta definición encapsuló la noción de un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la capacidad de los sistemas biológicos para desintoxicar estos intermediarios reactivos o reparar el daño resultante. El trabajo de Sies fue fundamental para establecer el estrés oxidativo como un campo de estudio distintivo y destacar su potencial relevancia en diversas condiciones patológicas (Sies *et al.*, 2017).

A medida que la investigación en el terreno del estrés oxidativo avanzó, se hizo cada vez más evidente que la relación entre las ERO y la función celular era más compleja de lo que se pensaba inicialmente. El descubrimiento del óxido nítrico (NO) como molécula de señalización a finales de la década de 1980 por Furchgott, Ignarro y Murad reveló que algunas especies reactivas desempeñan funciones cruciales en procesos fisiológicos (Moncada & Higgs 2006) Este hallazgo desafió la visión predominante de las ERO como entidades puramente dañinas y provocó una reevaluación del concepto de estrés oxidativo. A la luz de estos desarrollos, Sies y col. propusieron una definición refinada del término "El estrés oxidativo es un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes a favor de los oxidantes que conduce a una alteración de la señalización y el control redox y/o daño molecular". Esta definición actualizada reconoció el papel de las ERO en la señalización redox en lugar de la eliminación completa de las especies oxidativas.

No obstante, el estrés oxidativo tiene una doble naturaleza, por una parte, el exceso de oxidantes causa daños a las moléculas esenciales, mientras que niveles moderados de oxidantes son cruciales para el mantenimiento de los procesos celulares a través de la señalización redox. Estos términos son llamados distrés oxidativo y eustrés oxidativo, respectivamente (Sies, 2020).

## **Eustrés oxidativo: los aspectos beneficiosos de las ERO**

El reconocimiento de que las ERO desempeñan papeles esenciales en la señalización celular y la homeostasis llevó al concepto de eustrés oxidativo. Este término se refiere a los niveles fisiológicos de estrés oxidativo que son necesarios para las funciones celulares normales y las respuestas adaptativas. Varias áreas clave demuestran la importancia del eustrés oxidativo:

**Señalización redox:** Niveles bajos de ERO, particularmente el peróxido de hidrógeno, actúan como segundos mensajeros en diversas vías de señalización. Por ejemplo, la producción de ERO inducida por factores de crecimiento puede conducir a la oxidación reversible y la inactivación de las proteínas tirosina fosfatasas, mejorando la transducción de señales (Rhee, 2006; Schieber & Chandel, 2014). Esta modulación de las vías de señalización dependiente del redox es crucial para procesos como la proliferación celular, la diferenciación y la supervivencia.

**Función inmune:** las ERO desempeñan un papel vital en la respuesta del sistema inmunológico a los patógenos. Las células fagocíticas, como los neutrófilos y los macrófagos, generan grandes cantidades de ERO a través del complejo NADPH oxidasa como parte de la explosión respiratoria, que es esencial para matar a los microorganismos invasores (Dupré-Crochet *et al.*, 2013; Segal, 2005). Además, las ERO contribuyen a la activación de los inflamosomas y la regulación de las respuestas inflamatorias (Tschopp & Schroder, 2010; Zhou *et al.*, 2011).

**Adaptación al ejercicio:** el ejercicio moderado induce un aumento transitorio en la producción de ERO, lo que desencadena respuestas adaptativas que conducen

a una mejor defensa antioxidante y una función mitocondrial mejorada. Este fenómeno, conocido como hormesis inducida por el ejercicio, contribuye a los beneficios para la salud de la actividad física regular (Radak *et al.*, 2005; Merry & Ristow, 2016).

Precondicionamiento isquémico: breves períodos de isquemia-reperfusión pueden proteger los tejidos contra insultos isquémicos posteriores más severos. Este efecto protector, conocido como precondicionamiento isquémico, está mediado en parte por la activación inducida por ERO de vías de supervivencia y la regulación al alza de las defensas antioxidantes (Yellon & Hausenloy, 2005; Halestrap *et al.*, 2007).

### **Distrés oxidativo: cuando las ERO se vuelven dañinas**

Si bien los niveles bajos a moderados de ERO son esenciales para la función celular, el estrés oxidativo excesivo o prolongado puede conducir al distrés oxidativo, caracterizado por daño celular, inflamación y diversas condiciones patológicas. Varios mecanismos contribuyen a los efectos dañinos del distrés oxidativo:

Peroxidación lipídica: las ERO pueden iniciar una reacción en cadena de peroxidación lipídica en las membranas celulares, lo que lleva a la formación de aldehídos reactivos como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal (4-HNE). Estos productos pueden dañar aún más las proteínas y el ADN, amplificando el daño oxidativo inicial (Niki, 2009).

Oxidación de proteínas: el exceso de ERO puede causar la oxidación irreversible de las cadenas laterales de las proteínas, lo que conduce a la fragmentación de

proteínas, el entrecruzamiento y la pérdida de función. Esto puede interrumpir los procesos celulares y contribuir a la acumulación de proteínas dañadas asociadas con el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas (Cadet & Davies, 2017). Las ERO pueden inducir diversas formas de daño al ADN, incluidas modificaciones de bases, roturas de cadena y entrecruzamientos ADN-proteína. Si no se repara adecuadamente, este daño puede conducir a mutaciones, inestabilidad genómica y muerte celular (Cooke *et al.*, 2003; Cadet & Davies, 2017). Adicionalmente, el estrés oxidativo puede dañar el ADN mitocondrial, las proteínas y los lípidos, lo que conduce a una función mitocondrial deteriorada y una producción de energía reducida. Esto puede crear un círculo vicioso de mayor producción de ERO y más daño mitocondrial (Murphy, 2009; Bratic & Larsson, 2013). El estrés oxidativo persistente puede desencadenar la senescencia celular o la apoptosis, contribuyendo a la disfunción tisular y el envejecimiento (van Deursen, 2014; Childs *et al.*, 2014).

El estrés oxidativo ha sido implicado en la patogénesis de numerosas enfermedades, incluyendo enfermedades cardiovasculares, trastornos neurodegenerativos, cáncer y diabetes (Liochev, 2013; Pizzino *et al.*, 2017). El reconocimiento del estrés oxidativo como un factor clave en estas condiciones ha estimulado la investigación de terapias basadas en antioxidantes y estrategias para modular el equilibrio redox con fines terapéuticos aunque siendo controversiales sus resultados en humanos, otros enfoques de la terapia antioxidante integran la compartimentalización y el uso de antioxidantes dirigidos a los orgánulo.

## **Sistemas antioxidantes**

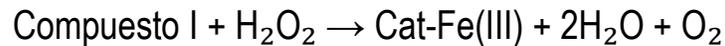
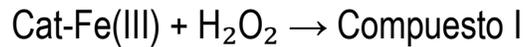
En respuesta a la excesiva producción de ERO durante la respiración o el metabolismo, los mamíferos hemos evolucionado diferentes sistemas de defensa antioxidantes no enzimáticos y enzimáticas capaces de secuestrar y neutralizar radicales libres y mantener el equilibrio redox. El equilibrio redox se mantiene mediante la prevención, interceptación y reparación. Para combatir los efectos deletéreos del estrés oxidativo, el riñón ha desarrollado un sofisticado sistema de defensa antioxidante que comprende componentes tanto enzimáticos como no enzimáticos (Gào & Schöttker, 2017). El sistema antioxidante enzimático incluye las superóxido dismutasas (SOD), catalasa, glutatión peroxidasas (GPx) y el sistema tiorredoxina, entre otros. Estas enzimas trabajan en concierto para neutralizar las ERO y mantener el equilibrio redox dentro de las células renales (Lushchak, 2014). Los antioxidantes no enzimáticos, como el glutatión, las vitaminas C y E y el ácido úrico, complementan el sistema enzimático al eliminar directamente los radicales libres y apoyar la regeneración de otros antioxidantes (Pisoschi & Pop, 2015) (fig. 4).

### **Antioxidantes enzimáticos**

#### **Catalasa**

La enzima antioxidante catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6), codificada por el gen CAT (cromosoma 11p13 humano) es una proteína tetramérica compuesta por cuatro subunidades idénticas, cada una de las cuales contiene un grupo hemo (Fe(III)-protoporfirina) en su sitio activo. El peso molecular del tetrámero es aproximadamente 240 kDa. La estructura cuaternaria de la enzima forma un núcleo en forma de barril  $\beta$  con cuatro canales que conducen a los sitios activos

profundamente enterrados (Kirkman & Gaetani, 2007). La catalasa cataliza principalmente la descomposición del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en agua y oxígeno. La reacción ocurre en dos pasos:



La eficiencia catalítica ( $\text{kcat/Km}$ ) de la catalasa es extremadamente alta, acercándose al límite controlado por difusión, con un número de recambio de aproximadamente  $4 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$  (Chelikani *et al.*, 2004).

Regulación de la actividad: la actividad de la catalasa se regula en varios niveles: nivel transcripcional: NRF2, FOXO3a y PGC-1 $\alpha$  son factores de transcripción clave que aumentan la expresión de la catalasa (Glorieux *et al.*, 2015). Modificaciones postraduccionales: La fosforilación por las cinasas de tirosina c-Abl y Arg puede mejorar la actividad de la catalasa (Cao *et al.*, 2003).

### **Glutación peroxidasa (GPx)**

Número de la Comisión de Enzimas: EC 1.11.1.9 (para GPx1)

La familia de las glutatión peroxidases (EC 1.11.1.9 para GPx1), consta de ocho isoformas conocidas en mamíferos (GPX1-GPX8), siendo GPx1, GPx3 y GPx4 las más relevantes en el riñón. Estas enzimas son selenoproteínas, conteniendo selenocisteína en sus sitios activos (Brigelius-Flohé & Maiorino, 2013).

Actividad catalítica: GPx cataliza la reducción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y peróxidos orgánicos (ROOH) utilizando glutatión (GSH) como agente reductor:

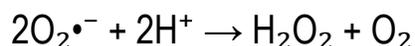


El mecanismo catalítico involucra una reacción tipo ping-pong con la selenocisteína ciclando entre las formas de selenol (SeH) y selenenil sulfuro (Se-SG) (Toppo *et al.*, 2009). NRF2, p53 y el factor inducible por hipoxia (HIF) regulan la expresión de GPx (Banning *et al.*, 2005). La disponibilidad de selenio es crucial para la síntesis y actividad de GPx (Steinbrenner & Sies, 2009). La fosforilación puede modular la actividad de GPx (Cao *et al.*, 2003).

### **Superóxido dismutasa (SOD)**

La familia de las superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1) está conformada por tres miembros (SOD1-3) en los humanos y son codificadas por los genes: SOD1 (Cu/Zn-SOD), SOD2 (Mn-SOD), SOD3 (EC-SOD). Existen tres principales isoformas de SOD en mamíferos: Cu/Zn-SOD citosólica (SOD1), Mn-SOD mitocondrial (SOD2) y Cu/Zn-SOD extracelular (SOD3). Cada isoforma tiene localizaciones subcelulares distintas y cofactores metálicos (Fukai & Ushio-Fukai, 2011).

La SOD cataliza la dismutación del superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular:



La reacción ocurre mediante un mecanismo de ping-pong que involucra la reducción y oxidación cíclica del centro metálico (Sheng *et al.*, 2014). La actividad de las diferentes isoformas es regulada a nivel transcripcional por NRF2, NF- $\kappa$ B y AP-1 (Miao & St Clair, 2009). A nivel postraduccional, la fosforilación, acetilación y nitración pueden afectar la actividad de SOD (Yamakura & Kawasaki, 2010). La

incorporación de cofactores metálicos en las superóxido dismutasas (SODs) es un proceso crucial para su función antioxidante en el riñón y otros tejidos. Cada isoforma de SOD requiere metales específicos: cobre y zinc para SOD1 y SOD3 y manganeso para SOD2. Este proceso no es meramente estructural, sino fundamental para la actividad catalítica, estabilidad y correcta localización subcelular de las enzimas. La incorporación adecuada depende de sistemas celulares complejos, incluyendo chaperonas de metales. Deficiencias en este proceso pueden comprometer la defensa antioxidante, aumentando la vulnerabilidad a estrés oxidativo (Culotta *et al.*, 2006).

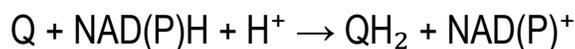
### **NAD(P)H: quinona oxidoreductasa 1 (NQO1)**

Número de la Comisión de Enzimas: EC 1.6.99.2

Gen: NQO1 (cromosoma 16q22.1 humano)

NQO1 es una flavoproteína que forma homodímeros, con cada subunidad conteniendo una molécula de flavina adenina dinucleótido (FAD) como grupo prostético. La enzima tiene un peso molecular de aproximadamente 30 kDa por subunidad (Dinkova-Kostova & Talalay, 2010).

Actividad catalítica: NQO1 cataliza la reducción de dos electrones de quinonas y quinona iminas a hidroquinonas, utilizando NADH o NADPH como donantes de electrones:

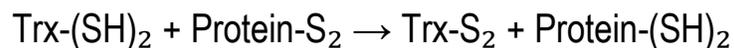


Esta reacción previene la formación de radicales semiquinona y la generación subsiguiente de especies reactivas de oxígeno (Ross & Siegel, 2017).

La regulación de NQO1 es mediada por NRF2 y es el principal factor de transcripción que regula la expresión de NQO1 a través del Elemento de Respuesta Antioxidante (ARE) (Venugopal & Jaiswal, 1996). La fosforilación por la proteína cinasa C puede mejorar la actividad de NQO1 (Ross & Siegel). Interacciones proteína-proteína: NQO1 puede interactuar y estabilizar al supresor tumoral p53, influyendo en las respuestas al estrés celular (Asher *et al.*, 2002).

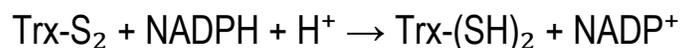
### **Sistema de tioredoxina**

El sistema de tioredoxina está compuesto por tioredoxina (Trx), la reductasa de tioredoxina (TrxR) y el NADPH, a tioredoxina (Trx) (EC 1.8.1.9), codificada por los genes TXN (Trx1, citosólica), TXN2 (Trx2, mitocondrial) (Lu & Holmgren, 2014). Las tioredoxinas son proteínas pequeñas (aproximadamente 12 kDa) con un motivo activo conservado de Cys-Gly-Pro-Cys (Holmgren, 1985). Trx reduce los disulfuros de proteínas y otros componentes celulares oxidados:



Para el mantenimiento del sistema tioredoxina es necesaria la reducción a través de la Reductasa de Tioredoxina (TrxR) (EC 1.8.1.9), codificada por el gen TXNRD1 (citosólica), TXNRD2 (mitocondrial), TXNRD3 (predominantemente expresada en los testículos) (Dou *et al.*, 2022). La TrxR es una flavoenzima homodimérica que contiene un residuo de selenocisteína en su sitio activo. Cada subunidad tiene un peso molecular de aproximadamente 55 kDa (Arnér, 2009).

TrxR cataliza la reducción dependiente de NADPH de la tioredoxina oxidada:



Regulación de la actividad del Sistema de Tioredoxina: Regulación transcripcional: NRF2, AP-1 y HIF-1 $\alpha$  regulan la expresión de Trx y TrxR (Powis & Montfort, 2001). La oxidación, nitrosilación y glutationilación pueden modular la actividad de Trx (Haendeler, 2006). La proteína interactuante con tioredoxina (TXNIP) se une e inhibe a Trx, influyendo en el equilibrio redox celular (Yoshihara *et al.*, 2014).

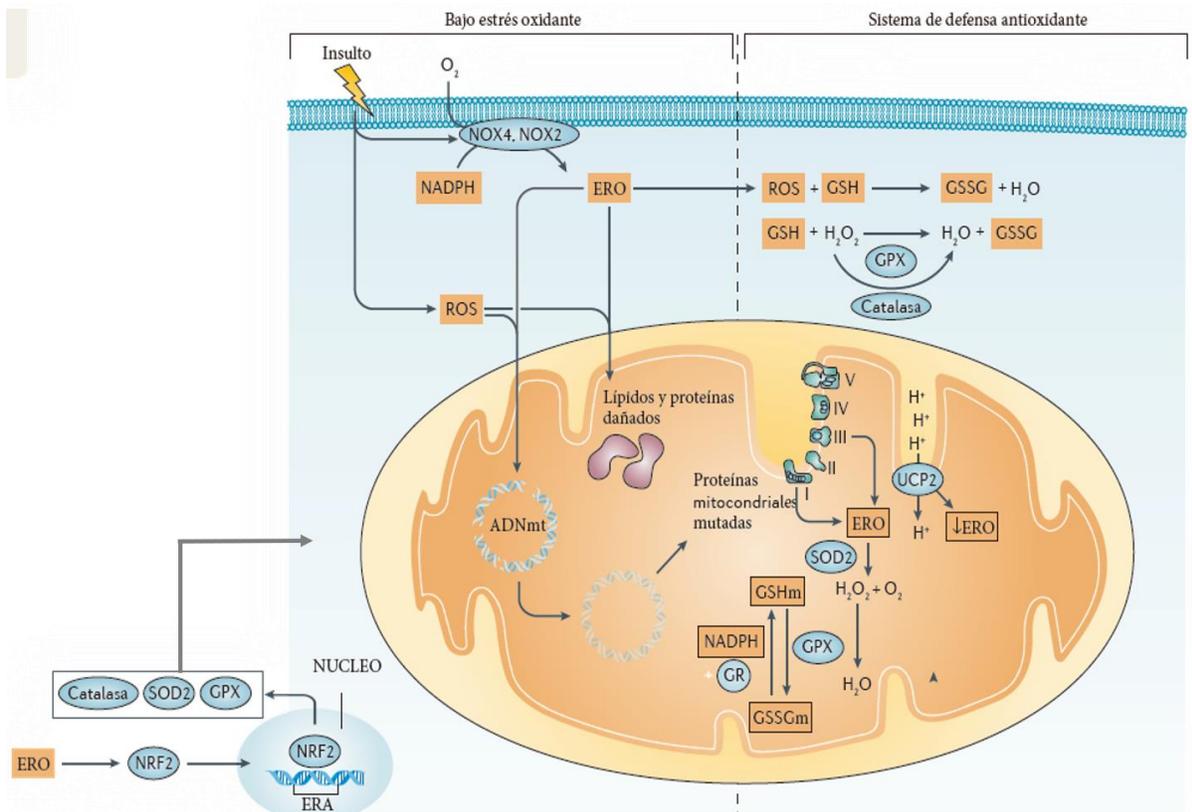


Figura 8. Sistemas antioxidantes. Modificado de Bhargava y Schnellmann, 2017

## Antioxidantes no enzimáticos en el riñón

Los antioxidantes no enzimáticos desempeñan un papel fundamental en la protección renal contra el estrés oxidativo, complementando los sistemas antioxidantes enzimáticos. Entre los principales se encuentran el glutatión (GSH), un tripéptido abundante que actúa como cofactor y regenerador de otros

antioxidantes; la vitamina C, que neutraliza especies reactivas y regenera la vitamina E; la vitamina E, que previene la peroxidación lipídica en membranas celulares; el ácido úrico, que elimina radicales libres y quela metales, aunque su papel es complejo debido a los efectos perjudiciales de la hiperuricemia; la coenzima Q10, importante para la función mitocondrial y la inhibición de la peroxidación lipídica; y la melatonina, que además de eliminar radicales libres, regula positivamente las enzimas antioxidantes. Estos antioxidantes actúan de diversas formas: donando electrones, rompiendo cadenas de peroxidación, quelando metales y activando vías de señalización protectoras. Su relevancia en la salud renal se evidencia en diversos modelos de lesión renal, donde han demostrado efectos protectores contra daños por isquemia-reperfusión, nefrotoxicidad inducida por fármacos y complicaciones de la nefropatía diabética, entre otros (Hong & Park, 2021).

### **Factores genéticos**

Los polimorfismos en los genes de las enzimas antioxidantes pueden afectar su expresión y actividad, por ejemplo, los polimorfismos CAT-262C/T y T1667T asociados con una alteración en la expresión y actividad de la catalasa en la nefropatía diabética (Chistiakov *et al.*, 2004). El polimorfismo GPx1 Pro198Leu: Vinculado con una reducción en la actividad de GPx y un aumento del riesgo de complicaciones diabéticas (Hamanishi *et al.*, 2004). El polimorfismo SOD2 Ala16Val: Afecta la actividad de MnSOD y se ha asociado con la susceptibilidad a la nefropatía diabética (Möllsten *et al.*, 2007).

## **Regulación epigenética**

La regulación epigenética juega un papel crucial en la modulación de la expresión de genes antioxidantes en la enfermedad renal diabética. En la nefropatía diabética, el estrés oxidativo inducido por la hiperglucemia conduce a alteraciones en la metilación del ADN, modificaciones de histonas y expresión de microARN, afectando la transcripción de genes antioxidantes clave (Kato & Natarajan, 2019). Por ejemplo, se ha observado una hipermetilación del promotor de SIRT1, lo que resulta en una disminución de la expresión de esta proteína reguladora del estrés oxidativo (Peng *et al.*, 2016). Se han observado modificaciones de histonas, como la disminución de la metilación de H3K4 y el aumento de la metilación de H3K27, en los promotores de genes antioxidantes, lo que lleva a su supresión (Gray & De Meyts, 2005). Además, la desregulación de microARN, incluyendo miR-25 y miR-146a, afecta la expresión de NADPH oxidasas y enzimas antioxidantes, contribuyendo aún más al estrés oxidativo (Kato *et al.*, 2016).

## **Regulación transcripcional en los sistemas antioxidantes**

La regulación transcripcional de los sistemas antioxidantes es un proceso complejo y multifacético que involucra varios factores de transcripción clave, incluyendo FOXO, PGC-1 $\alpha$ , NF- $\kappa$ B y NRF2. Estos reguladores juegan un papel crucial en la modulación de la expresión génica de enzimas antioxidantes y proteínas relacionadas, permitiendo a las células adaptarse a diversas condiciones de estrés oxidativo (Bhargava & Schnellmann, 2017).

NRF2: El principal regulador de la respuesta antioxidante, NRF2 se une a los Elementos de Respuesta Antioxidante (ARE) en las regiones promotoras de los genes objetivo (Tonelli *et al.*, 2018).

FOXO: los factores de transcripción FOXO, particularmente FOXO3a, regulan la expresión de catalasa y MnSOD (Kaushal *et al.*, 2019).

PGC-1 $\alpha$ : este coactivador transcripcional mejora la expresión de enzimas antioxidantes y la biogénesis mitocondrial (Aquilano *et al.*, 2013).

NF- $\kappa$ B: aunque se conoce principalmente por su papel proinflamatorio, NF- $\kappa$ B también puede regular la expresión de genes antioxidantes bajo ciertas condiciones (Morgan & Liu, 2011).

### **Vía de señalización NRF2**

La vía de señalización del factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2 (NRF2)/proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch (KEAP1)/elemento de respuesta antioxidante (ARE), es un mecanismo de defensa celular crítico contra el estrés oxidativo y las toxinas ambientales (Tonelli *et al.*, 2018). La vía NRF2/KEAP1/ARE es principalmente responsable de la activación transcripcional de genes citoprotectores en respuesta al estrés oxidativo y electrofílico. En condiciones basales, NRF2 es secuestrado en el citoplasma por su proteína represora, KEAP1, que dirige a NRF2 hacia la ubiquitinación y posterior degradación proteasomal ((Tonelli *et al.*, 2018). KEAP1 actúa como un adaptador de sustrato para el complejo E3 ubiquitina ligasa basado en Culina 3, facilitando la rápida renovación de NRF2 con una vida media corta (Niture *et al.*, 2010; Tonelli *et al.*, 2018).).

Cuando las células están expuestas a estrés oxidativo o compuestos electrofílicos, los residuos de cisteína en KEAP1 se modifican, lo que conduce a un cambio conformacional que interrumpe su interacción con NRF2 (Dinkova-

Kostova *et al.*, 2002). Esto permite que el NRF2 recién sintetizado se acumule y se transloque al núcleo. En el núcleo, NRF2 forma un heterodímero con pequeñas proteínas Maf y se une al elemento de respuesta antioxidante (ARE) en las regiones promotoras de sus genes diana (Niture *et al.*, 2010).

## **Estructura y dominios funcionales de NRF2**

NRF2 es un miembro de la familia Cap'n'Collar (CNC) de factores de transcripción con cremallera de leucina básica (bZIP). Su estructura consta de varios dominios funcionales importantes:

Dominio Neh1: localizado en la región C-terminal, este dominio contiene el motivo CNC-bZIP responsable de la unión al ADN y la dimerización con las pequeñas proteínas Maf. esta interacción es crucial para la capacidad de NRF2 de unirse a las secuencias ARE en los promotores de los genes diana (Itoh *et al.*, 1997).

Dominio Neh2: ubicado en la región N-terminal, este dominio es crítico para la regulación de la estabilidad de NRF2. Contiene dos motivos de unión:

Motivo DLG: un sitio de unión de baja afinidad para KEAP1

Motivo ETGE: un sitio de unión de alta afinidad para KEAP1

Estos motivos son esenciales para la ubiquitinación y degradación de NRF2 mediada por KEAP1 en condiciones basales (Hayes & McMahon *et al.*, 2009).

Dominios Neh3, Neh4 y Neh5: estos dominios están involucrados en la activación transcripcional de los genes diana. Interactúan con varios coactivadores, como CBP/p300, para potenciar la expresión génica mediada por NRF2 (Kato *et al.*, 2001).

Dominio Neh6: este dominio contiene residuos de serina que pueden ser fosforilados por la glucógeno sintasa cinasa-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), lo que conduce a la degradación de NRF2 mediada por  $\beta$ -TrCP. Esto representa un mecanismo de regulación de NRF2 independiente de KEAP1 (Rada *et al.*, 2011).

Dominio Neh7: este dominio media la interacción entre NRF2 y el receptor X retinoide  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ), que puede reprimir la actividad transcripcional de NRF2 (Wang *et al.*, 2013).

### **Estructura y dominios funcionales de KEAP1**

KEAP1 es un miembro de la familia de proteínas BTB-Kelch y sirve como el principal regulador negativo de NRF2. Su estructura consta de varios dominios clave:

Dominio BTB (Broad complex, Tramtrack y Bric-à-Brac): localizado en la región N-terminal, este dominio es responsable de la homodimerización de KEAP1 y la interacción con Culina 3, un componente del complejo E3 ubiquitina ligasa (Zipper & Mulcahy, 2002).

Dominio IVR (región Intermedia): este dominio rico en cisteína es crucial para detectar el estrés oxidativo y electrofílico. Contiene varios residuos de cisteína reactivos, incluyendo Cys273 y Cys288, que son importantes para la función sensora de estrés de KEAP1 (Dinkova-Kostova *et al.*, 2002).

Dominio Kelch (DGR - repetición de doble glicina): localizado en la región C-terminal, este dominio forma una estructura de  $\beta$ -hélice responsable de la unión al dominio Neh2 de NRF2. Interactúa tanto con los motivos DLG como ETGE de NRF2 (Tong *et al.*, 2006).

CTR (Región C-terminal): esta pequeña región sigue al dominio Kelch y está involucrada en el plegamiento adecuado del dominio Kelch (Canning *et al.*, 2015).

La interacción entre NRF2 y KEAP1 se basa en un modelo de "bisagra y pestillo", en condiciones basales, un homodímero de KEAP1 se une a una sola molécula de NRF2. Una subunidad de KEAP1 se une al motivo ETGE de alta afinidad (la "bisagra"), mientras que la otra se une al motivo DLG de baja afinidad (el "pestillo") en el dominio Neh2 de NRF2. Esta configuración posiciona a NRF2 en la orientación óptima para la ubiquitinación por el complejo E3 ligasa basado en Culina 3, lo que conduce a su rápida degradación proteasomal (Tong *et al.*, 2006). Bajo estrés oxidativo, los residuos de cisteína reactivos en el dominio IVR de KEAP1 se modifican, causando un cambio conformacional. Este cambio interrumpe la interacción entre KEAP1 y el motivo DLG de NRF2 (el "pestillo" se abre), mientras mantiene la interacción con el motivo ETGE. Esta liberación parcial previene la ubiquitinación eficiente de NRF2, permitiendo que el NRF2 recién sintetizado se acumule y se transloque al núcleo (Baird & Yamamoto, 2020).

Las características estructurales de NRF2 y KEAP1 permiten así una respuesta sensible y dinámica al estrés celular. Los múltiples dominios de NRF2 le permiten integrar varias señales celulares e interactuar con diferentes socios para modular su actividad. Mientras tanto, la estructura de KEAP1, particularmente su dominio IVR rico en cisteína, lo convierte en un excelente sensor del estrés oxidativo y electrofílico, permitiendo una rápida des-represión de NRF2 cuando es necesario (Baird & Yamamoto, 2020).

El ARE es una secuencia potenciadora cis-activa que se encuentra en la región promotora de muchos genes citoprotectores. La unión de NRF2 al ARE conduce a la activación transcripcional de una batería de genes involucrados en la defensa antioxidante, la desintoxicación y la respuesta al estrés celular. Estos genes incluyen glutatión S-transferasas, NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1, hemo oxigenasa-1 y glutamato-cisteína ligasa, entre otros (Hayes & Dinkova-Kostova, 2014).

La regulación de la vía NRF2/KEAP1/ARE es compleja y multifacética, involucrando mecanismos tanto transcripcionales como post-traduccionales. A nivel transcripcional, el gen NRF2 (NFE2L2) contiene AREs en su región promotora, permitiendo la autorregulación de su expresión (Kwak *et al.*, 2002). Además, otros factores de transcripción como NF- $\kappa$ B, AP-1 y AhR han demostrado modular la expresión de NRF2 (Rushworth *et al.*, 2011).

La regulación post-traducciona l de NRF2 está mediada principalmente por mecanismos dependientes e independientes de KEAP1. El mecanismo dependiente de KEAP1 implica la modificación de residuos de cisteína en KEAP1 por estrés oxidativo y electrofílico, lo que conduce a la estabilización de NRF2 (Suzuki *et al.*, 2023). KEAP1 contiene varios residuos de cisteína reactivos, siendo Cys151, Cys273 y Cys288 los más críticos para la regulación de NRF2. Diferentes factores estresantes y electrofílos pueden modificar residuos de cisteína específicos, lo que conduce a respuestas celulares distintas (Saito *et al.*, 2016).

La regulación independiente de KEAP1 de NRF2 involucra varias proteínas cinasas que fosforilan NRF2, afectando su estabilidad y translocación nuclear. Estas cinasas incluyen la proteína cinasa C (PKC), la fosfatidilinositol 3-cinasa

(PI3K) y las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), adicionalmente la fosforilación de NRF2 en residuos específicos puede mejorar su estabilidad, translocación nuclear y actividad transcripcional (Sun *et al.*, 2009; Ichimura *et al.*, 2013).

### **Mecanismos no canónicos**

Mientras que la vía canónica NRF2/KEAP1/ARE está bien establecida, investigaciones recientes han descubierto mecanismos no canónicos de activación de NRF2. Una de las vías no canónicas más prominentes involucra a la proteína adaptadora de autofagia p62/SQSTM1. p62 es una proteína multifuncional que desempeña un papel crucial en varios procesos celulares, incluyendo la autofagia, la agregación de proteínas y la respuesta al estrés (Moscat & Diaz-Meco, 2009; Komatsu *et al.*, 2010).

La activación de NRF2 mediada por p62 ocurre a través de un mecanismo de unión competitiva. p62 contiene una región de interacción con KEAP1 (KIR) que imita el motivo ETGE encontrado en NRF2 (Komatsu *et al.*, 2010). En condiciones de deterioro de la autofagia o estrés celular, p62 se acumula y compite con NRF2 por la unión a KEAP1. Esta competencia resulta en la estabilización y activación de NRF2, lo que conduce a la inducción de genes dependientes de ARE.

La vía NRF2-ARE también regula la expresión de p62, creando un ciclo de retroalimentación positiva. La activación de NRF2 conduce a un aumento en la expresión de p62, que a su vez promueve una mayor activación de NRF2 (Jain *et al.*, 2010). Este mecanismo de retroalimentación permite una activación sostenida de NRF2 en respuesta al estrés celular prolongado, la activación no canónica de NRF2 mediada por p62 tiene importantes implicaciones en varios procesos

celulares y estados de enfermedad. Por ejemplo, se ha demostrado que esta vía juega un papel en el desarrollo y progresión del cáncer, así como en trastornos neurodegenerativos caracterizados por la agregación de proteínas (Lau *et al.*, 2010; Taguchi *et al.*, 2012).

### **Implicaciones en la enfermedad renal diabética**

La enfermedad renal diabética (ERD) es una complicación importante de la diabetes mellitus y una causa principal de enfermedad renal en etapa terminal en todo el mundo. El estrés oxidativo juega un papel crucial en la patogénesis de la ERD, lo que hace de la vía NRF2/KEAP1/ARE un objetivo terapéutico atractivo (Tanase *et al.*, 2022).

Varios estudios han demostrado el papel protector de la activación de NRF2 en modelos experimentales de ERD. Por ejemplo, se ha demostrado que la activación de NRF2 por inductores farmacológicos o manipulación genética atenúa el daño oxidativo renal, la inflamación y la fibrosis en modelos animales diabéticos (Zheng *et al.*, 2011; Cui *et al.*, 2012). Por el contrario, la deficiencia de NRF2 exacerba la lesión renal diabética, destacando la importancia de esta vía en la protección renal (Liu *et al.*, 2022)

Los efectos protectores de la activación de NRF2 en la ERD están mediados a través de múltiples mecanismos. Primero, NRF2 regula al alza la expresión de enzimas antioxidantes, como la hemo oxigenasa-1 y la glutatión peroxidasa, que ayudan a neutralizar las ERO y reducir el daño oxidativo (Tan & de Haan, 2014). Segundo, la activación de NRF2 suprime las vías de señalización pro-inflamatorias, incluyendo NF- $\kappa$ B, reduciendo así la inflamación renal (Liu *et al.*, 2009). Tercero, se ha demostrado que NRF2 inhibe la expresión de factores pro-

fibróticos, como TGF- $\beta$ 1 y proteínas de la matriz extracelular, atenuando así la fibrosis renal (Gao *et al.*, 2021; Rezaee *et al.*, 2024).

La activación no canónica de NRF2 mediada por p62 también puede jugar un papel en la ERD. Los estudios han demostrado que los niveles de p62 se alteran en los riñones diabéticos y la modulación de la expresión de p62 puede afectar la progresión de la ERD, sin embargo, el papel exacto del eje p62-NRF2 en la ERD aún no se ha dilucidado completamente y merece una investigación adicional (Kitada *et al.*, 2020).

### **Implicaciones en la ferroptosis**

La ferroptosis es una forma de muerte celular regulada caracterizada por la peroxidación lipídica dependiente de hierro. Este proceso ha sido implicado en diversas condiciones patológicas, incluyendo la lesión renal aguda, los trastornos neurodegenerativos y el cáncer (Dixon *et al.*, 2012). La vía NRF2/KEAP1/ARE ha surgido como un regulador crítico de la ferroptosis, con importantes implicaciones tanto para la patogénesis de la enfermedad como para potenciales intervenciones terapéuticas (Wang *et al.*, 2023).

### **Alteraciones en el metabolismo de hierro en la diabetes**

En los últimos años, el concepto de "ferroptosis" ha surgido como una nueva forma de muerte celular regulada dependiente de hierro, caracterizada por la acumulación de peróxidos lipídicos y especies reactivas de oxígeno, con características bioquímicas y morfológicas únicas que la distinguen de la apoptosis, la necrosis y la autofagia (Dixon *et al.*, 2012; Stockwell *et al.*, 2017). La ferroptosis se ha relacionado con varias afecciones patológicas, incluidas

enfermedades neurodegenerativas, cáncer y lesiones por isquemia-reperfusión. El hierro (Fe) es un metal de transición y un mineral traza que en nuestro organismo desempeña funciones extremadamente importantes en la fisiología de prácticamente todos los organismos del planeta, incluidos los mamíferos como los humanos (Pantopoulos *et al.*, 2012). Participa en una miríada de procesos biológicos como el transporte del oxígeno, el metabolismo energético, el transporte de electrones, la síntesis de nucleótidos y los sistemas de defensa antioxidante, entre otros. Bajo condiciones fisiológicas, el Fe se encuentra en diferentes estados de oxidación, principalmente como hierro ferroso y hierro férrico ( $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ , respectivamente), que oscilan mediante la ganancia y pérdida de electrones (Frey & Reed, 2012). Esta propiedad permite que el hierro participe en reacciones de oxidación-reducción, actuando como transportador de electrones en diversos procesos biológicos (Pantopoulos *et al.*, 2012). El metabolismo del hierro es un proceso complejo y rigurosamente regulado que asegura un suministro adecuado de hierro al tiempo que previene la sobrecarga o deficiencia del mismo. Involucra múltiples etapas que incluyen la absorción de hierro de la dieta, su reciclaje, transporte por el cuerpo, utilización celular y almacenamiento para necesidades futuras (Katsarou & Pantopoulos, 2020; Vogt *et al.*, 2021). Las dietas altas en hierro pueden afectar negativamente la señalización de insulina al alterar la relación fosfo-Akt/Akt, ocasionando resistencia a la insulina y un incremento del tejido graso visceral e hipertrigliceridemia (Dongiovanni *et al.*, 2015). En modelos murinos, la sobrecarga de hierro induce un aumento del 40% en la glucosa en ayunas y regula al alza genes sensibles al hierro y adipocinas, mientras que regula a la baja la lipoproteína lipasalta y un aumento de la expresión de SOCS3 en el tejido adiposo

viscera (Dongiovanni et al., 2015). En pacientes con diabetes tipo 2 con frecuencia exhiben niveles elevados de ferritina sérica y aumento de las reservas de hierro tisular, una condición denominada "síndrome de sobrecarga de hierro dismetabólico" (DIOS, por sus siglas en inglés) (Fernández-Real et al., 2002; Simcox & McClain, 2013; Harrison, Lorenzo & McClain, 2023). Este exceso de hierro puede contribuir al estrés oxidativo y la inflamación, exacerbando las complicaciones diabéticas, incluyendo la enfermedad renal diabética (Wang *et al.*, 2024). Varios mecanismos pueden contribuir a la alteración de la homeostasis del hierro en la diabetes:

1. Aumento de la absorción intestinal de hierro debido a la regulación al alza de los transportadores de hierro duodenales (Fernández-Real *et al.*, 2002).
2. Regulación alterada de la hepcidina, potencialmente debido a la resistencia a la insulina (Wang *et al.*, 2014).
3. Glicación de la transferrina, que puede alterar su capacidad de unión al hierro (Silva *et al.*, 2014).

Si bien la patogénesis de la ERD es compleja y multifactorial evidencia reciente ha relacionado a la ferroptosis como un posible actor en la patogénesis de la ERD (Wu & Chen, 2022). A pesar de los avances en el tratamiento de la diabetes, la ERD sigue siendo un desafío clínico significativo y existe una necesidad urgente de identificar nuevos mecanismos patológicos y desarrollar estrategias terapéuticas novedosas para su tratamiento.

En un estudio de Ma *et al.*, (2022), se analizaron las bases de datos procedentes del Gene Expression Omnibus (GEO) del NCBI (National Center for Biotechnology

Information) GSE96804 (Perfil de expresión génica a nivel de exones en la nefropatía diabética), GSE104948 (Transcriptoma glomerular de sujetos del Banco Europeo de ADN renal y donantes vivos), GSE47183 (Nano disección in silico: definición de la especificidad del tipo celular a nivel transcripcional en enfermedades humanas (glomérulos)), GSE30122 (Análisis del transcriptoma de la enfermedad renal diabética humana). En este estudio, se analizaron los perfiles de expresión génica y se identificaron 12 genes relacionados con la ferroptosis diferencialmente expresados entre los casos de enfermedad renal diabética/nefropatía diabética e individuos control. Posteriormente, utilizando los algoritmos Random Forest y Support Vector Machine, se seleccionaron 7 genes, con alto potencial en los análisis para distinguirse entre muestras de pacientes diabéticos y controles. Las proteínas de estos genes son:

DUSP1 (Fosfatasa de Especificidad Dual 1): Involucrado en la regulación de la señalización MAPK, crucial en la respuesta al estrés celular y la inflamación.

PRDX6 (Peroxirredoxina 6): Una enzima antioxidante clave en la protección contra el estrés oxidativo, un factor importante en la patogénesis de la nefropatía diabética.

PEBP1 (Proteína de Unión a Fosfatidiletanolamina 1): Implicado en la regulación de la ferroptosis, lo que sugiere un papel directo en la modulación de este proceso de muerte celular en el contexto de la enfermedad renal diabética.

ZFP36 (Proteína con Dedos de Zinc ZFP36): Regula la estabilidad del ARNm, potencialmente afectando la expresión de genes críticos en la progresión de la enfermedad.

TSC22D3 (miembro 3 de la familia de dominios TSC22): Involucrado en la respuesta antiinflamatoria, sugiriendo un papel en la modulación de la inflamación asociada a la nefropatía diabética.

GABARAPL1 (proteína tipo 1 asociada al receptor GABA tipo A): Implicado en la autofagia, un proceso celular que puede influir en la progresión de la enfermedad renal diabética. RGS4 (Regulador de la Señalización de Proteínas G 4): Involucrado en la señalización de receptores acoplados a proteínas G, potencialmente afectando diversas vías de señalización celular relevantes para la patología renal.

Además, se realizó un análisis de agrupamiento de clústeres basado en la expresión de estos 7 genes potenciales, identificando dos patrones distintos de modificación de la ferroptosis en la ERD. El patrón A se caracterizó por un enriquecimiento en vías inmunes e inflamatorias, mientras que el patrón B mostró un enriquecimiento en vías relacionadas con autofagia y peroxisomas. Estos hallazgos informáticos no solo mejoran nuestra comprensión de la patogénesis de la enfermedad, sino que también identifican potenciales biomarcadores para el diagnóstico temprano y nuevos objetivos terapéuticos.

Adicionalmente, evidencia experimental ha demostrado que los niveles de ferroptosis están significativamente elevados en el tejido renal de pacientes con ERD en comparación con los controles sanos. En un estudio realizado por Kim et al. (2021), se evaluaron marcadores implicados en la ferroptosis en la ERD utilizando muestras de biopsias renales de pacientes diabéticos y no diabéticos, así como en modelos in vitro e in vivo. En las biopsias renales humanas, se observó una disminución significativa en la expresión del ARNm de SLC7A11 Y

GPX4, proteínas clave relacionados con la ferroptosis, en los túbulos renales de pacientes diabéticos en comparación con sujetos no diabéticos. En experimentos in vitro con células tubulares renales NRK-52E estimuladas con TGF- $\beta$ 1, se detectó una reducción en la expresión SLC7A11 y GPX4 a nivel de ARNm y proteína, junto con una disminución en los niveles de glutatión y un aumento en la peroxidación de lípidos. Además, en un modelo murino diabético inducidos con estreptozotocina, se observaron cambios similares en la expresión de SLC7A11 y GPX4, una disminución de niveles de glutatión y un aumento de la peroxidación lipídica en el tejido renal. El tratamiento con ferrostatina-1, un inhibidor específico de la ferroptosis, atenuó significativamente estos cambios relacionados con la ferroptosis y redujo la muerte celular, tanto en las células tubulares estimuladas con TGF- $\beta$ 1 como en los riñones de los ratones diabéticos. Estos hallazgos proporcionan evidencia directa y multifacética de la implicación de la ferroptosis en la ERD e identifican los mecanismos moleculares específicos por los cuales la ferroptosis contribuye al daño renal en la diabetes, ofreciendo nuevos objetivos para la intervención terapéutica. Además, la eficacia del tratamiento con ferrostatina-1 sugiere que la inhibición de la ferroptosis podría ser una estrategia viable para mitigar el daño renal en pacientes con ERD.

En un estudio de Li (2021), se encontró evidencia de ferroptosis en modelos de nefropatía diabética in vitro e in vivo. En muestras de riñón de ratones DBA/2J con diabetes inducida con estreptozotocina, se observó una disminución significativa de la expresión de genes como la GPX4 y SLC7A11, junto con una reducción en los niveles de glutatión y un aumento en productos de la peroxidación lipídica malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (4-HNE), mientras que la administración con ferrostatina-1 revirtieron dichos cambios. De manera similar,

en células tubulares renales humanas HK-2 cultivadas con altas concentraciones de glucosa, se detectó una disminución en la expresión de GPX4, SLC7A11 y FTH-1, un aumento en la expresión de TFR-1, y cambios morfológicos mitocondriales que se mejoraron con el tratamiento con ferrostatina-1. Adicionalmente, se encontró una disminución en la expresión de Nrf2 en los modelos de nefropatía diabética, y el silenciamiento específico de Nrf2 aumentó la sensibilidad de las células a la ferroptosis en condiciones de alta glucosa. La regulación positiva de Nrf2 mediante el tratamiento con fenofibrato mejoró la ferroptosis en las células con Nrf2 silenciado y en ratones diabéticos. Estos hallazgos sugieren que la hiperglucemia puede contribuir directamente a la ferroptosis en las células renales y que la inhibición de la ferroptosis puede proteger contra el daño renal inducido por hiperglucemia. Además, la regulación de la vía Nrf2 podría ser una estrategia terapéutica prometedora para inhibir la ferroptosis.

Estas observaciones concuerdan con las de Wu, (2021). En este estudio se observó que los pacientes con nefropatía diabética presentaban niveles elevados de ferritina, LDH, ERO y MDA en suero, así como una expresión alterada de los marcadores relacionados con la ferroptosis, como ACSL4, PTGS2, NOX1 y GPX4, detectados mediante ELISA y RT-PCR. Además, en células mesangiales cultivadas con altas concentraciones de glucosa, se observó un aumento de la liberación de LDH, producción de ERO y expresión de ACSL4, PTGS2 y NOX1, junto con una disminución de GPX4, lo cual fue revertido por el tratamiento con deferiprona, un quelante de hierro. Además, se encontró una disminución de NRF2 y un incremento en la translocación de HMGB1(High Mobility Group Box 1), una proteína nuclear que actúa como una alarmina cuando se libera al espacio

extracelular en respuesta al estrés celular, en los pacientes con ERD. Estas observaciones se ven reforzadas por experimentos de silenciamiento génico mediante ARNpi de HMGB1 este silenciamiento restauró la proliferación celular, previno la generación de ERO y LDH, disminuyó los niveles de ACSL4, PTGS2 y NOX1, y aumentó los niveles de GPX4 en las células mesangiales expuestas a altas concentraciones de glucosa.

Adicionalmente, la utilización de quelantes como la deferiprona ha resultado útil para aminorar las alteraciones mitocondriales asociadas con la ERD. La deferiprona, también conocida como L1 o CP20, fue desarrollada en la década de 1980 como una alternativa oral a la desferrioxamina, el quelante de hierro estándar en ese momento (Kontoghiorghes *et al.*, 1987). Fue aprobada por primera vez en Europa en 1999 para el tratamiento de la sobrecarga de hierro en pacientes con talasemia mayor cuando la desferrioxamina estaba contraindicada o era inadecuada (European Medicines Agency, 2009). Desde entonces, su uso se ha extendido a otras condiciones que implican sobrecarga de hierro, como la anemia falciforme y los síndromes mielodisplásicos (Cappellini & Pattoneri, 2009). La deferiprona (1,2-dimetil-3-hidroxipiridin-4-ona) es un compuesto heterocíclico con fórmula molecular  $C_7H_9NO_2$  y peso molecular de 139,15 g/mol (Hider & Zhou, 2005). Su estructura consiste en un anillo de hidroxipiridinona con grupos metilo en las posiciones 1 y 2. La síntesis de la deferiprona implica varios pasos, comenzando con la 3-hidroxi-2-metilpiridina. Este compuesto se somete a N-metilación, seguida de oxidación para formar la 3-hidroxi-1,2-dimetilpiridin-4-ona. El proceso de síntesis se ha optimizado para mejorar el rendimiento y la pureza del producto final (Kontoghiorghes, 1995). El mecanismo de acción principal de la deferiprona es la quelación del hierro. Forma complejos estables con iones férricos ( $Fe^{3+}$ ) en una proporción de 3:1 (fármaco:hierro) (Hoffbrand *et al.*, 2003). Esta capacidad de unión al hierro permite a la deferiprona eliminar el exceso de

hierro de varios tejidos y órganos, incluyendo el hígado, el corazón y las glándulas endocrinas. Una característica importante de la deferiprona es su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica y entrar en las células, lo que le permite quelar el hierro intracelular (Neufeld, 2006). Además de su acción quelante, la deferiprona ha mostrado propiedades antioxidantes, lo que puede contribuir a reducir el estrés oxidativo y el daño celular asociado con la sobrecarga de hierro (Sohn *et al.*, 2008). La deferiprona se administra por vía oral y se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal. Las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan entre 45 y 60 minutos después de la administración (Kontoghiorghes *et al.*, 2013). El fármaco se distribuye ampliamente por todo el cuerpo, incluyendo el sistema nervioso central. La deferiprona se metaboliza principalmente por glucuronidación en el hígado, formando el metabolito 3-O-glucurónido, que es inactivo como quelante de hierro (Waldmeier *et al.*, 1993). La vida media de eliminación es relativamente corta, de aproximadamente 2-3 horas, lo que requiere una dosificación de tres veces al día para mantener niveles terapéuticos efectivos. La excreción se produce principalmente por vía renal, con una pequeña proporción eliminada en las heces (Hoffbrand *et al.*, 2003). En estudios realizados en ratas diabéticas, la administración de deferiprona ha demostrado reducir significativamente los niveles de albuminuria, un marcador clave del daño renal. Zout el *at.*, 2017, mostró que la deferiprona disminuyó la proteinuria en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina, sugiriendo un efecto renoprotector. Además, se observó una reducción en los marcadores inflamatorios y una mejora en la histología renal, lo que indica que la deferiprona puede mitigar el daño estructural en los riñones. Adicionalmente, un estudio de Rajapurkar *et al.*, 2013 investigó el uso de la deferiprona como tratamiento para la ERD y glomerulonefritis, destacando su potencial para reducir la proteinuria y mejorar los parámetros renales. En dos estudios prospectivos abiertos, se encontró que la deferiprona era efectiva para disminuir la proteinuria en pacientes con glomerulonefritis y mejorar la relación albumina/creatinina en aquellos con

nefropatía diabética. A pesar de algunos efectos secundarios menores, no se reportaron eventos adversos significativos, lo que sugiere que este fármaco podría ser una opción terapéutica valiosa en el manejo de estas condiciones renales.

### **Perturbaciones del metabolismo de hierro en la diabetes**

Esta sección se aborda en un artículo de revisión titulado “EL PAPEL DE LA FERROPTOSIS EN LA ENFERMEDAD RENAL DIABÉTICA” enviado y aceptado con revisiones menores en *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* (ISSN: 2395-8723).

**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**ASUNTO: ENVÍO DE CARTA  
CESIÓN DE DERECHOS A TIP REVISTA ESPECIALIZADA EN CIENCIAS QUÍMICO-  
BIOLÓGICAS**

**DRA. MARTHA ASUNCIÓN SÁNCHEZ RODRÍGUEZ  
EDITORA  
TIP REVISTA ESPECIALIZADA EN CIENCIAS  
QUÍMICO-BIOLÓGICAS**

**P r e s e n t e**

Por este medio, manifestamos nuestra aceptación para transferir los derechos de autor a **TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas**, correspondientes al artículo titulado: “Papel de la Ferroptosis en la Enfermedad Renal Diabética” (“Role of Ferroptosis in Diabetic Kidney Disease”). Autorizamos a la revista para que lo publique en formatos físicos y/o electrónicos, así como en acceso abierto (Open Journal System). Asimismo, declaramos que este artículo no ha sido publicado ni sometido para su publicación, total o parcial, en ningún otro medio.

Título corto del artículo: **Ferroptosis en la Enfermedad Renal Diabética.**

El responsable de la correspondencia es:

Nombre: Donovan Javier Peña Montes

Institución y Dirección institucional: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Av.

Francisco J. Múgica S/N Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán, México

Tel. 44-311576-67

Email: 0618853j@umich.mx

Sin otro particular, agradezco la atención prestada.

**A t e n t a m e n t e**

Morelia, Michoacán, 09 de agosto del 2024.



xUNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA



*Tip* Revista Especializada en  
Ciencias Químico-Biológicas

DICTAMEN DE ARTÍCULOS

No. de folio **01-2024**

Título del artículo: El papel de la ferroptosis en la enfermedad renal diabética

El artículo como está:

Es aceptable

Es aceptable después de una revisión menor \*

Es aceptable después de una revisión mayor \*\*

No es aceptable

<input type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>

\* Se considera revisión menor cuando requiere de correcciones de redacción, agregar información como: gráficas o cuadros complementarios, inclusión de subtítulos, modificaciones en líneas o párrafos que no involucren la estructura general del artículo.

\*\* Se considera revisión mayor cuando tengan que realizar correcciones en la estructura del artículo.

**Parte IV. Comentarios y sugerencias**

(Anexar hojas adicionales en caso necesario).

- Es un buen trabajo de revisión, con una lectura rápida y amigable, sólo unos pequeños detalles que resolver.
- La bibliografía abarca hasta el presente año por lo que es información actual.
- Hay que revisar algunas situaciones de formato, pero eso depende más de las normas de la revista.

NOTA: ESTA INFORMACIÓN ES NECESARIA PARA GUARDARLA EN EL ARCHIVO DE LA REVISTA, SE RECORTARÁ DE LA VERSIÓN QUE SE ENTREGA AL AUTOR.

FECHA 03 de octubre 2024

UNAM, FES Zaragoza, Depto. de Publicaciones. Av. Guelatao No. 66, Col. Ejército de Oriente, 09230, Alcaldía Iztapalapa, Ciudad de México, México, Tel. 55-56.23.05.27, e-mail: [revistatip@yahoo.com](mailto:revistatip@yahoo.com)

## 5. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad renal diabética (ERD) es la principal complicación microvascular que afecta a los pacientes con DM y la principal causa de enfermedad renal crónica y terminal en el mundo. La disfuncionalidad mitocondrial y el estrés oxidativo tienen un papel sumamente importante en el desarrollo y la progresión de la ERD, por lo tanto, la corrección y/o prevención de la disfunción mitocondrial puede ser fundamental en la prevención y tratamiento de la ERD. Otro actor relevante en la progresión de la ERD es la alteración en el metabolismo del hierro, dando a lugar a una sobrecarga de hierro en el organismo y en los riñones, generando un ambiente pro-ferroptótico. Diferentes terapias han sido empleadas para controlar la sobrecarga de hierro en diferentes condiciones como la restricción de hierro en la dieta, las flebotomías o los quelantes de hierro. La quelación de hierro proporciona un enfoque viable para tratar la sobrecarga de hierro en la diabetes. Se ha propuesto que la disminución de hierro promueve una mejoría de la ERD, sin embargo, poco se conoce sobre el impacto de la quelación de hierro en la función mitocondrial a nivel renal en el medio diabético, así como de la utilización del quelante deferiprona en la DM2 y los mecanismos involucrados en la regulación del estrés oxidativo a través de la vía NRF2/KEAP1 y su posible beneficio.

## **6. HIPÓTESIS**

La disminución de los niveles de hierro mediante quelación activa la vía de señalización de Nrf2, potencia la defensa antioxidante y restaura la función mitocondrial en los riñones de ratas con diabetes tipo 2.

## **7. OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Estudiar el efecto de la quelación de hierro sobre la respuesta antioxidante mediada por Nrf2 y la funcionalidad mitocondrial en el tejido renal de un modelo murino de diabetes tipo 2.

### **Objetivos particulares**

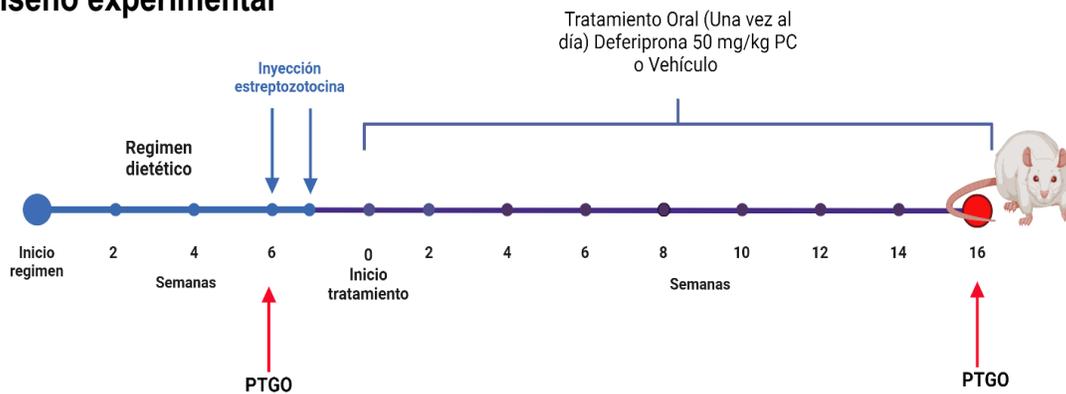
1. Evaluar el efecto de la quelación de hierro en la funcionalidad mitocondrial del tejido renal en un modelo murino de diabetes tipo 2.
2. Determinar el impacto de la quelación de hierro sobre el estrés oxidativo mitocondrial en el tejido renal de ratas con diabetes tipo 2.
3. Analizar la influencia de la quelación de hierro en la activación de la vía Nrf2/Keap1 y la expresión de sistemas antioxidantes mitocondriales en el tejido renal de un modelo murino de diabetes tipo 2.

## 8. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se emplearon ratas albinas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar del sexo macho con una edad de 12 semanas y un peso corporal aproximado de 370-400 g, que se aleatorizaron y agruparon en grupos diferentes, en 3 cohortes distintas, con una población total de 72 individuos experimentales como se muestra en la figura 5. Las ratas pertenecientes a los grupos diabéticos fueron sometidas a un régimen dietético durante 6 semanas con una dieta alta en grasa basada en manteca de cerdo *ad libitum* [calorías proporcionadas por 1 g de pienso: 47% de grasa total (27,2% de grasa saturada, 35,3% de grasa monoinsaturada y 35,7% de grasa poliinsaturada, 1,8% de colesterol), 32% de carbohidratos y 21% de proteína]. Las ratas pertenecientes a los grupos normoglucémicos fueron alimentadas con una dieta estándar *ad libitum* [calorías proporcionadas por 1 g de pienso: 8,6% de grasa total (15% de grasa saturada, 35% de grasa monoinsaturada y 50% de grasa poliinsaturada), 62,2% de carbohidratos y 29,2% de proteínas] (Nutricubos®, Agribands Purina, MX). Posteriormente, se evaluó la respuesta glucémica en ayunas a través de una prueba de tolerancia a la glucosa oral (2 g/kg de peso corporal). Únicamente los individuos con una glucemia  $\geq 140$  mg/dL 2 horas después de la prueba fueron considerados como intolerantes a la glucosa e inyectados con 2 dosis intraperitoneales, con un intervalo de una semana, del fármaco diabético estreptozotocina (STZ), a una dosis de 25 mg/kg de peso corporal. Cinco días posteriores a la inyección de la STZ se midieron los niveles de glucemia y únicamente los individuos con una glucemia  $\geq 200$  mg/dL fueron considerados diabéticos e incluidos en los grupos diabéticos. Tras la confirmación del estado diabético, se procedió a una segunda fase de aleatorización exclusivamente con las ratas que desarrollaron diabetes exitosamente y las ratas se mantuvieron en recuperación por una semana más. Posteriormente, los tratamientos se iniciaron: los grupos control y diabético fueron administradas vía oral diariamente con el vehículo (glicerol 20%, bloqueadores del amargor: sucralosa 60 mg/dL, 100  $\mu$ L/dL de

saborizante cereza (Deiman, Mexico)) durante 16 semanas, el grupo diabético con el quelante y el grupo normoglucémico se administraron oralmente diario con el fármaco o deferiprona a la dosis de 50 mg/Kg de PC durante 16 semanas. Al finalizar todos los individuos se les aplicó una prueba de tolerancia a la glucosa oral, 48 horas posteriores fueron sacrificados por decapitación y se obtuvieron las muestras.

## Diseño experimental



Ratas Wistar macho  
3 meses de edad  
370-400 g de peso corporal  
n=6 por grupo

Lineamientos  
Norma Oficial Mexicana -NOM-062-  
ZOO-1999



Control + vehículo



Diabético + vehículo



Diabético + quelante  
(deferiprona 50  
mg/Kg de PC)



Normoglucémico +  
quelante (deferiprona 50

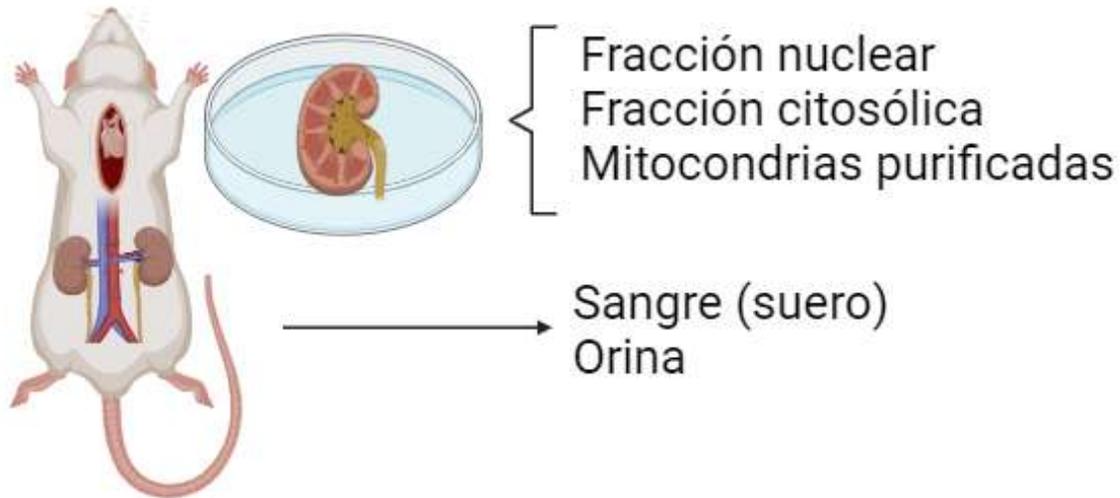


Figura 11. Diseño experimental.

## 9. METODOLOGÍA

### 9.1. Aislamiento y purificación de mitocondrias

Los animales experimentales fueron sacrificados por decapitación; los riñones se extrajeron inmediatamente y se colocaron en una placa de Petri que contenía búfer de aislamiento a 4°C (220 mM manitol, 70 mM sacarosa, 2 mM ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS), y 1 mM ácido etilenglicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), pH 7.4, y la corteza renal se diseccionó cuidadosamente de ambos riñones bajo un estereoscopio. El tejido se lavó con el mismo búfer para eliminar el exceso de sangre y se homogeneizó utilizando un homogeneizador de tejidos tipo Potter-Elvehjem a 500 rpm. Se separó una alícuota del homogeneizado para aislar las fracciones citosólica y nuclear. Las mitocondrias se aislaron por centrifugación diferencial según los métodos de Saavedra-Molina y Devlin (1997) y se purificaron utilizando un gradiente discontinuo de Percoll. Las mitocondrias se conservaron en el

búfer de aislamiento sin EGTA. La concentración de proteínas mitocondriales en las muestras se cuantificó utilizando el método de Biuret (Gornall *et al.*, 1949). Todos los reactivos y búferes se prepararon utilizando agua desionizada (diH<sub>2</sub>O) (resistividad  $\approx 18.2 \text{ M}\Omega\text{-cm}$ ). Las muestras mitocondriales recién aisladas se utilizaron inmediatamente, y una porción se alicuotó y almacenó a  $-70^\circ\text{C}$  para su uso posterior.

## 9.2. Potencial de membrana mitocondrial

La determinación del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) se realizó espectrofluorométricamente utilizando la sonda fluorescente safranina de acuerdo a Figueira *et al.* (2012). Primero, se preparó una suspensión con mitocondrias recién aisladas, y 1 mg de proteína mitocondrial se resuspendió en búfer (250 mM sacarosa, 10 mM HEPES, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 1.4 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4) y se mezcló con 7.5  $\mu\text{M}$  de safranina. Se registró la fluorescencia basal a longitudes de onda de excitación y emisión de 495 nm y 580 nm, respectivamente, a una temperatura regulada por termostato de  $25^\circ\text{C}$ . Posteriormente, se añadieron los sustratos respiratorios vinculados al NADH (glutamato más malato, 5 mM + 5 mM) y al FADH (succinato, 5 mM), y se registró la extinción de la fluorescencia hasta que se estableció una señal de estado estacionario. Luego, se añadió 1  $\mu\text{M}$  del protonóforo despolarizante carbonil cianuro m-clorofenil hidrazona (CCCP) para disipar el  $\Delta\Psi_m$ .

## 9.3. Respiración mitocondrial

La respiración mitocondrial se midió utilizando un electrodo tipo Clark conectado a un monitor de oxígeno YSI 5300A (Li y Graham, 2012). Las muestras mitocondriales recién aisladas se resuspendieron en un búfer de respiración que contenía 10 mM HEPES, 100 mM KCl, 1.4 mM MgCl<sub>2</sub> y 3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a pH 7.4 y se mantuvieron a  $25^\circ\text{C}$ . La respiración mitocondrial basal se midió en presencia de sustratos respiratorios ligados a NADH (glutamato más malato, 5 mM + 5 mM) o FADH<sub>2</sub> (succinato, 10 mM + 1  $\mu\text{M}$

rotenona), en ausencia de ADP. La respiración de estado 3, o respiración acoplada, se estimuló mediante la adición de 200  $\mu\text{M}$  de ADP (sal disódica de adenosina 5'-difosfato) para promover la síntesis de ATP, seguida de la inhibición de la ATP sintasa con 2  $\mu\text{g}$  de oligomicina para inducir la respiración de estado 4 Omy. La respiración no acoplada se midió en presencia de 1  $\mu\text{M}$  de CCCP para el transporte máximo de electrones a través de la cadena respiratoria. El consumo residual de oxígeno se midió añadiendo 2  $\mu\text{M}$  de antimicina A. El índice de control respiratorio (RCR) se calculó como la relación entre las tasas de respiración de estado 3 y estado 4 Omy.

#### **9.4. Determinación de la generación de especies reactivas de oxígeno**

La generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) se evaluó según Batandier *et al.* (2006), con algunas modificaciones, utilizando mitocondrias recién aisladas. La proteína mitocondrial (1.0 mg) se resuspendió en un búfer de respiración frío (10 mM HEPES, 100 mM KCl, 3 mM  $\text{MgCl}_2$  y 3 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) a pH 7.4 y se incubó durante 10 min con la sonda permeable 2',7'-diclorofluoresceína 3',6'-diacetato (12.5  $\mu\text{M}$ ) a 4°C y 80 rpm. Posteriormente, las muestras se equilibraron a una temperatura controlada por termostato de 25°C, y se inició el registro de fluorescencia a longitudes de onda de excitación y emisión de 485 nm y 520 nm, respectivamente. Para evaluar la generación de ERO, se utilizaron sustratos vinculados a NADH (glutamato más malato, 5 mM + 5 mM) y FADH<sub>2</sub> (succinato 10 mM).

#### **9.5. Evaluación de las actividades enzimáticas de la cadena respiratoria mitocondrial**

Las actividades enzimáticas de los complejos de la cadena de transporte de electrones se evaluaron siguiendo los protocolos descritos por Peña-Montes *et al.* (2020) y Spinazzi *et al.* (2012). La actividad se midió en mitocondrias permeabilizadas utilizando tres ciclos consecutivos de congelación-descongelación seguidos de choque osmótico.

La actividad del complejo I mitocondrial se determinó como la actividad NADH:decilubiquinona oxidorreductasa. Brevemente, 100 µg de proteína mitocondrial se mezclaron e incubaron durante 7 min en 50 mM de búfer de fosfatos de potasio (KPB) a pH 7.5 (KPB), 100 µg de albúmina sérica bovina, 2.5 µM de antimicina A y 500 µM de KCN. La actividad catalítica se inició añadiendo 100 µM de NADH en presencia de 100 µM de decilubiquinona, y la disminución de la fluorescencia de NADH se registró espectrofluorométricamente a longitudes de onda de excitación y emisión de 352 nm y 464 nm, respectivamente, utilizando un espectrofotómetro Shimadzu RF-5301PC. La actividad del complejo II mitocondrial se determinó como la actividad succinato:2,6-diclorofenol-indofenol (DCIP) oxidorreductasa. Brevemente, 100 µg de proteína mitocondrial se mezclaron e incubaron durante 5 min en 50 mM de KPB, 100 µg de albúmina sérica bovina, 20 mM de succinato, 10 µM de rotenona, 2.5 µM de antimicina A y 0.5 mM de KCN. La actividad se midió espectrofotométricamente en presencia de 80 µM de DCIP a 600 nm durante 5 min utilizando un espectrofotómetro Perkin–Elmer UV/Vis Lambda 18. El complejo III se ensayó como la actividad decilubiquinol:citocromo *c* oxidorreductasa. Brevemente, 100 µg de proteína mitocondrial se mezclaron e incubaron durante 3 min con 50 mM de KPB, 0.0125% de Tween-20, 10 µM de rotenona, 500 µM de 2-tenoil-trifluoro-acetona (TTFA), 500 µM de KCN, 150 µM de EDTA disódico y 100 µg de albúmina sérica bovina. La actividad se registró después de la adición de 250 µg de citocromo *c* oxidado, seguida de la adición de 100 µM de decilubiquinol (reducido con borohidruro de potasio) a 550 nm. La actividad del complejo IV se determinó como la actividad citocromo *c* oxidasa; 50 µg de proteína mitocondrial se mezclaron e incubaron durante 3 min en 50 mM de KPB suplementado con 10 µM de rotenona, 500 µM de (TTFA) y 2.5 µM de antimicina A. Posterior, se añadieron 200 µg de citocromo *c* reducido con ditionita de sodio, y se registraron los cambios en la absorbancia a 550 nm. Se realizaron ensayos independientes utilizando los inhibidores específicos para estimar la actividad enzimática de cada uno de los complejo de la

cadena respiratoria. Se utilizó rotenona (10  $\mu\text{M}$ ) para la inhibición del complejo I, 2-TTFA (500  $\mu\text{M}$ ) para la inhibición del complejo II, antimicina A (2.5  $\mu\text{M}$ ) para la inhibición del complejo III y KCN (500  $\mu\text{M}$ ) para la inhibición del complejo IV. Todos los ensayos se realizaron a 30°C.

## 9.6. Hinchamiento mitocondrial

El hinchamiento mitocondrial se evaluó mediante dispersión de luz a 540 nm, de acuerdo con el método de Aguilera-Aguirre *et al.*, con ligeras modificaciones. La proteína mitocondrial (1 mg/mL) se resuspendió en un búfer que contenía 250 mM de sacarosa, 10 mM de HEPES, 2 mM de  $\text{H}_2\text{PO}_4$ , 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM de glutamato y 5 mM de malato, a pH 7.4 y 37°C. Se monitorearon los cambios en la dispersión de luz y una vez que la densidad óptica alcanzó una línea base estable, se añadieron 25  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  para inducir la hinchazón mitocondrial a través de la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial. Se realizó un ensayo separado añadiendo 1  $\mu\text{M}$  de rojo de rutenio para inhibir la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial a través del uniportador de calcio mitocondrial.

## 9.7. Estado del glutatión mitocondrial y niveles de peroxidación lipídica

El estado del glutatión mitocondrial (glutatión total, glutatión oxidado (GSSG) y glutatión reducido (GSH)) se determinó espectrofotométricamente utilizando el método de reciclaje enzimático con glutatión reductasa, NADPH y el reactivo cromogénico 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) a 412 nm en un espectrofotómetro Perkin–Elmer UV/Vis Lambda 18, siguiendo el protocolo descrito por Peña-Montes (2020). Para liberar el glutatión de las muestras (2 mg de proteína mitocondrial en 100 mM de búfer de fosfatos, 5 mM de EDTA disódico, 0.1% de Triton-X y 27.5 mM de ácido 5-sulfosalicílico), se realizó una combinación de sonicación y ciclos de congelación/descongelación. Las muestras se centrifugaron luego a 5000 x g. Para la

medición del glutatión total, 100  $\mu$ L del sobrenadante resultante se mezclaron con 100 mM de búfer de fosfatos, 5 mM de EDTA disódico, 100 mU de glutatión reductasa y 100  $\mu$ M de DTNB. La reacción enzimática se inició añadiendo 50  $\mu$ M de NADPH, y la absorbancia se registró durante 5 min a 30°C. Se utilizó el reactivo derivatizante 4-vinilpiridina (0.2%) para determinar el glutatión oxidado. La concentración de GSH se calculó restando la cantidad de GSSG del glutatión total. A partir de estos datos, se calculó la relación GSH/GSSG como un índice del estado redox del glutatión. La peroxidación lipídica se evaluó utilizando el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Buege y Aust, 1978). Las muestras mitocondriales se filtraron del medio de almacenamiento y se resuspendieron en PBS (pH 7.4). La muestra (0.5 mg) se mezcló con 2.93 mM de ácido tiobarbitúrico, 92 mM de ácido tricloroacético, 2.5 M, y 0.01% de hidroxitolueno butilado, y se incubó en un baño de agua hirviendo durante 20 min. Las muestras se centrifugaron a 7500 rpm durante 5 minutos a 25°C, y la absorbancia se midió a 532 nm.

### **9.8. Actividad enzimática de glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y superóxido dismutasa**

La actividad de la enzima glutatión peroxidasa se evaluó espectrofluorométricamente según el método descrito por Lawrence y Burk (1976) con algunas modificaciones. La enzima glutatión reductasa se evaluó espectrofluorométricamente según el método descrito por Carlberg y Mannervik (1985), con algunas modificaciones. La superóxido dismutasa (SOD) se determinó utilizando un kit de ensayo SOD-WST (19160) de Sigma-Aldrich (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### **9.9. Análisis de inmunodetección de las proteínas de interés por Western Blot**

Para el análisis de Western blot, se utilizaron anticuerpos monoclonales o policlonales, incluyendo anti-3-nitrotirosina (sc-32757), anti-Nrf2 (sc-365949), anti- $\beta$ -tubulina (sc-55529), anti-HDAC1 (sc-81598), anti-Tom20 (sc-17764), anti-GPX 1/2 (sc-133160), anti-Keap1 (sc-514914), anti-GPX4 (sc-166570), anti-SIRT3 (sc-365175), anti-SOD1 (sc-271014) y anti-SOD2 (sc-30080). Un total de 60  $\mu$ g de las diferentes fracciones celulares (citoplásmica, mitocondrial o nuclear) se resolvieron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) utilizando el método de transferencia húmeda. Las membranas se bloquearon con 5% de leche libre de grasa (Blotto, sc-2324) en búfer TBS-T (Tris-HCl, 150 mM NaCl y 0.05% Tween-20, pH 7.4) durante 2 h. Después del bloqueo, las membranas se lavaron tres veces con TBS-T y se incubaron. Después de otros tres lavados, las proteínas unidas a los anticuerpos se detectaron utilizando un Reactivo de Luminol para Western Blotting (sc-2048) después de la incubación con un anticuerpo secundario conjugado con HRP (sc-2354, sc-516102 o sc-2357) en un Sistema de Imagen ChemiDoc MP (Bio-Rad). Los Western blots se cuantificaron utilizando el software ImageJ.

### **9.10. Parámetros séricos**

Los parámetros séricos se evaluaron utilizando los siguientes kits comerciales: hierro sérico IRON-FZ (Spinreact, España), nitrógeno ureico en sangre (BUN) UREA -37 (Spinreact, España) y creatinina CREATININE-J (Spinreact, España), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **9.11. Análisis estadístico**

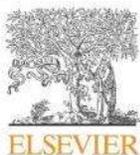
Todos los datos se analizaron utilizando el software GraphPad Prism (versión 9.5.1). Los resultados se reportan como media  $\pm$  error estándar de la media (S.E.M). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando análisis de varianza (ANOVA) de dos vías. La significancia estadística se estableció en  $p \leq 0.05$ .

## 10. RESULTADOS

### 10.1. Efectos de la restricción de hierro en la función mitocondrial y el estrés oxidativo en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina

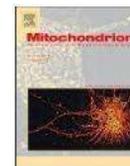
#### Resumen

La diabetes mellitus se caracteriza por una hiperglucemia crónica que causa disfunción mitocondrial y se ha observado una sobrecarga de hierro renal durante la diabetes. Evaluamos los efectos de una dieta restringida en hierro (DRH) sobre la función mitocondrial, el estrés oxidativo y los niveles de hierro mitocondrial en los riñones de ratas Wistar con diabetes inducida por estreptozotocina. La DRH mejoró la disfunción mitocondrial en ratas diabéticas al restaurar la respiración mitocondrial y la actividad del complejo respiratorio, mejorando el estrés oxidativo y el estado del glutatión en las mitocondrias renales. También observamos una sobrecarga de hierro mitocondrial. Nuestros datos sugieren que los niveles elevados de hierro fueron atenuados por la DRH, resultando en una modulación del estrés oxidativo y la función mitocondrial en el riñón.



Contents lists available at ScienceDirect

Mitochondrion

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/mito](http://www.elsevier.com/locate/mito)

## Effects of dietary iron restriction on kidney mitochondria function and oxidative stress in streptozotocin-diabetic rats

Donovan J. Peña-Montes<sup>a,b</sup>, Maribel Huerta-Cervantes<sup>a</sup>, Mónica Ríos-Silva<sup>b</sup>, Xóchitl Trujillo<sup>b</sup>, Christian Cortés-Rojo<sup>a</sup>, Miguel Huerta<sup>b</sup>, Alfredo Saavedra-Molina<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 58030 Morelia, Mich, Mexico

<sup>b</sup> Centro Universitario de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Colima, 28040 Colima, Col, Mexico



### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Diabetes mellitus  
Iron restriction  
Kidney  
Mitochondria  
Oxidative stress

### ABSTRACT

Diabetes mellitus is characterized by chronic hyperglycemia causing mitochondrial dysfunction and kidney iron overload has been observed during diabetes. We evaluated the effects of an iron-restricted diet (IRD) on mitochondrial function, oxidative stress, and mitochondrial iron levels in the kidneys of Wistar rats with streptozotocin-induced diabetes. IRD ameliorated mitochondrial dysfunction in diabetic rats by restoring mitochondrial respiration and respiratory complex activity, improving oxidative stress and glutathione status in kidney mitochondria. We also observed mitochondrial iron overload. Our data suggest that elevated iron levels were attenuated by IRD, resulting in modulation of oxidative stress and mitochondrial function in the kidney.

### 1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a heterogeneous metabolic disease characterized by chronic hyperglycemia due to disturbances in insulin secretion, defective insulin actions, or both (World Health Organization, 2006). The International Diabetes Federation (IDF) estimates that 463 million people have diabetes worldwide, with a projected rise to 578.4 million by 2030 (International Diabetes Federation, 2019). Chronic hyperglycemia in diabetes is associated with long-term complications that affect various organs and tissues, including the eyes, nerves, liver, heart, and kidneys (Punthakee et al., 2018). Diabetic kidney disease (DKD), characterized by proteinuria and loss of renal function, is the most common global cause of chronic kidney disease (CKD) and end-stage renal failure (Park, 2014).

The kidney is a “fuel-hungry” organ with high mitochondrial content, and the pathogenesis of DKD involves hemodynamic modifications, inflammation, and oxidative stress. Consequently, it modified activity of antioxidant enzymes, as well as increased reactive oxygen species (ROS) production (Vinod, 2012). Renal mitochondrial dysfunction leads to decreased oxidative phosphorylation (OXPHOS) and energy production, structural and cellular alterations, and loss of renal function (Galvan et al., 2017; Forbes and Thorburn, 2018). Therefore, improving mitochondrial function and mitochondrial oxidative stress is crucial for ameliorating DKD (Ortiz-Avila et al., 2013; Forbes and Thorburn, 2018). Mitochondria-targeted antioxidants, such as MitoQ,

reportedly show beneficial effects in therapy of mitochondria-related pathologies, eliminating ROS and rescuing cellular functionality (Oyewole et al., 2014).

Iron is an important trace mineral that plays a myriad of roles in all organisms, including mammals, serving as a prosthetic group for proteins involved in central cellular processes, such as respiration, DNA synthesis, and oxygen transport (Pantopoulos et al., 2012). However, its ability to gain and lose electrons also allows iron to participate in the generation of potentially harmful free radicals (e.g., OH radicals) via the Fenton reaction, leading to oxidative stress (Pantopoulos et al., 2012). A direct linkage between iron metabolism and diabetes has been observed in iron metabolism diseases, such as hereditary hemochromatosis (HH) and  $\beta$ -thalassemia, and body iron stores are positively associated with the development of glucose intolerance, type 2 diabetes, and gestational diabetes (Fernández-Real et al., 2002). Additionally, iron homeostasis abnormalities have been reported in both humans and animals with diabetes, leading to increased iron levels in the kidney, and correlated with proteinuria levels, increased levels of waste products (e.g., creatinine and urea), and other markers of renal failure (Nankivell et al., 1994; Harris et al., 1995; Ward et al., 2005; Domínguez et al., 2015). Mitochondrial iron overload has also been described in several diseases, including Friedreich ataxia and Huntington's disease (Rouault, 2016; Agrawal et al., 2018). Recent evidence shows that iron deprivation via a low-iron diet or iron chelation therapy improves DKD, CKD, glucose tolerance, and lipid profiles (Morita et al.,

\* Corresponding author.

E-mail address: [saavedra@umich.mx](mailto:saavedra@umich.mx) (A. Saavedra-Molina).

<https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.07.001>

Received 17 April 2020; Received in revised form 10 June 2020; Accepted 8 July 2020

Available online 14 July 2020

1567-7249/ © 2020 Published by Elsevier B.V.

2015; Ikeda et al., 2017).

The role of mitochondria in kidney iron accumulation remains unclear, as does the disruption of mitochondrial iron homeostasis during diabetes. Here we investigated the effects of dietary iron restriction on mitochondrial function (OXPHOS), oxidative stress, and mitochondrial iron levels in the kidneys and serum of Wistar rats with streptozotocin (STZ)-induced experimental diabetes.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Experimental design

We used 2-month-old male Wistar rats weighing 250–300 g. Rats were maintained in standard cages with a regular 12-h light/dark cycle, and free access to food and water. After 16 h of fasting, diabetes was induced in rats by a single intraperitoneal injection of 45 mg/kg streptozotocin (STZ) freshly dissolved in 0.1 M citrate buffer (pH 4.5). Normoglycemic rats were injected with citrate buffer (vehicle) alone. Five days after STZ administration, diabetes was confirmed by glucose level measurement using an Accu-chek blood glucometer, as described by Tesch and Allen (2007). Only rats with fasting blood glucose of  $\geq 300$  mg/dL were used for this study. Two weeks after STZ injection, 28 rats were randomly divided into four groups ( $n = 7$  per group): normoglycemic (NSD) and diabetic (DSD) rats fed a standard diet (200 mg Fe/Kg of food; Teklad 2018S; Envigo Research Indianapolis, Indiana, USA); and normoglycemic (NIRD) and diabetic (DIRD) rats fed an iron-restricted diet (3 mg Fe/Kg of food). Body weight and glucose levels were measured weekly. Eight weeks later, rats were sacrificed by decapitation, and blood samples were collected for determination of hemoglobin, serum iron, blood urea nitrogen, and creatinine levels.

### 2.2. Blood and serum parameters

Hemoglobin was measured in heparinized blood samples using the colorimetric Drabkins cyanide method. Briefly, 10  $\mu$ L of heparinized blood was mixed with 0.012 mM potassium ferricyanide ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ), 1.54 mM potassium cyanide (KCN), and 0.04 mM dipotassium phosphate ( $K_2HPO_4$ ). This mixture was incubated for 5 min and then the absorbance was measured at 540 nm in a Perkin-Elmer UV/Vis Lambda 18 spectrophotometer (Perkin-Elmer Inc., Shelton, CT, USA). Hemoglobin content was calculated using a standard curve for bovine hemoglobin (Rice, 1967). Serum iron was determined using colorimetry, according to Riemer et al. (2004). A 100- $\mu$ L serum sample was mixed with 200  $\mu$ L fresh 1.0 M hydrochloric acid (HCl) solution, and incubated for 2 h at 60 °C. We next added 250  $\mu$ L of reagent solution (0.52 mM ferrozine, 1.5 M ammonium acetate, and 1 M ascorbic acid), and incubated the mixture for 30 min at room temperature. Absorbance at 562 nm was measured in a Perkin-Elmer UV/Vis Lambda 18 spectrophotometer, and the iron concentration was calculated using a standard curve for ferric chloride ( $FeCl_3$ ). Commercial kits were used to determine levels of blood urea nitrogen (BUN; Urea 37; Spinreact) and serum creatinine (Creatinine FS; DiaSys Diagnostics).

### 2.3. Mitochondrial isolation and respiration

Mitochondria were isolated following the modified method of Saavedra-Molina and Devlin (1997). After treatment, rats were sacrificed by decapitation. The kidneys were dissected, immediately placed in ice-cold isolation buffer 1 [220 mM mannitol, 70 mM sucrose, 2 mM 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS), and 1 mM ethylene glycol-bis(2-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA)], decapsulated, and chopped. Next, the tissue was homogenized using a "Potter-Elvehjem"-type glass homogenizer and a Teflon piston. The homogenate was centrifuged at 2,000 rpm for 10 min, and then the supernatant was transferred to new tubes and centrifuged at 7,500 rpm for 10 min. Next, the supernatant was removed, and the pellet

resuspended in ice-cold isolation buffer 2 (220 mM mannitol, 70 mM sucrose, 2 mM MOPS, and 0.2% w/v bovine serum albumin), and centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. Finally, the pellet was re-suspended in 1 mL of buffer 2, and the mitochondrial protein content was assayed using a modification of the Biuret procedure (Gornall et al., 1949) with bovine serum albumin (BSA) as the standard. In freshly prepared renal mitochondria, mitochondrial respiration was polarographically measured using a Clark-type oxygen electrode connected to a 5300A Biological Oxygen Monitor (YSI, Ohio, USA). A total of 1.0 mg mitochondria was resuspended in respiration buffer [10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 100 mM potassium chloride (KCl), 3 mM magnesium chloride ( $MgCl_2$ ), and 3 mM monobasic potassium phosphate ( $KH_2PO_4$ ), pH 7.4] with the respiratory substrates glutamate and malate (5 mM each; G + M). Respiration and basal respiration were measured for 60 sec. Next, 100  $\mu$ M adenosine diphosphate (ADP) was added to evaluate respiratory state 3, with monitoring for 2 min. Finally, we added 0.5  $\mu$ g oligomycin to evaluate state 4 respiration. The respiratory control rate (RCR) was calculated as the ratio of state 3 over state 4 (Estabrook, 1967).

### 2.4. Determination of mitochondrial respiratory chain complex activities

Complex I (NADH:ferricyanide oxidoreductase) activity was assessed using frozen-permeabilized mitochondria as previously described (Ortiz-Avila et al., 2013), with slight modifications. A total of 0.1 mg protein was added to 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4; KPB) and mixed with 0.5 mM thenoyltrifluoroacetone (TTFA), 1  $\mu$ g antimycin A, and 1 mM KCN. This mixture was incubated for 7 min at room temperature, and then mixed with 10  $\mu$ M  $K_3[Fe(CN)_6]$  before recording the basal fluorescence for 1 min at excitation/emission wavelengths of 352/464 nm in a Shimadzu RF-5301PC spectrofluorophotometer. Next, 100  $\mu$ M  $\beta$ -Nicotinamide adenine dinucleotide ( $\beta$ -NADH) was added, and the changes in fluorescence were monitored for 4 min. The specific activity was calculated using a standard curve for  $\beta$ -NADH.

The activities of complexes II (succinate-2,6-dichloroindophenol (DCIP) oxidoreductase), II + III (succinate-cytochrome c oxidoreductase), and IV (cytochrome c oxidase) were assayed using the Triton 100X-solubilized mitochondrial fraction. For complex II, 0.3 mg of the mitochondrial fraction was resuspended in KPB and mixed with 10  $\mu$ M rotenone, 1 mM KCN, and 1  $\mu$ g antimycin A. This mixture was incubated for 7 min at room temperature, and then 80  $\mu$ M DCIP was added and the basal absorbance was monitored for 1 min. The reaction was started by addition of 10 mM succinate, and the changes in absorbance were monitored for 4 min in a Perkin-Elmer UV/Vis Lambda 18 spectrophotometer (Cortés-Rojo et al., 2007). Complex II + III activity was spectrophotometrically determined. We added 0.3 mg of the mitochondrial fraction to KPB, followed by incubation with 10  $\mu$ M rotenone and 1 mM KCN for 7 min. Then we added 250  $\mu$ g oxidized cytochrome c to the mixture, and recorded the basal absorbance for 1 min. Next, 10 mM of succinate was added, and the changes in absorbance measured for 4 min (Cortés-Rojo et al., 2007). To evaluate complex IV activity, 0.3 mg of the mitochondrial fraction was incubated for 7 min with 10  $\mu$ g rotenone, 0.5 mM TTFA, and 1  $\mu$ g antimycin A. We then added 125  $\mu$ g reduced cytochrome c and monitored the changes in absorbance for 3 min (Zentella de Piña et al., 1989).

### 2.5. Determination of mitochondrial iron

Mitochondrial iron was evaluated according to Rebouche et al. (2004), with modifications. First, mitochondria were purified by sucrose step density gradient centrifugation, as previously described (Clayton and Shadel, 2014). We next resuspended 1 mg purified mitochondria in 100  $\mu$ L ultrapure water ( $\geq 18.0$  M $\Omega$   $\times$  cm) and mixed this resuspension with 150  $\mu$ L of 1 M HCl and 10% trichloroacetic acid. This mixture was digested for 60 min at 95 °C, and then cooled to room

temperature and centrifuged for 10 min at 9,200 rpm. Next, 100  $\mu\text{L}$  of the digested product was mixed with 400  $\mu\text{L}$  ferrozine chromogen solution (0.508 mM ferrozine, 1.5 M sodium acetate, and 1 M ascorbic acid in ultrapure water), and incubated for 30 min under constant shaking at room temperature. Optical density at 562 nm was recorded in a Shimadzu UV-2550 UV VIS Spectrophotometer. The total mitochondrial iron concentration was calculated using an  $\text{FeCl}_3$  analytical standard.

#### 2.6. Determination of reactive oxygen species

ROS production was determined using the fluorogenic probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate ( $\text{H}_2\text{DCFDA}$ ) (Ortiz-Avila et al., 2013). A total of 0.3 mg/mL mitochondrial protein was suspended in buffer (10 mM HEPES, 100 mM KCl, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , and 3 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4) and incubated with 12.5  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{DCFDA}$  for 15 min in an ice bath under shaking (Ortiz-Avila et al., 2013). After 1 min, basal fluorescence was recorded. We then added 5 mM G + M and recorded the changes in fluorescence for 60 min at excitation/emission wavelengths of 485/520 nm in a Shimadzu RF-5301PC spectrofluorophotometer. These results are expressed as arbitrary units (AU) per mg protein.

#### 2.7. Determination of lipid peroxidation and protein carbonylation

Lipid peroxidation was measured using thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), as described by Buege and Aust (1978) with slight modifications. Briefly, mitochondria were washed twice with cold PBS (pH 7.4) to prevent the interference of soluble sugars in the medium. Next, 0.3 mg/mL mitochondrial protein was suspended in PBS (pH 7.4), and then mixed with reagent solution containing 0.375% thiobarbituric acid (TBA), 15% trichloroacetic acid (TCA), 0.25 M HCl, plus 0.01% BHT to prevent non-specific chromophore formation. This mixture was incubated for 15 min in a boiling water bath. After cooling, the flocculent precipitate was centrifuged at 7500 rpm for 5 min. The absorbance was measured at 532 nm in a Perkin Elmer Lambda 18 UV VIS Spectrophotometer, using a molar extinction coefficient of  $156 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

We measured protein carbonylation using the 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) coupling method described by Wehr and Levine (2013). A total of 0.2 mg mitochondrial protein was mixed with 10 mM DNPH in 2 M HCl and incubated for 10 min at room temperature. Proteins were precipitated with 10% TCA, centrifuged at  $5000 \times g$ , and washed with a mixture of ethanol-ethyl acetate (1:1) to remove free DNPH. Finally, the pellets were resuspended in 10% sodium dodecyl sulfate (SDS), and the DNPH-coupled carbonylated proteins were measured at 360 nm in a Perkin Elmer Lambda 18 UV VIS Spectrophotometer, using a molar extinction coefficient of  $22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### 2.8. Determination of glutathione status

Mitochondrial glutathione was evaluated using an enzymatic recycling method, as described by Rahman et al. (2006). Total glutathione was determined in 0.2 mg mitochondrial protein, which was resuspended in 0.1% Triton-X and 0.6% sulfosalicylic acid in 100 mM potassium phosphate buffer plus 5 mM EDTA, pH 7.5 (KPEB). Then this mixture was subjected to three 20-sec cycles of sonication on ice, followed by two freeze/thaw cycles, and then centrifugation at 7200 rpm. The supernatant (100  $\mu\text{L}$ ) was added to KPEB with 100  $\mu\text{M}$  5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) and 0.1 units/mL glutathione reductase (GR), and incubated for 30 sec. The reaction was started by addition of 50  $\mu\text{M}$   $\beta$ -NADPH and monitored for 5 min at 412 nm using a Shimadzu UV-2550 UV VIS Spectrophotometer in kinetic mode. Reduced glutathione (GSH) was derivatized through incubation with 0.2% 4-vinylpyridine for 1 h at room temperature, yielding oxidized glutathione (GSSG). GSH was calculated by subtracting GSSG from the

total glutathione.

#### 2.9. Determination of SOD2 activity and expression

SOD2 activity was determined using a commercial kit (19160, Sigma-Aldrich), following the manufacturer's instructions with slight modifications. Briefly, 0.1 mg mitochondrial protein was resuspended in 200  $\mu\text{L}$  assay buffer, mixed with 20  $\mu\text{L}$  enzymatic working solution, and incubated for 30 min at 37 °C. Optical density was recorded at 450 nm in a Multiskan FC microplate reader (Thermo Scientific). The results were expressed as units of SOD and were calculated using SOD from *E. coli* as the standard. SOD2 expression was measured by immunoblotting. Mitochondrial protein was determined using the Lowry method with BSA as the standard. A total of 60  $\mu\text{g}$  protein was resolved on SDS-polyacrylamide gels, and then transferred to polyvinylidene fluoride membranes and blocked with 5% (w/v) non-fat milk in TBS-T (Tris/HCl; NaCl, pH 7.6; and 0.05% TWEEN 20) at room temperature for 1 h. Next, the membranes were incubated overnight at 4 °C with primary monoclonal anti-SOD2 (1:2000) or anti-TOM20 (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), and then incubated overnight at 4 °C with HRP-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (1:4000; Sigma-Aldrich, MO, USA). Images were acquired using a ChemiDoc XRS + imaging system (Bio-Rad, USA) and images were detected and analyzed with ImageLab 6.0.1. (Bio-Rad, USA). The relative protein levels were calculated based on TOM20 expression as a loading control, and SOD2 was expressed as relative units.

#### 2.10. Animal use statement

All experimental procedures were conducted in accordance with the recommendations of the Mexican Federal Regulations for the Use and Care of Animals (NOM-062-ZOO-1999, Ministry of Agriculture, Mexico). The protocols were approved by the Institutional Committee for Use of Animals of the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (folio 08/2019).

#### 2.11. Statistical analysis

Results are reported as mean  $\pm$  standard deviation. The significance of differences in the mean were assessed using two-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparison test. A *p* value of  $\leq 0.05$  was considered statistically significant.

### 3. Results

#### 3.1. Effects of iron-restricted diet on body weight, and blood and serum parameters in diabetic rats

Compared to normoglycemic rats, rats with experimental STZ-induced diabetes exhibited a 45% decrease of body weight (BW) after 8 weeks (Table 1). Iron restriction did not significantly affect BW in normoglycemic rats. However, among diabetic rats, 8 weeks of iron restriction led to a 24.7% increase of BW, as well as a slight significant decrease of blood glucose. Hemoglobin levels were similar between control and diabetic rats. In contrast, serum iron levels were higher among diabetic rats compared to normoglycemic rats. The iron-restricted diet decreased both hemoglobin and serum iron in diabetic rats. Compared to normoglycemic rats, diabetic rats exhibited elevated BUN and serum creatinine, two markers of renal function, these increases were ameliorated by iron restriction (Table 1).

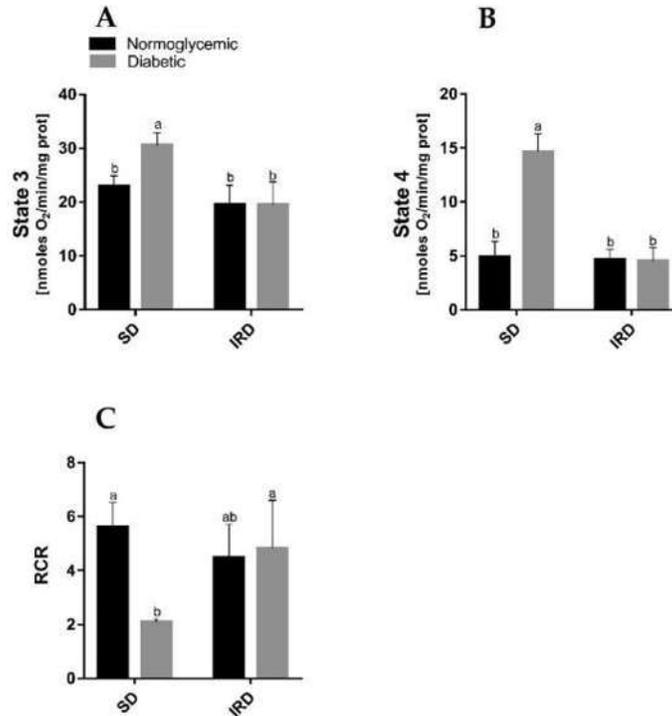
#### 3.2. Effects of iron-restricted diet on mitochondrial respiration

To examine the effects of iron-restricted diet on mitochondrial function, we used NADH-linked substrates (G + M) to evaluate mitochondrial respiration in mitochondria freshly isolated from both

**Table 1**  
Effects of iron-restricted diet on body weight, blood glucose and serum parameters.

	Body weight (g)	Glucose (mg/dL)	Hemoglobin (g/dL)	Serum iron (µg/dL)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)
NSD	401 ± 30.7 <sup>a</sup>	82.7 ± 8.5 <sup>c</sup>	15.7 ± 0.4 <sup>a</sup>	69.2 ± 6.9 <sup>b</sup>	18.6 ± 4.1 <sup>b</sup>	0.21 ± 0.06 <sup>b</sup>
DSD	218 ± 27.7 <sup>c</sup>	546.4 ± 51.4 <sup>a</sup>	15.5 ± 0.4 <sup>a</sup>	110.4 ± 12.6 <sup>a</sup>	32.6 ± 10.2 <sup>a</sup>	1.34 ± 0.5 <sup>a</sup>
NRID	426 ± 22.1 <sup>a</sup>	90.8 ± 6.9 <sup>c</sup>	11.5 ± 1.6 <sup>b</sup>	44.1 ± 4.8 <sup>c</sup>	15.3 ± 2.11 <sup>b</sup>	0.19 ± 0.04 <sup>b</sup>
DRID	272 ± 28.5 <sup>b</sup>	401.8 ± 85.5 <sup>b</sup>	12.0 ± 1.3 <sup>b</sup>	45.1 ± 5.2 <sup>c</sup>	20.3 ± 5.4 <sup>b</sup>	0.35 ± 0.36 <sup>b</sup>

Note: Results are expressed as mean ± SD, n = 7. Different letters indicate significant differences between groups ( $p \leq 0.05$ ) by two-way ANOVA with Tukey's post-hoc test. BUN, blood urea nitrogen. NSD, normoglycemic rats fed a standard diet; DSD, diabetic rats fed a standard diet; NRID, normoglycemic rats fed an iron-restricted diet; DRID, diabetic rats fed an iron-restricted diet.



**Fig. 1.** Effects of iron-restricted diet on mitochondrial respiration. (A) Respiratory state 3 activity: ADP-stimulated and G + M-respiration dependent. (B) Respiratory state 4 activity: oxygen uptake in the presence of oligomycin and no ATP synthesis by OXPHOS. (C) Respiratory control ratio (state 3/state 4), representing the mitochondrial coupling state. Results are expressed as mean ± standard deviation, n = 7. Different letters indicate significant differences between groups ( $p \leq 0.05$ ) by two-way ANOVA with Tukey's post-hoc test. SD, standard diet; IRD, iron-restricted diet.

kidneys. Both state 3 (ADP-dependent) and state 4 (ADP-independent) activities were increased in the diabetic rats compared to normoglycemic rats (Fig. 1A, B). Moreover, these increases in diabetic rats were ameliorated by the iron-restricted diet (Fig. 1A, B). We also determined the respiratory control ratio (RCR; state 3 activity/state 4 activity) (Fig. 1C), which is an indicator of the coupling state of mitochondria. Among rats fed a standard diet, diabetic rats showed lower RCR values compared to normoglycemic rats. In contrast, among rats fed the iron-restricted diet, diabetic rats displayed a higher RCR compared with normoglycemic rats.

**3.3. Effects of iron-restricted diet on mitochondrial complex activities**

Next, we determined mitochondrial complex activities to examine the effects of dietary iron restriction on mitochondrial functionality (Fig. 2). Among rats fed a standard diet, the activities of complexes I and II were slightly but significantly increased in diabetic rats compared to normoglycemic rats. Iron restriction in diabetic rats prevented this increased activity of both complexes (Fig. 2A, B). On the other hand, among rats fed a standard diet, the activities of complexes III and IV were decreased in diabetic rats (Fig. 2C, D). With the iron-restricted diet, diabetic rats no longer showed reduced complex III activity, but still showed lower complex IV activity compared to normoglycemic rats. Normoglycemic rats fed the iron-restricted diet exhibited

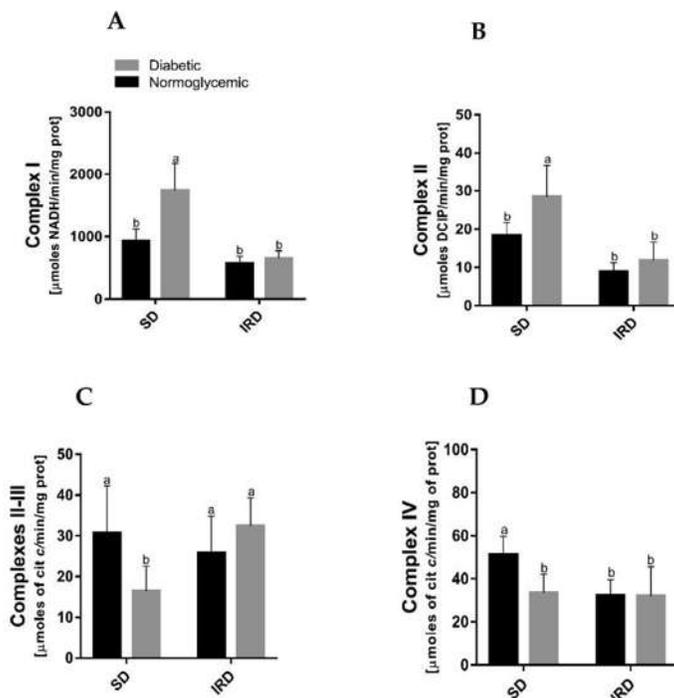


Fig. 2. Effects of an iron-restricted diet on mitochondrial complex activities. (A) Complex I activity. (B) Complex II activity. (C) Complex II–III activity. (D) Complex IV activity. Results are expressed as mean ± standard deviation, n = 7. Different letters indicate significant differences between groups ( $p \leq 0.05$ ) by two-way ANOVA with Tukey's post-hoc test. SD, standard diet; IRD, iron-restricted diet.

decreases in all respiratory complex activities.

### 3.4. Effects of iron-restricted diet on mitochondrial iron levels

To address whether mitochondrial dysfunction in the kidney is associated with mitochondrial iron accumulation in diabetes, we determined the total mitochondrial iron levels (Fig. 3). Compared to normoglycemic rats, diabetic rats showed a 2.5-fold increase of mitochondrial iron levels in whole-kidney mitochondria. Diabetic rats fed an iron-restricted diet exhibited partial reduction of their increased mitochondrial iron levels.

### 3.5. Effects of iron-restricted diet on ROS production

We next examined the ROS production in isolated mitochondria from diabetic rats and found that ROS production was significantly increased by ~46% compared to in control rats (Fig. 4). Compared to diabetic rats fed a standard diet, diabetic rats fed the iron-restricted diet showed significantly reduced ROS production, like that observed in normoglycemic rats. Among normoglycemic rats, those fed an iron-restricted diet showed a slight but significant increase of ROS production compared to those fed a standard diet.

### 3.6. Effects of iron-restricted diet on mitochondrial oxidative damage and mitochondrial antioxidant biomarkers

Compared to normoglycemic rats, diabetic rats exhibited

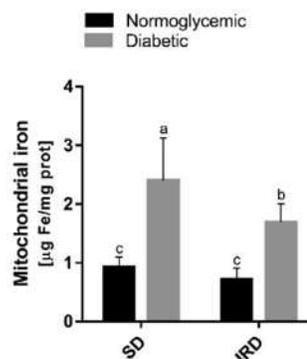


Fig. 3. Effects of iron-restricted diet on mitochondrial iron levels. Results are expressed as mean ± standard deviation, n = 7. Different letters indicate significant differences between groups ( $p \leq 0.05$ ) by two-way ANOVA with Tukey's post-hoc test. SD, standard diet; IRD, iron-restricted diet.

significantly increased oxidative damage in mitochondria, e.g., lipid peroxidation (TBARS) and protein carbonylation (DNPH-conjugation) (Fig. 5A, B). In diabetic rats, the iron-restricted diet decreased lipid peroxidation by ~45% compared to in diabetic rats fed a standard diet. Diabetic rats fed the iron-restricted diet also exhibited decreased

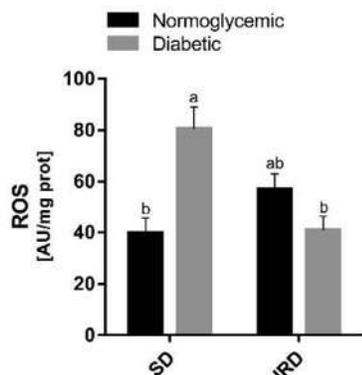


Fig. 4. Effects of iron-restricted diet on Reactive Oxygen Species production. Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation,  $n = 7$ . Different letters indicate significant differences between groups ( $p \leq 0.05$ ) by two-way ANOVA with Tukey's post-hoc test. AU, arbitrary units. SD, standard diet; IRD, iron-restricted diet.

protein carbonylation levels compared to in diabetic rats fed a standard diet.

Diabetic rats also showed alterations in GSH and GSSG and exhibited a decreased GSH/GSSG ratio compared to normoglycemic rats, while total glutathione was unaffected (Fig. 5C–F). These changes in mitochondrial glutathione status were improved in diabetic rats fed the iron-restricted diet. Compared to diabetic rats fed a standard diet, those fed the iron-reduced diet exhibited reduced GSSG levels, increased GSH levels, and an improved GSH/GSSG ratio.

We also analyzed SOD2 activity and expression. Our results showed reduced SOD2 activity in diabetic rats compared to normoglycemic rats (Fig. 5G), but no differences in SOD2 expression (Fig. 5H, I). Diabetic rats fed the iron-restricted diet exhibited significantly increased SOD2 activity and expression compared to both normoglycemic rats and diabetic rats fed a standard diet (Fig. 5H, I).

#### 4. Discussion

Iron plays important roles in maintaining physiological homeostasis in all organisms; however, its ability to gain and lose electrons also enables its participation in the generation of potentially harmful free radicals; thus, iron levels must be tightly regulated (Anderson et al., 2012). Kidney iron overload has been reported in diabetes (Johnson and Evans, 1984; Nankivell et al., 1994; Dominguez et al., 2015). Moreover, previous studies have suggested that iron restriction may improve the deleterious effects of diabetes (increasing insulin secretion and sensitivity) and improve renal function and hypertension in diabetes and CKD models (Cooksey et al., 2010; Minamiyama et al., 2010; Naito et al., 2012; Ikeda et al., 2013; Márquez-Ibarra et al., 2016). These previous reports are in line with our present results regarding the renal function markers BUN and serum creatinine, which were improved in diabetic mice fed an iron-restricted diet (Table 1).

Mitochondrial iron accumulation has been reported in Huntington's disease and in aging, but it remains unclear whether iron dysregulation in mitochondrion is part of the pathophysiology of DKD (Seo et al., 2008; Agrawal et al., 2018). In the present study, we reported for the first time that STZ-induced experimental diabetes was associated with increased renal levels of mitochondrial iron, indicating that diabetes is a cause of accelerated iron overload in mitochondria. This iron overload could be caused by increased absorption of iron in the body, and its subsequent accumulation in the kidneys, due to a deficiency of the peptide hormone hepcidin in the diabetic milieu. Hepcidin is a central

molecule in the regulation of systemic iron homeostasis, and hepcidin deficiency leads to iron overabsorption and alterations of iron transport proteins in diabetes, leading to iron overload in the kidneys (Ward et al., 2005; Wang et al., 2014; Ghosh et al., 2015).

Notably, abnormalities in mitochondrial function are a common component of the pathophysiology of diabetic kidney disease. In our laboratory, we previously reported that the kidneys of diabetic rats exhibit modifications in the redox state and in oxidative and nitrosative stress, accompanied by changes in mitochondrial function (Noriega-Cisneros et al., 2013; Pérez-Gallardo et al., 2014). Diabetic rats also reportedly show dysregulation of mitochondrial complex activities—for example, increased complex I activity, which may occur due to an NADH/NAD<sup>+</sup> redox imbalance caused by NADH overproduction or HNE modifications in complex I subunits (Wu et al., 2015; Wu et al., 2017). Here we demonstrated increased complex I and II activities in diabetic rats (Fig. 2). These increases were prevented by the iron-restricted diet, through downregulation of the proteins' activities in energy metabolism, without an increase of ROS production (Fig. 4). Such modulations in the use of respiratory substrates linked to NADH and complex II have been reported to promote an improved redox state in diabetes and Alzheimer's disease, contributing to normalizing ROS production and mitochondrial membrane potential (Nishikawa et al., 2000; Starkov and Fiskum, 2003; Pospisilik et al., 2007; Zhang et al., 2015). Similarly, in diabetes, decreased activity of mitochondrial complex III in the kidneys is reportedly caused by post-translational modifications related to oxidative stress, which is closely related to increased mitochondrial ROS production (Rosca et al., 2005; Munusamy et al., 2009; Raza et al., 2011; Ortiz-Avila et al., 2013).

Decreasing ROS production and restoring mitochondrial functionality and homeostasis can reverse cell damage and improve renal function in kidney disease (Bhargava and Schnellmann, 2017). The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ shows beneficial effect in diabetes, decreasing mitochondrial ROS and oxidative damage, as well as anti-inflammatory actions. Likewise, mitochondria-targeted iron chelators have been successfully used to ameliorate iron overload and improve mitochondrial function and oxidative damages (Reelfs et al., 2016; Agrawal et al., 2018). Our present results suggest that iron restriction decreased mitochondrial damage and mitochondrial dysfunction and prevented iron accumulation in the kidneys of rats with experimental diabetes, indicating a preventive effect by decreasing oxidative stress associated with iron accumulation. These results are in accordance with prior observations that decreasing iron levels in an organism prevents kidney injury and oxidative stress (Ikeda et al., 2017). These effects may also be explained by inhibited signaling of mineralocorticoid receptors, leading to hemodynamic modification, as well as oxidative stress through inhibition of NADPH oxidase activity in chronic kidney disease (Naito et al., 2012; Tajima et al., 2012; Naito et al., 2013).

#### 5. Conclusion

In conclusion, our present results demonstrated that experimental STZ-induced diabetes in rats was associated with increased mitochondrial iron levels, and that an iron-restricted diet attenuated mitochondrial iron accumulation and modulated oxidative stress and mitochondrial function in the kidneys. Further studies are needed to determine the mechanism by which the diabetic milieu leads to iron overload in kidney mitochondria.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

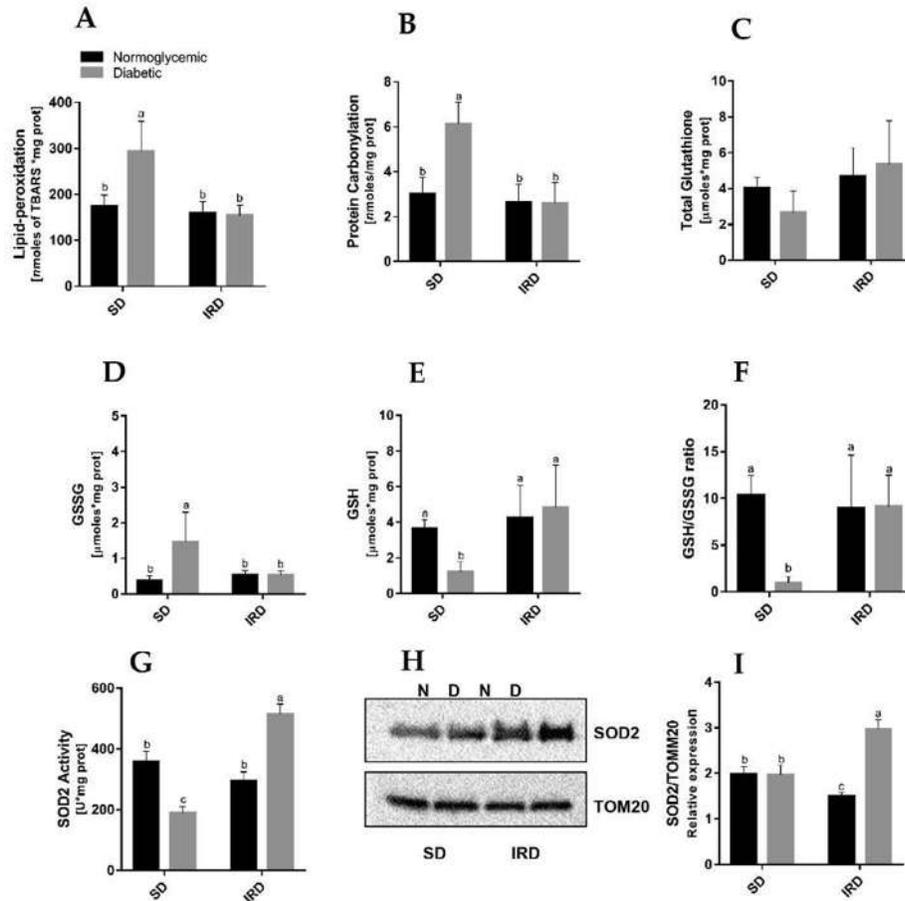


Fig. 5. Effects of iron-restricted diet on mitochondrial oxidative damage and mitochondrial antioxidant biomarkers. (A) Levels of lipid peroxidation assessed using TBARS. (B) Protein carbonylation levels assessed using DNP conjugation. (C) Total glutathione. (D) Oxidized glutathione (GSSG). (E) Reduced glutathione (GSH). (F) GSH/GSSG ratio. (G) SOD2 activity. (H) SOD2 expression. Results are expressed as mean ± standard deviation, n = 7. Different letters indicate significant differences between groups ( $p \leq 0.05$ ) by two-way ANOVA with Tukey's post-hoc test. SD, standard diet; IRD, iron-restricted diet; N, normoglycemic rats; D, diabetic rats; SOD2, superoxide dismutase 2; TOM20, translocase outer membrane 20.

**Acknowledgments**

This research was funded by Coordinación de Investigación Científica, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Mexico. (ASM 2.16). D.J.P.-M. and M.H.-C are CONACYT fellows.

**References**

Agrawal, S., Fox, J., Thyagarajan, B., Fox, J.H., 2018. Brain mitochondrial iron accumulates in Huntington's disease, mediates mitochondrial dysfunction, and can be removed pharmacologically. *Free Radic. Biol. Med.* 120, 317–329.

Anderson, C.P., Shen, M., Eisenstein, R.S., Leibold, E.A., 2012. Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Mol. Cell Res.* 1823 (9), 1468–1483.

Bhargava, P., Schnellmann, R.G., 2017. Mitochondrial energetics in the kidney. *Nat. Rev. Nephrol.* 13 (10), 629–646.

Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302–310.

Clayton, D.A., Shadel, G.S., 2014. Isolation of mitochondria from cells and tissues. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2014(10), [pdb.prot080028](https://doi.org/10.1101/cdb.prot080028).

Cooksey, R.C., Jones, D., Gabrielsen, S., Huang, J., Simeox, J.A., Luo, B., Soesanto, Y.,

Rienhoff, H., Abel, E.D., McClain, D.A., 2010. Dietary iron restriction or iron chelation protects from diabetes and loss of  $\beta$ -cell function in the obese (*ob/ob lep -/-*) mouse. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298 (6), E1236–E1243.

Cortés-Rojo, C., Calderón-Cortés, E., Clemente-Guerrero, M., Manzo-Avalos, S., Uribe, S., Boldogh, I., Saavedra-Molina, A., 2007. Electron transport chain of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria is inhibited by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at succinate-cytochrome c oxidoreductase level without lipid peroxidation involvement. *Free Radic. Res.* 41 (11), 1212–1223.

Dominguez, J.H., Liu, Y., Kelly, K.J., 2015. Renal iron overload in rats with diabetic nephropathy. *Physiol. Rep.* 3 (12), e12654.

Estabrook, R.W., 1967. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP: O ratios. *Methods Enzymol.* 10, 41–47.

Fernández-Real, J.M., López-Bermejo, A., Ricart, W., 2002. Cross-talk between iron metabolism and diabetes. *Diabetes* 51 (8), 2348–2354.

Forbes, J.M., Thorburn, D.R., 2018. Mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* 14 (5), 291–312.

Galvan, D.L., Badal, S.S., Long, J., Chang, B.H., Schumacker, P.T., Overbeek, P.A., Dnesh, F.R., 2017. Real-time in vivo mitochondrial redox assessment confirms enhanced mitochondrial reactive oxygen species in diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 92 (5), 1282–1287.

Ghosh, M.C., Zhang, D.L., Rouault, T.A., 2015. Iron misregulation and neurodegenerative disease in mouse models that lack iron regulatory proteins. *Neurobiol. Dis.* 81, 66–75.

Gornall, A.G., Bardawill, C.J., David, M.M., 1949. Determination of serum proteins by

- means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177 (2), 751–766.
- Harris, D.C., Tay, Y.C., Chen, J., Nankivell, B.J., 1995. Mechanisms of iron-induced proximal tubule injury in rat remnant kidney. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 269 (2), F218–F224.
- Ikeda, Y., Enomoto, H., Tajima, S., Izawa-Ishizawa, Y., Kihira, Y., Ishizawa, K., Tomita, S., Tsuchiya, K., Tamaki, T., 2013. Dietary iron restriction inhibits progression of diabetic nephropathy in db/db mice. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 304 (7), F1028–F1036.
- Ikeda, Y., Horinouchi, Y., Hamano, H., Hirayama, T., Kishi, S., Izawa-Ishizawa, Y., Imanishi, M., Zamami, Y., Takechi, K., Miyamoto, L., Ishizawa, K., Aihara, K.I., Nagasawa, H., Tsuchiya, K., Tamaki, T., 2017. Dietary iron restriction alleviates renal tubulointerstitial injury induced by protein overload in mice. *Sci. Rep.* 7 (1), 10621.
- International Diabetes Federation, 2019. *IDF diabetes atlas. 9th ed.* <http://www.idf.org/diabetesatlas>. Accessed on 24 December 2019.
- Johnson, W.T., Evans, G.W., 1984. Effects of the interrelationship between dietary protein and minerals on tissue content of trace metals in streptozotocin-diabetic rats. *J. Nutr.* 114 (1), 180–190.
- Márquez-Ibarra, A., Huerta, M., Villalpando-Hernández, S., Ríos-Silva, M., Díaz-Reval, M.I., Cruzblanca, H., Mancilla, E., Trujillo, X., 2016. The effects of dietary iron and capsaicin on hemoglobin, blood glucose, insulin tolerance, cholesterol, and triglycerides, in healthy and diabetic Wistar rats. *PLoS One* 11 (4), e0152625.
- Minamiyama, Y., Takemura, S., Kodai, S., Shinkawa, H., Tsukioka, T., Ichikawa, H., Naito, Y., Yoshikawa, T., Okada, S., 2010. Iron restriction improves type 2 diabetes mellitus in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298 (6), E1140–E1149.
- Morita, T., Nakano, D., Kitada, K., Morimoto, S., Ichihara, A., Hitomi, H., Kobori, H., Nishiyama, A., 2015. Chelation of dietary iron prevents iron accumulation and macrophage infiltration in the type I diabetic kidney. *Eur. J. Pharmacol.* 756, 85–91.
- Munusamy, S., Saba, H., Mitchell, T., Megyesi, J.K., Brock, R.W., MacMillan-Crow, L.A., 2009. Alteration of renal respiratory Complex-III during experimental type-1 diabetes. *BMC Endocr. Disord.* 9 (1), 2.
- Naito, Y., Fujii, A., Sawada, H., Hirotsu, S., Iwasaku, T., Eguchi, A., Ohyanagi, M., Tsujino, T., Masuyama, T., 2012. Effect of iron restriction on renal damage and mineralocorticoid receptor signaling in a rat model of chronic kidney disease. *J. Hypertens.* 30 (11), 2192–2201.
- Naito, Y., Fujii, A., Sawada, H., Hirotsu, S., Iwasaku, T., Okuhara, Y., Eguchi, A., Ohyanagi, M., Tsujino, T., Masuyama, T., 2013. Dietary iron restriction prevents further deterioration of renal damage in a chronic kidney disease rat model. *J. Hypertens.* 31 (6), 1203–1213.
- Nankivell, B.J., Tay, Y.C., Boadle, R.A., Harris, D.C., 1994. Lysosomal iron accumulation in diabetic nephropathy. *Ren. Fail.* 16 (3), 367–381.
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X.L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kameda, Y., Yorek, M.A., Beebe, D., Oates, P.J., Hammes, H.P., Giordino, I., Brownlee, M., 2000. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404 (6779), 787–790.
- Noriega-Cisneros, R., Cortés-Rojo, C., Manzo-Avalos, S., Clemente-Guerrero, M., Calderón-Cortés, E., Salgado-Garciglia, R., Montoya-Pérez, R., Boldogh, I., Saavedra-Molina, A., 2013. Mitochondrial response to oxidative and nitrosative stress in early stages of diabetes. *Mitochondrion* 13 (6), 835–840.
- Ortiz-Avila, O., Sámano-García, C.A., Calderón-Cortés, E., Pérez-Hernández, I.H., Mejía-Zepeda, R., Rodríguez-Orozco, A.R., Saavedra-Molina, A., Cortés-Rojo, C., 2013. Dietary avocado oil supplementation attenuates the alterations induced by type 1 diabetes and oxidative stress in electron transfer at the complex II-complex III segment of the electron transport chain in rat kidney mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 45 (3), 271–287.
- Oyewole, A.O., Wilmot, M.C., Fowler, M., Birch-Machin, M.A., 2014. Comparing the effects of mitochondrial targeted and localized antioxidants with cellular antioxidants in human skin cells exposed to UVA and hydrogen peroxide. *FASEB J.* 28 (1), 485–494.
- Pantopoulos, K., Porwal, S.K., Tartakoff, A., Devireddy, L., 2012. Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry* 51 (29), 5705–5724.
- Park, C.W., 2014. Diabetic kidney disease: from epidemiology to clinical perspectives. *Diabetes Metab. J.* 38 (4), 252–260.
- Pérez-Gallardo, R.V., Noriega-Cisneros, R., Esquivel-Gutiérrez, E., Calderón-Cortés, E., Cortés-Rojo, C., Manzo-Avalos, S., Campos-García, J., Salgado-Garciglia, R., Montoya-Pérez, R., Boldogh, I., Saavedra-Molina, A., 2014. Effects of diabetes on oxidative and nitrosative stress in kidney mitochondria from aged rats. *J. Bioenerg. Biomembr.* 46 (6), 511–518.
- Pospisilik, J.A., Knauf, C., Joza, N., Benit, P., Orthofer, M., Cani, P.D., Ebersberger, I., Nakashima, T., Sarao, R., Neely, G., Esterbauer, H., Kozlov, A., Kahn, C.R., Kroemer, G., Rustin, P., Barcelin, R., Penninger, J.M., 2007. Targeted deletion of AIF decreases mitochondrial oxidative phosphorylation and protects from obesity and diabetes. *Cell* 131 (3), 476–491.
- Punthakee, Z., Goldenberg, R., Katz, P., 2018. Definition, classification and diagnosis of diabetes, prediabetes and metabolic syndrome. *Can. J. Diab.* 42, S10–S15.
- Rahman, I., Kode, A., Biswas, S.K., 2006. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protoc.* 1 (6), 3159–3165.
- Raza, H., Prabu, S.K., John, A., Avadhani, N.G., 2011. Impaired mitochondrial respiratory functions and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int. J. Mol. Sci.* 12 (5), 3133–3147.
- Rebouche, C.J., Wilcox, C.L., Widness, J.A., 2004. Microanalysis of non-heme iron in animal tissues. *J. Biochem. Biophys. Methods* 58 (3), 239–251.
- Reelfs, O., Abbate, V., Hider, R.C., Pourzand, C., 2016. A powerful mitochondria-targeted iron chelator affords high photoprotection against solar ultraviolet A radiation. *J. Invest. Dermatol.* 136 (8), 1692–1700.
- Rice, E.W., 1967. Rapid determination of total hemoglobin as hemoglobin cyanide in blood containing carboxyhemoglobin. *Clin. Chim. Acta* 18, 89–91.
- Riemer, J., Hoepken, H.H., Czerwinska, H., Robinson, S.R., Dringen, R., 2004. Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells. *Anal. Biochem.* 331 (2), 370–375.
- Rosca, M.G., Mustafa, T.G., Kinter, M.T., Ozdemir, A.M., Kern, T.S., Szewda, L.L., Brownlee, M., Monnier, V.M., Weiss, M.F., 2005. Glycation of mitochondrial proteins from diabetic rat kidney is associated with excess superoxide formation. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 289, F420–F430.
- Rouault, T.A., 2016. Mitochondrial iron overload: causes and consequences. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 38, 31–37.
- Saavedra-Molina, A., Devlin, T.M., 1997. Effect of extra- and intra-mitochondrial calcium on citrulline synthesis. *Amino Acids* 12 (3–4), 293–298.
- Seo, A.Y., Xu, J., Servais, S., Hofer, T., Marzetti, E., Wohlgemuth, S.E., Knutson, M.D., Lecuwerburgh, C., 2008. Mitochondrial iron accumulation with age and functional consequences. *Aging Cell* 7 (5), 706–716.
- Starkov, A.A., Fiskum, G., 2003. Regulation of brain mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by membrane potential and NAD(P)H redox state. *J. Neurochem.* 86 (5), 1101–1107.
- Tajima, S., Ikeda, Y., Sawada, K., Yamano, N., Horinouchi, Y., Kihira, Y., Ishizawa, K., Izawa-Ishizawa, Y., Kawazoe, K., Tomita, S., Minakuchi, K., Tsuchiya, K., Tamaki, T., 2012. Iron reduction by deferoxamine leads to amelioration of adiposity via the regulation of oxidative stress and inflammation in obese and type 2 diabetes KKAY mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 302 (1), E77–E86.
- Tesch, G.H., Allen, T.J., 2007. Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy (Methods in Renal Research). *Nephrology* 12 (3), 261–266.
- Vinod, P.B., 2012. Pathophysiology of diabetic nephropathy. *Clin. Queries Nephrol.* 1 (2), 121–126.
- Wang, H., Li, H., Jiang, X., Shi, W., Shen, Z., Li, M., 2014. Hepsidin is directly regulated by insulin and plays an important role in iron overload in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 63 (5), 1506–1518.
- Ward, D.T., Hamilton, K., Burnand, R., Smith, C.P., Tomlinson, D.R., Riccardi, D., 2005. Altered expression of iron transport proteins in streptozotocin-induced diabetic rat kidney. *Biochim. Biophys. Acta* 1740 (1), 79–84.
- Wehr, N.B., Levine, R.L., 2013. Quantification of protein carbonylation. *Methods Mol. Biol.* 965, 265–281.
- World Health Organization, 2006. *Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia: report of a WHO/IDF consultation.* Accessed on December 2019.
- Wu, J., Luo, X., Yan, L.J., 2015. Two dimensional blue native/SDS-PAGE to identify mitochondrial complex I subunits modified by 4-hydroxynonenal (HNE). *Front. Physiol.* 6, 98.
- Wu, J., Luo, X., Thangthae, N., Sumien, N., Chen, Z., Rutledge, M.A., Jing, S., Forster, M.J., Yan, L.J., 2017. Pancreatic mitochondrial complex I exhibits aberrant hyperactivity in diabetes. *Biochem. Biophys. Rep.* 11, 119–129.
- Zentella de Piña, M., Villalobos-Molina, R., Saavedra-Molina, A., Riveros-Rosas, H., Piña, E., 1989. Effects of moderate chronic ethanol consumption on rat liver mitochondrial functions. *Alcohol* 6 (1), 3–7.
- Zhang, L., Zhang, S., Maezawa, I., Trushin, S., Minhas, P., Pinto, M., Jin, L.W., Prasain, K., Nguyen, T.D., Yamazaki, Y., Kanekiyo, T., Bu, G., Gateno, B., Chang, K.O., Nath, K.A., Nemtlu, E., Dzeja, P., Pang, Y.P., Hua, D.H., Trushina, E., 2015. Modulation of mitochondrial complex I activity averts cognitive decline in multiple animal models of familial Alzheimer's disease. *EBioMedicine* 2 (4), 294–305.

## **10.2. La quelación de hierro mitiga la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo incrementando la respuesta antioxidante mediada por NRF2 en la corteza renal de un modelo murino de diabetes tipo 2**

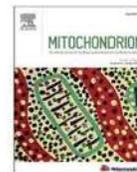
### **Resumen**

La sobrecarga renal de hierro es una complicación común de la diabetes que conduce al estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial en los riñones. Este estudio investigó los efectos de la quelación de hierro utilizando deferiprona sobre la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo en la corteza renal de un modelo murino de diabetes tipo 2. Las ratas diabéticas fueron tratadas con deferiprona (50 mg/kg de peso corporal) durante 16 semanas. Nuestros resultados muestran que la quelación de hierro con deferiprona aumentó significativamente la acumulación nuclear de Nrf2, un factor de transcripción que regula la expresión de enzimas antioxidantes. Esto llevó a una mayor capacidad antioxidante, una reducción en la producción de especies reactivas de oxígeno y una mejora en la función bioenergética mitocondrial en ratas diabéticas. Sin embargo, la quelación crónica de hierro condujo a una alteración de la respiración mitocondrial y un aumento del estrés oxidativo en ratas no diabéticas. En conclusión, nuestros hallazgos sugieren que la quelación de hierro con deferiprona protege la bioenergética mitocondrial y mitiga el estrés oxidativo en la corteza renal, involucrando la vía NRF2 en la diabetes tipo 2.



Contents lists available at ScienceDirect

Mitochondrion

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/mito](http://www.elsevier.com/locate/mito)

Original Research Article

## Iron chelation mitigates mitochondrial dysfunction and oxidative stress by enhancing nrf2-mediated antioxidant responses in the renal cortex of a murine model of type 2 diabetes



Donovan J. Peña-Montes<sup>a</sup>, Maribel Huerta-Cervantes<sup>b</sup>, Héctor Riveros-Rosas<sup>c</sup>, Salvador Manzo-Avalos<sup>a</sup>, Asdrubal Aguilera-Méndez<sup>a</sup>, Miguel Huerta<sup>d</sup>, Xóchitl Trujillo<sup>d</sup>, Christian Cortés-Rojo<sup>a</sup>, Rocío Montoya-Pérez<sup>a</sup>, Rafael Salgado-Garciglia<sup>a</sup>, Alfredo Saavedra-Molina<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Mexico

<sup>b</sup> Centro Universitario de los Lagos, Universidad de Guadalajara, Mexico

<sup>c</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

<sup>d</sup> Centro Universitario de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Colima, Mexico

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Type 2 diabetes  
Mitochondrial dysfunction  
Oxidative distress  
Ferroptosis, iron chelation  
Iron

## ABSTRACT

Renal iron overload is a common complication of diabetes that leads to oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the kidneys. This study investigated the effects of iron chelation using deferiprone on mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the renal cortex of a murine model of type 2 diabetes. Diabetic rats were treated with deferiprone (50 mg/kg BW) for 16 weeks. Our results show that iron chelation with deferiprone significantly increased the nuclear accumulation of Nrf2, a transcription factor that regulates the expression of antioxidant enzymes. This led to enhanced antioxidant capacity, reduced production of reactive oxygen species, and improved mitochondrial bioenergetic function in diabetic rats. However, chronic iron chelation led to altered mitochondrial respiration and increased oxidative stress in non-diabetic rats. In conclusion, our findings suggest that iron chelation with deferiprone protects mitochondrial bioenergetics and mitigates oxidative stress in the renal cortex, involving the NRF2 pathway in type 2 diabetes.

## 1. Introduction

Diabetes encompasses a group of chronic endocrine and metabolic diseases characterized by persistent hyperglycemia resulting from insulin resistance and/or deficiencies in insulin secretion due to dysfunction of pancreatic  $\beta$ -cells (International Diabetes Federation (IDF), 2021; American Diabetes Association, 2022). The proportion of individuals affected by diabetes, particularly type 2 diabetes (T2D), has dramatically increased over the last few decades, accounting for approximately 90–95 % of the 536.6 million registered cases, and is one of the leading causes of death worldwide (IDF, 2021). Both hyperglycemia and insulin resistance have negative effects on various tissues and organs, leading to complications (Jellinger, 2009). Hyperglycemia induces oxidative distress, mitochondrial dysfunction, and enhanced production of reactive oxygen species (ROS), leading to endothelial

dysfunction and vascular complications (Forbes et al., 2008; Forbes and Thorburn, 2018). Mitochondrial dysfunction is a key factor in the development of diabetic complications, such as diabetic nephropathy (Forbes and Thorburn, 2018; Natesan and Kim, 2021). Diabetic nephropathy (DN), also known as diabetic kidney disease (DKD), is one of the principals and most significant long-term complications in patients with diabetes, owing to its high morbidity (40 % in patients with T2D) and mortality, according to the IDF Diabetes and Kidney Disease Report (IDF, 2023). DKD arises from a series of metabolic, hemodynamic, and inflammatory changes in the kidneys in the diabetic milieu, resulting in glomerular sclerosis and fibrosis (Giunti et al., 2006; Alicic et al., 2017). DKD is characterized by albuminuria and impaired glomerular filtration rate, which are the main causes of chronic kidney disease and end-stage renal disease in North American countries, including Mexico (Agudelo-Botero et al., 2020; IDF, 2023). Mitochondrial oxidative distress and

\* Corresponding author at: Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Mexico.  
E-mail address: [francisco.saavedra@umich.mx](mailto:francisco.saavedra@umich.mx) (A. Saavedra-Molina).

<https://doi.org/10.1016/j.mito.2024.101937>

Received 2 April 2024; Received in revised form 20 June 2024; Accepted 10 July 2024

Available online 14 July 2024

1567-7249/© 2024 Elsevier B.V. and Mitochondria Research Society. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

dysfunction in the renal cortex play crucial roles in the development of diabetic nephropathy (Zeni et al., 2017; Forbes and Thorburn, 2018). Therefore, targeting mitochondrial dysfunction and oxidative distress may be a promising therapeutic strategy for the prevention and treatment of diabetic complications (Zhang et al., 2023). In addition to the alterations in carbohydrate, lipid, and protein metabolism observed in diabetes, recent evidence suggests that the metabolism of other nutrients, including iron, is disrupted in individuals with diabetes (Swaminathan et al., 2007; Andrew et al., 2015; Venkatesan et al., 2021). Iron is an essential element for life that plays crucial roles in various biological processes. However, its reactive nature can be potentially harmful to cells, particularly via ROS production and oxidative stress (Dixon & Stockwell, 2013). Iron overload has been frequently observed in T2D in various organs and tissues, including the kidneys (Geng et al., 2022; Lopez et al., 2022). However, the pathways underlying iron accumulation in T2D are still not fully understood. Wang et al. (2014) demonstrated that insulin deficiency and a high-fat diet significantly reduced hepcidin expression, leading to high levels of body iron. This indicates that insulin plays an important role in iron overload in T2D by regulating hepcidin expression through the activation of STAT3 via the extracellular signal-related kinase (ERK) pathway. However, it should be noted that iron accumulation may be at least partially attributed to the insulin-mediated regulation of hepcidin expression, because hepcidin regulation also involves other mechanisms (Ganz and Nemeth, 2012; Ambachew and Biadgo, 2017). Furthermore, growing evidence has implicated ferroptosis, a form of regulated cell death characterized by iron-dependent lipid peroxidation, in the pathophysiology of diabetes and its complications, including DKD (Dixon et al., 2012; Sha et al., 2021; Mengstie et al., 2023). Iron overload is associated with increased ROS production and mitochondrial dysfunction in various diseases, and iron chelation improves oxidative stress and protects against complications (Urrutia et al., 2014; Rouault, 2016). Previous findings from our laboratory have demonstrated that reducing dietary iron intake can result in an enhanced redox state in various tissues, including the skeletal muscle and kidneys, in streptozotocin-induced diabetic rats (Peña-Montes et al., 2020; Vargas-Vargas et al., 2022). Previous studies have demonstrated the potential benefits of the iron chelator deferiprone in diabetes, including improved renal function, reduced proteinuria, and decreased inflammation (Rajapurkar et al., 2013; Zou et al., 2017). Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) is a transcription factor that regulates the expression of antioxidant enzymes and plays a critical role in the cellular defense against oxidative stress and in iron metabolism (Ruiz et al., 2013; David et al., 2017; Kerins & Ooi, 2018). Nrf2 activation enhances the expression of antioxidant enzymes and reduces oxidative distress in various diseases, including T2D (David et al., 2017). In addition, Nrf2 controls cellular iron levels by enhancing the production of ferritin (FTL and FTH1), which helps decrease the labile iron pool and provides protection against ferroptosis (Kerins & Ooi, 2018). However, the underlying mechanisms, particularly those involved in mitochondrial function and oxidative distress, have not been extensively explored. This study aimed to examine the effect of iron chelation with deferiprone on mitochondrial function and the Nrf2/KEAP1-mediated oxidative distress response in the renal cortex of rats with type 2 diabetes induced by a high-fat diet and low-dose streptozotocin.

## 2. Material and methods

In this study, male Wistar rats (12 weeks, 350–400 g) were used. The rats were generously donated by Dr. Esther Cortés-Olvera and Dr. Miguel López-Vázquez from the Center for Biomedical Research of Michoacán of the Mexican Institute of Social Security (CIBIMI-IMSS). The rats were housed under standard environmental conditions, with a 12-h light/dark cycle at 25 °C with ad libitum access to food and water. All procedures were approved by the Bioethics Committee of the Chemical-Biological Research Institute and were conducted in accordance with the guidelines of the Official Mexican Standard NOM-062-

ZOO-1999 “Technical Specifications for the Production, Care, and Use of Laboratory Animals”.

### 2.1. Experimental design

The rats were divided into four groups: control, standard diet [calories provided by 1 g of chow: 8.6 % total fat (15 % saturated fat, 35 % monounsaturated fat, and 50 % polyunsaturated fat), 62.2 % carbohydrates, and 29.2 % protein] (8.6 % fat, 62.2 % carbohydrates, and 29.2 % protein) (Nutricubos®, Agribands Purina, MX); diabetic (high-fat diet plus streptozotocin); diabetic (high-fat diet and streptozotocin) plus oral iron chelator deferiprone (50 mg/Kg of BW), and normoglycemic/healthy plus oral iron chelator deferiprone group (50 mg/Kg of BW). Both diabetic groups were fed a high-fat diet based on lard [calories provided by 1 g of chow: 47 % total fat (27.2 % saturated fat, 35.3 % monounsaturated fat, and 35.7 % polyunsaturated fat, 1.8 % cholesterol), 32 % carbohydrates, and 21 % protein] for 6 weeks. After the 6-week period, an oral glucose tolerance test was performed (2 g glucose/kg BW after an 8-h fast) using a glucometer (Accu-Chek® Performa, Roche, DE). Only animals with blood glucose levels  $\geq 140$  mg/dL 2 h after the test were considered to have impaired glucose control and two intraperitoneal injections of streptozotocin were administered (25 mg/kg BW) with a one-week interval between the injections. Five days after the streptozotocin injection, glucose levels were measured, and only subjects with blood glucose levels  $\geq 200$  mg/dL were considered diabetic. The groups were orally administered the iron chelation treatment deferiprone (cat. no. 379409; Sigma-Aldrich, USA) via a cannula at a dose of 50 mg/kg BW daily for 16 weeks. The control and diabetic groups were administered vehicle (20 % glycerol). At the end of the treatment, the animals were euthanized by decapitation and blood was collected for subsequent serum analysis. Each group comprised eight individuals (n = 8).

### 2.2. Isolation and purification of mitochondria

Experimental animals were sacrificed by decapitation; the kidneys immediately removed and placed in a Petri dish containing isolation buffer at 4 °C (220 mM mannitol, 70 mM sucrose, 2 mM 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS), and 1 mM ethyleneglycol-bis(2-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), pH 7.4, and renal cortex was carefully dissected from both kidneys under a magnifying glass. The tissue was washed with the same buffer to remove excess blood and homogenized using a Potter-Elvehjem-type tissue homogenizer at 500 rpm. An aliquot of the homogenate was separated to isolate the cytosolic and nuclear fractions. Mitochondria were isolated by differential centrifugation according to the Saavedra-Molina and Devlin (1997) methods and purified using a discontinuous Percoll gradient. Mitochondria were preserved in the isolation buffer without EGTA. The concentration of mitochondrial proteins in the samples was quantified using the biuret method (Gornall et al., 1949). All reagents and buffers were prepared using deionized water (diH<sub>2</sub>O) (resistivity  $\approx 18.2$  M $\Omega$ -cm). Freshly isolated mitochondrial samples were used immediately, and a portion was aliquoted and stored at  $-70$  °C for subsequent use.

### 2.3. Mitochondrial membrane potential

The determination of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) was performed fluorometrically using the fluorescent probe safranin according to Figueira et al. (2012). First, a suspension was prepared with freshly isolated mitochondria, and 1 mg of mitochondrial protein was resuspended in buffer (250 mM sucrose, 10 mM HEPES, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 1.4 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4) and mixed with 7.5  $\mu$ M safranin. Baseline fluorescence was recorded at excitation and emission wavelengths of 495 nm and 580 nm, respectively, at a thermostat-regulated temperature of 25 °C. Subsequently, respiratory substrates linked to NADH (glutamate plus malate, 5 mM + 5 mM) and FADH (succinate, 5 mM)

were added, and fluorescence quenching was recorded until a steady-state signal was established. Then, 1  $\mu\text{M}$  of the depolarizing protonophore carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP) was added to dissipate the  $\Delta\psi\text{m}$ .

#### 2.4. Mitochondrial respiration

Mitochondrial respiration was measured using a Clark-type electrode connected to an YSI 5300A oxygen monitor (Li and Graham, 2012). Freshly isolated mitochondrial samples were resuspended in a respiration buffer containing 10 mM HEPES, 100 mM KCl, 1.4 mM  $\text{MgCl}_2$ , and 3 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  at pH 7.4 and kept at 25 °C. Basal mitochondrial respiration was measured in the presence of respiratory substrates linked to NADH (glutamate plus malate, 5 mM + 5 mM) or  $\text{FADH}_2$  (succinate, 10 mM + 1  $\mu\text{M}$  rotenone), in the absence of ADP. State 3 respiration, or coupled respiration, was stimulated by the addition of 200  $\mu\text{M}$  ADP (adenosine 5'-diphosphate disodium salt) to promote ATP synthesis, followed by the inhibition of ATP synthase with 2  $\mu\text{g}$  oligomycin to induce state 4 Omy respiration. Non-coupled respiration was measured in the presence of 1  $\mu\text{M}$  CCCP for maximum electron transport through the respiratory chain. Residual oxygen consumption was measured by adding 2  $\mu\text{M}$  antimycin A. The respiratory control ratio (RCR) was calculated as the ratio of the state 3 to state 4 Omy respiration rates.

#### 2.5. Reactive oxygen species assay

The generation of reactive oxygen species (ROS) was assessed according to Batandier et al. (2006), with some modifications, using freshly isolated mitochondria. Mitochondrial protein (1.0 mg) was resuspended in a cold respiration buffer (10 mM HEPES, 100 mM KCl, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , and 3 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) at pH 7.4 and incubated for 10 min with the permeable probe 2',7'-dichlorofluorescein 3',6'-diacetate (12.5  $\mu\text{M}$ ) at 4 °C and 80 rpm. Subsequently, the samples were equilibrated at a thermostat-controlled temperature of 25 °C, and the fluorescence trace was initiated at excitation and emission wavelengths of 485 nm and 520 nm, respectively. To evaluate ROS generation, substrates linked to NADH, (glutamate plus malate, 5 mM + 5 mM),  $\text{FADH}_2$  (succinate 10 mM) were used.

#### 2.6. Evaluation of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities

The enzymatic activities of the electron transport chain complexes were assessed following the protocols described by Peña-Montes et al. (2020) and Spinazzi et al. (2012). Activity was measured in permeabilized mitochondria using three consecutive freeze-thaw cycles followed by osmotic shock. The activity of mitochondrial complex I was determined as the NADH:decylubiquinone oxidoreductase ratio. Briefly, 100  $\mu\text{g}$  of mitochondrial protein was mixed and incubated for 7 min in 50 mM potassium phosphate buffer (KPB) at pH 7.5 (KPB), 100  $\mu\text{g}$  of bovine serum albumin, 2.5  $\mu\text{M}$  antimycin A, and 500  $\mu\text{M}$  KCN. The catalytic activity was initiated by adding 100  $\mu\text{M}$  NADH in the presence of 100  $\mu\text{M}$  decylubiquinone, and the decrease in NADH fluorescence was recorded spectrofluorometrically at excitation and emission wavelengths of 352 nm and 464 nm, respectively, using a Shimadzu RF-5301PC spectrophotometer. The activity of the mitochondrial complex II was determined as the succinate:2,6-dichlorophenol-indophenol (DCIP) oxidoreductase ratio. Briefly, 100  $\mu\text{g}$  of mitochondrial protein was mixed and incubated for 5 min in 50 mM KPB, 100  $\mu\text{g}$  of bovine serum albumin, 20 mM succinate, 10  $\mu\text{M}$  rotenone, 2.5  $\mu\text{M}$  antimycin A, and 0.5 mM KCN. The activity was measured spectrophotometrically in the presence of 80  $\mu\text{M}$  DCIP at 600 nm for 5 min using a Perkin-Elmer UV/Vis Lambda 18 spectrophotometer. Complex III was assayed as the decylubiquinol:cytochrome *c* oxidoreductase ratio. Briefly, 100  $\mu\text{g}$  of mitochondrial protein was mixed and incubated for 3 min with 50 mM KPB, 0.0125 % Tween-20, 10  $\mu\text{M}$  rotenone, 500  $\mu\text{M}$  2-thienyltrifluoroacetone, 500  $\mu\text{M}$  KCN, 150  $\mu\text{M}$  disodium EDTA, and 100  $\mu\text{g}$  bovine serum

albumin. The activity was recorded after the addition of 250  $\mu\text{g}$  of oxidized cytochrome *c*, followed by the addition of 100  $\mu\text{M}$  decylubiquinol (reduced with potassium borohydride) at 550 nm. Complex IV activity was determined as cytochrome *c* oxidase activity; 50  $\mu\text{g}$  of mitochondrial protein was mixed and incubated for 3 min in 50 mM KPB supplemented with 10  $\mu\text{M}$  rotenone, 500  $\mu\text{M}$  2-thienyltrifluoroacetone, and 2.5  $\mu\text{M}$  antimycin A. Then, 200  $\mu\text{g}$  of reduced cytochrome *c* with sodium dithionite was added, and changes in absorbance were recorded at 550 nm. Independent assays were performed using specific inhibitors to estimate the enzymatic activity of each respiratory chain complex. Rotenone (10  $\mu\text{M}$ ) was used for complex I inhibition, 2-thienyltrifluoroacetone (500  $\mu\text{M}$ ) for complex II inhibition, antimycin A (2.5  $\mu\text{M}$ ) for complex III inhibition, and KCN (500  $\mu\text{M}$ ) for complex IV inhibition. All assays were performed at 30 °C.

#### 2.7. Mitochondrial swelling

Mitochondrial swelling was assessed by light scattering at 540 nm, according to the method of Aguilera-Aguirre et al. (2002) with slight modifications. Mitochondrial protein (1 mg/mL) was resuspended in a buffer containing 250 mM sucrose, 10 mM HEPES, 2 mM  $\text{H}_2\text{PO}_4$ , 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM glutamate, and 5 mM malate, at pH 7.4 and 37 °C. Changes in light scattering were monitored, and once optical density reached a stable baseline, 25  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  was added to induce mitochondrial swelling through the opening of the mitochondrial permeability transition pore. A separate assay was conducted by adding 1  $\mu\text{M}$  ruthenium red to inhibit the opening of the mitochondrial permeability transition pore via the mitochondrial calcium uniporter.

#### 2.8. Mitochondrial glutathione status and lipid-peroxidation levels

The mitochondrial glutathione status (total glutathione, oxidized glutathione (GSSG), and reduced glutathione (GSH)) was determined spectrophotometrically using the enzymatic recycling method with glutathione reductase, NADPH, and the chromogenic reagent 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) at 412 nm on a Perkin-Elmer UV/Vis Lambda 18 spectrophotometer, following the protocol described by Peña-Montes (2020). To release glutathione from the samples (2 mg of mitochondrial protein in 100 mM phosphate buffer, 5 mM disodium EDTA, 0.1 % Triton-X, and 27.5 mM 5-sulfosalicylic acid), a combination of sonication and freezing/thawing cycles was performed. The samples were then centrifuged at 5000 x g. For the measurement of total glutathione, 100  $\mu\text{L}$  of the resulting supernatant was mixed with 100 mM phosphate buffer, 5 mM disodium EDTA, 100 mU of glutathione reductase, and 100  $\mu\text{M}$  DTNB. The enzymatic reaction was initiated by adding 50  $\mu\text{M}$  NADPH, and the absorbance was recorded for 5 min at 30 °C. The derivatizing reagent 4-vinylpyridine (0.2 %) was used to determine oxidized glutathione. The concentration of GSH was calculated by subtracting the amount of GSSG from total glutathione. From these data, the GSH/GSSG ratio was calculated as an index of glutathione redox state. Lipid peroxidation was assayed using the thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) assay (Buege and Aust, 1978). Mitochondrial samples were filtered from the storage medium and resuspended in PBS (pH 7.4). The sample (0.5 mg) was mixed with 2.93 mM thiobarbituric acid, 92 mM trichloroacetic acid, 2.5 M, and 0.01 % butylated hydroxytoluene, and incubated in a boiling water bath for 20 min. The samples were centrifuged at 7500 rpm for 5 min at 25 °C, and the absorbance was measured at 532 nm.

#### 2.9. Glutathione peroxidase, glutathione reductase, and superoxide dismutase enzymatic activity

Glutathione peroxidase activity was assayed spectrofluorometrically according to the method described by Lawrence and Burk (1976) with some modifications. Glutathione reductase was assayed spectrofluorometrically according to the method described by Carlberg and

Mannervik (1985), with some modifications. Superoxide dismutase (SOD) was determined using a Sigma-Aldrich SOD assay kit-WST (19160) (Sigma, St. Louis, MO, USA) according to the manufacturer's instructions.

### 2.10. Western blot analysis

For the Western blot analysis, monoclonal or polyclonal antibodies, including anti-3-nitrotyrosine (sc-32757), anti-Nrf2 (sc-365949), anti- $\beta$ -tubulin (sc-55529), anti-HDAC1 (sc-81598), anti-Tom20 (sc-17764), anti-GPX 1/2 (sc-133160), anti-Keap1 (sc-514914), anti-GPX4 (sc-166570), anti-SIRT3 (sc-365175), anti-SOD1 (sc-271014), and anti-SOD2 (sc-30080) were used. A total of 60  $\mu$ g of different cellular fractions (cytosolic, mitochondrial, or nuclear) were resolved on SDS-PAGE gel and blotted onto a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane using wet transfer method. The blots were blocked with 5 % nonfat milk (Blotto, sc-2324) in TBS-T buffer (Tris-HCl, 150 mM NaCl, and 0.05 % Tween-20, pH 7.4) for 2 h. After blocking, the blots were washed three times with TBS-T and incubated overnight. After another three washes, the proteins bound to the antibodies were detected using a Western Blotting Luminol Reagent (sc-2048) after incubation with an HRP-conjugated secondary antibody (sc-2354, sc-516102, or sc-2357) on a ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad). Western blots were quantified using ImageJ software.

### 2.11. Serum parameters

Serum parameters were assayed using the following commercial kits: iron serum IRON-FZ (Spinreact, Spain), blood urea nitrogen (BUN) UREA-37 (Spinreact, Spain), and creatinine CREATININE-J (Spinreact, Spain), following the manufacturer's instructions.

### 2.12. Statistical analysis

All data were analyzed using GraphPad Prism software (version 9.5.1). The results are reported as mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M). Statistical analyses were performed using two-way analysis of variance (ANOVA). Statistical significance was set at  $p \leq 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Effects of diabetes and iron chelation in biometric and serum parameters

In this study, four experimental groups were used over a period of 16 weeks: control (Control); high-fat diet and streptozotocin without treatment (Diabetic); high-fat diet and streptozotocin treated with the iron chelator deferiprone at a dose of 50 mg/kg (Diab + Iron chelation); and normoglycemic/healthy treated with the iron chelator deferiprone at a dose of 50 mg/kg (Norm + Iron chelation). As shown in Table 1, the control group exhibited a body weight of 525  $\pm$  17 g and blood glucose levels of 95  $\pm$  1 mg/dL, whereas the diabetic group showed a significant decrease in body weight and hyperglycemic blood glucose levels of 485  $\pm$  15 mg/dL. Alterations in markers of renal function, including blood urea nitrogen (BUN) and creatinine levels, and hypertrophied kidneys were observed in the diabetic group compared to those in the control group, indicating potential renal impairment associated with diabetes as well as increased serum iron levels. Additionally, the diabetic group demonstrated glucose intolerance based on the glucose tolerance test compared to the control group ( $p = 0.0001$ ). Iron chelation under diabetic conditions effectively mitigated these abnormalities, leading to improvements in BUN, creatinine, and serum iron concentrations as well as a reduction in kidney hypertrophy. No changes in glucose intolerance or blood glucose levels were observed in response to iron chelation. No differences in glucose levels were observed between the Norm + Iron chelation and control groups. However, a slight but significant increase

**Table 1**

Biometric and serum parameters.

	Control	Diabetic	Diab + Iron chelation	Norm + Iron chelation
Blood glucose [mg/dL]	95 $\pm$ 1 <sup>b</sup>	485 $\pm$ 15 <sup>a</sup>	464 $\pm$ 39 <sup>a</sup>	101 $\pm$ 3 <sup>b</sup>
Body weight (g)	525 $\pm$ 17 <sup>a</sup>	415 $\pm$ 21 <sup>b</sup>	416 $\pm$ 30 <sup>b</sup>	491 $\pm$ 6 <sup>a</sup>
Glucose tolerance test (area under the curve)	808 $\pm$ 29 <sup>b</sup>	3479 $\pm$ 93 <sup>a</sup>	3609 $\pm$ 64 <sup>a</sup>	799 $\pm$ 23 <sup>b</sup>
BUN [mg/dL]	20.6 $\pm$ 0.9 <sup>c</sup>	39.7 $\pm$ 3.5 <sup>a</sup>	29.3 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>	30.1 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>
Creatinine [mg/dL]	0.52 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>	2.48 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	1.1 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	0.74 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>
Serum Iron [ $\mu$ g/dL]	32.5 $\pm$ 0.82 <sup>b</sup>	66.4 $\pm$ 2.8 <sup>a</sup>	35.7 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>	17.8 $\pm$ 2.4 <sup>c</sup>
%Relative renal weight (kidneys/body weight)	100 $\pm$ 3 <sup>c</sup>	160 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	132 $\pm$ 7 <sup>b</sup>	104 $\pm$ 4 <sup>c</sup>

Note: Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. Differences between groups were determined using two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ). Groups that share a letter are not significantly different from each other.

in BUN and creatinine levels was observed in the Norm + iron chelation group compared to that in the control group, indicating potential renal changes associated with iron chelation therapy under normoglycemic conditions. Additionally, a significant decrease in serum iron levels was noted in the Norm + Iron chelation group compared to that in the control group, suggesting an effect of iron chelation therapy on iron metabolism, even in non-diabetic conditions.

### 3.2. Effects of iron chelation on mitochondrial respiration

The mitochondrial respiration parameters are listed in Table 2. State 3 respiration with glutamate and malate (G + M) or succinate and rotenone (S + R) measured the maximal respiratory rate supported by NADH- or FADH<sub>2</sub>-like substrates, respectively. In the diabetic group, state 3 G + M was significantly lower than that in the control group ( $p = 0.0008$ ). A similar pattern was observed in state 3 with S + R ( $p = 0.0001$ ), indicating impaired mitochondrial function. Interestingly, iron chelation under diabetic conditions partially restored the respiratory capacity in state 3 with both substrates compared to the diabetic group (G + M: 61.5 %,  $p = 0.04$ ; S + R: 44.4 %,  $p = 0.018$ ). State 4 Omy respiration with G + M or S + R reflects the rate of proton leakage across the mitochondrial inner membrane. In the diabetic group, state 4 respiration for both substrates were significantly higher than that in the control group. Iron chelation under diabetic conditions resulted in a statistically significant reduction in state 4 respiration only for G + M when compared to the diabetic group (G + M:  $p = 0.001$ ). The non-coupled state induced by CCCP represents the maximal respiratory rate in the absence of ATP synthesis. Diabetic conditions led to significant reductions in non-coupled respiration for both substrates compared to the control group (G + M:  $p < 0.001$ , c; S + R:  $p < 0.001$ ). Iron chelation under diabetic conditions partially restored non-coupled respiration compared to that in the diabetic group, although it remained below the control levels. The respiratory control ratio (RCR) was calculated as the ratio of state 3 to state 4 respiration, indicating the coupling efficiency of oxidative phosphorylation. The diabetic group exhibited a substantial decrease in the rate of oxygen consumption in state 3 and an increase in state 4 with oligomycin, resulting in a significantly lower RCR compared to the control group, indicative of impaired mitochondrial function (G + M:  $p < 0.001$ ; S + R:  $p < 0.001$ ). Iron chelation under diabetic conditions resulted in improvements in RCR and partially restored mitochondrial function (G + M and S + R vs. diabetic group, 2.5 times and 1.6 times, respectively). In addition, the

**Table 2**  
Effects of iron chelation on mitochondrial respiration in the renal cortex.

	Control	Diabetic	Diab + Iron chelation	Norm + Iron chelation
<b>NADH linked:</b>				
Glutamate + Malate (G + M)				
State 3 G + M (nmol O <sub>2</sub> /min/mg prot.)	185.7 ± 5.6 <sup>a</sup>	96.6 ± 13.5 <sup>b</sup>	155.2 ± 13.1 <sup>a</sup>	75.1 ± 18.2 <sup>b</sup>
State 4 <sub>omy</sub> G + M (nmol O <sub>2</sub> /min/mg prot.)	20.7 ± 1.4 <sup>c</sup>	57.3 ± 7.1 <sup>a</sup>	34.0 ± 1.3 <sup>b</sup>	18.3 ± 2.2 <sup>a</sup>
Non-coupled state (CCCP) G + M (nmol O <sub>2</sub> /min/mg prot.)	183.1 ± 4.4 <sup>a</sup>	94.1 ± 6.9 <sup>c</sup>	138.3 ± 12 <sup>b</sup>	61.9 ± 1.7 <sup>d</sup>
RCR (state 3 / state 4 <sub>omy</sub> ) G + M	9.4 ± 0.77 <sup>a</sup>	1.8 ± 0.39 <sup>c</sup>	4.6 ± 0.46 <sup>b</sup>	4.1 ± 0.74 <sup>bc</sup>
<b>FADH<sub>2</sub> linked:</b>				
Succinate + Rotenone S + R				
State 3 S + R (nmol O <sub>2</sub> /min/mg prot.)	313.6 ± 12.8 <sup>a</sup>	166.9 ± 8.7 <sup>c</sup>	241.1 ± 13.6 <sup>b</sup>	296.2 ± 24.6 <sup>ab</sup>
State 4 <sub>omy</sub> S + R (nmol O <sub>2</sub> /min/mg prot.)	45.1 ± 2.7 <sup>b</sup>	66.2 ± 6.4 <sup>a</sup>	60.1 ± 3.9 <sup>ab</sup>	58.3 ± 3.5 <sup>ab</sup>
Non-coupled state (CCCP) S + R (nmol O <sub>2</sub> /min/mg prot.)	332.9 ± 10.8 <sup>a</sup>	191.3 ± 16.0 <sup>c</sup>	252.6 ± 11.8 <sup>b</sup>	275.3 ± 14.1 <sup>b</sup>
RCR S + R	7.2 ± 0.59 <sup>a</sup>	2.6 ± 0.23 <sup>c</sup>	4.1 ± 0.29 <sup>bc</sup>	5.1 ± 0.34 <sup>b</sup>

Note: Results are expressed as the mean ± S.E.M. Differences between groups were determined using two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Different letters indicate significant differences (p < 0.05). Groups that share a letter are not significantly different from each other.

normoglycemic group with iron chelation showed notable differences in mitochondrial respiration compared to the control group. Although both groups shared a normoglycemic baseline (Table 1), the introduction of iron chelation had differential effects on mitochondrial function, as evidenced by the measurements of state 3 respiration and the non-coupled state for both NADH- and FADH<sub>2</sub>-linked substrates, as shown in Table 3. While the control group maintained relatively stable levels of state 3 respiration and a non-coupled state between substrates, the normoglycemic group with iron chelation exhibited significant variability in these measurements between substrates. These results suggest a potential selective modulation of mitochondrial function by iron chelation, implying a substrate-specific adaptive response to iron depletion through chelation.

### 3.3. Effect of iron chelation on mitochondrial membrane potential and mitochondrial swelling

The diabetic group exhibited a 38.9 % reduction in mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) compared to that in the control group, as illustrated in Fig. 1a. This finding indicated a significant alteration in mitochondrial function associated with diabetes. Moreover, during the experiment, the addition of increasing concentrations of Ca<sup>2+</sup> (5  $\mu$ M per pulse) to the control group resulted only in a slight  $\Delta\Psi_m$  loss, which remained stable until reaching 15  $\mu$ M of Ca<sup>2+</sup>. In contrast, the diabetic group exhibited depolarization, suggesting an increased susceptibility to calcium overload in the mitochondria. The mitochondrial swelling assay revealed that the diabetic group exhibited increased swelling following the addition of calcium compared to the control group, as shown in Fig. 1b. This finding complements the observation of decreased  $\Delta\Psi_m$  in the diabetic group, indicating greater permeability of the mitochondrial membrane. However, deferiprone treatment in the diabetic group

**Table 3**  
Glutathione status and antioxidant enzymes in renal cortex mitochondria.

	Control	Diabetic	Diab + Iron chelation	Norm + Iron chelation
Total Glutathione [ $\mu$ moles /mg prot.]	0.76 ± 0.01 <sup>bc</sup>	0.69 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.82 ± 0.04 <sup>ab</sup>	0.89 ± 0.02 <sup>a</sup>
GSH (reduced) [ $\mu$ moles /mg prot.]	0.65 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.52 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.70 ± 0.03 <sup>ab</sup>	0.76 ± 0.02 <sup>a</sup>
GSSG (oxidized) [ $\mu$ moles /mg prot.]	0.09 ± 0.007 <sup>c</sup>	0.16 ± 0.004 <sup>a</sup>	0.11 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.15 ± 0.004 <sup>b</sup>
GSH/GSSG ratio	7.53 ± 0.9 <sup>a</sup>	3.08 ± 0.1 <sup>c</sup>	6.37 ± 0.7 <sup>ab</sup>	4.8 ± 0.3 <sup>bc</sup>
Glutathione reductase activity (U <sup>a</sup> /mg prot.)	125 ± 3.1 <sup>a</sup>	100 ± 3.6 <sup>b</sup>	124 ± 6.9 <sup>a</sup>	132 ± 2.7 <sup>a</sup>
Glutathione peroxidase activity (U <sup>a</sup> /mg prot.)	122 ± 4.5 <sup>a</sup>	92 ± 5.7 <sup>c</sup>	110 ± 1.8 <sup>b</sup>	99 ± 3.1 <sup>bc</sup>
Superoxide dismutase activity (U <sup>a</sup> /mg prot.)	201 ± 5.7 <sup>b</sup>	143 ± 7.5 <sup>c</sup>	229 ± 5.2 <sup>b</sup>	338 ± 17.7 <sup>a</sup>

Note: Results are expressed as the mean ± S.E.M. Differences between groups were determined using two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Different letters indicate significant differences (p < 0.05). Groups that share a letter are not significantly different from each other.

significantly attenuated Ca<sup>2+</sup> -induced mitochondrial swelling compared to the untreated diabetic group. This protective effect of deferiprone suggests an improvement in mitochondrial membrane integrity and stability. These observations are closely related to previous findings on mitochondrial respiration, in which the diabetic group exhibited significant impairment (Table 2). Remarkably, the normoglycemic group treated with the iron chelator also demonstrated increased mitochondrial swelling in response to calcium compared to the control group. This observation further emphasizes the importance of iron in maintaining mitochondrial membrane stability and resistance to calcium-induced stress, even in non-diabetic conditions.

### 3.4. Effects of iron chelation on mitochondrial respiratory chain enzymatic activities in the renal cortex

As shown in Fig. 2A-D, the diabetic group had a significant decrease of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities compared to those in the control group (complex I, NADH:decylubiquinone oxidoreductase (p = 0.005), complex II, succinate:DCIP oxidoreductase (p < 0.001), complex III, decylubiquinol:cytochrome c oxidoreductase (p = 0.007), complex IV, cytochrome c oxidase (p = 0.009)). Iron chelation in the diabetic condition showed a significant partial improvement in the dysfunction of the electron transport chain complexes (complex I (p = 0.003), complex II (p = 0.0017), and complex III (p = 0.012)), compared to the untreated diabetic group, with the exception of complex IV, where only a slight increase in activity was observed without statistical significance compared to the diabetic group (p = 0.75). Furthermore, the normoglycemic group receiving chelation treatment exhibited disruptions in the function of mitochondrial complexes compared to those in the control group: complex I (p = 0.014), complex II (p = 0.001), and complex III (p = 0.0409), but not in complex IV (p = 0.095), indicating that the depletion of iron by chelation treatment might affect complex activities in normoglycemic individuals compared to the control group, emphasizing the importance of iron in mitochondrial function.

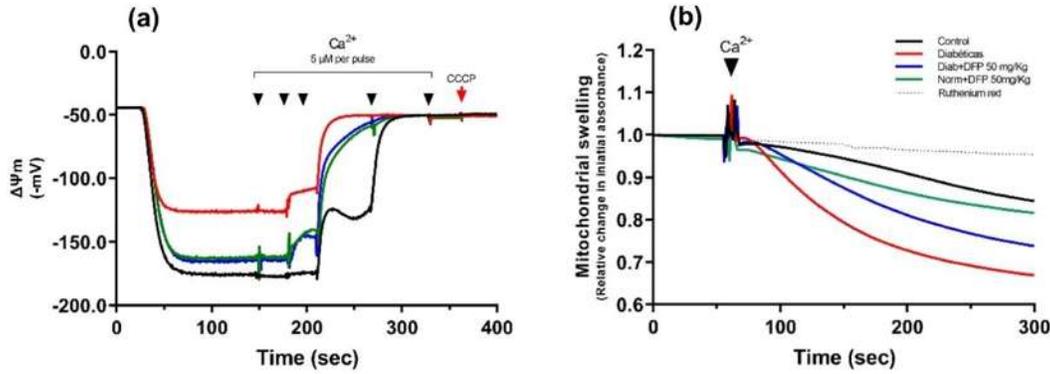


Fig. 1. Effect of iron chelation on mitochondrial membrane potential and mitochondrial swelling in renal cortex. (a) Representative  $\Delta\Psi_m$  traces. (b) Representative mitochondrial swelling traces of control (black), diabetic (red), diab + iron chelation (blue) and norm + iron chelation (green) and (dotted) ruthenium red, an inhibitor of  $Ca^{2+}$  transport. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

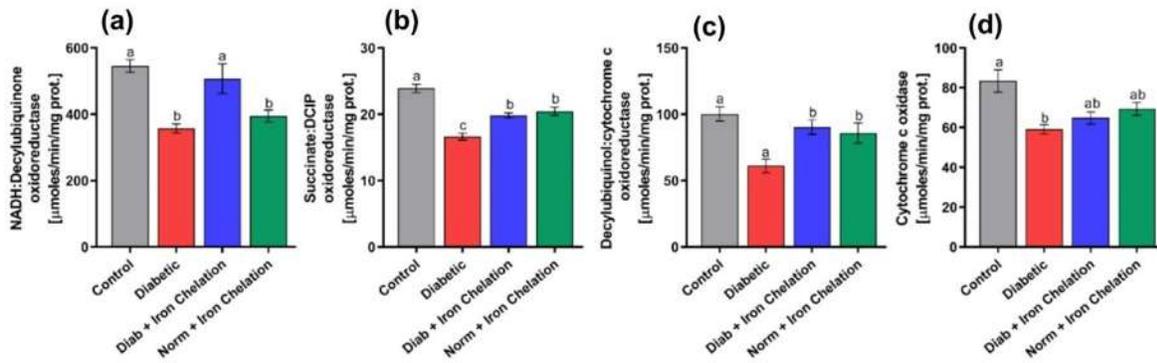


Fig. 2. Effects of iron chelation on mitochondrial respiratory chain enzymatic activities in renal cortex. (a) Mitochondrial complex I (NADH:Decylubiquinone oxidoreductase). (b) Mitochondrial complex II (Succinate:DCIP oxidoreductase). (c) Mitochondrial complex III (Decylubiquinol:cytochrome c oxidoreductase). (d) Complex IV (cytochrome c oxidase). Differences between groups were determined using two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ). Groups that share a letter are not significantly different from each other.

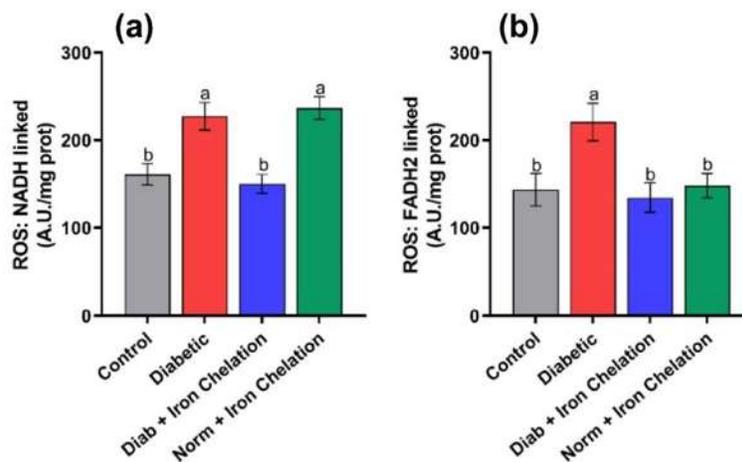


Fig. 3. Effects of iron chelation on mitochondrial reactive oxygen species generation in renal cortex. (a) NADH linked ROS (5 mM glutamate + 5 mM malate). (b) FADH2 linked ROS (10 mM succinate). Data is expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. Differences between groups were determined using two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ). Groups that share a letter are not significantly different from each other.

### 3.5. Effects of iron chelation on mitochondrial reactive oxygen species generation in the renal cortex

Analysis of mitochondria from the renal cortex revealed significant alterations in reactive oxygen species (ROS) production, as shown in Fig. 3. Comparing the diabetic group to control, both NADH- and FADH<sub>2</sub>-linked ROS levels increased significantly, indicating increased oxidative distress in diabetes (NADH:  $p = 0.0056$ , FADH<sub>2</sub>:  $p = 0.029$ ). This increase may result from metabolic dysfunction and impaired antioxidant defense. In the diabetic group treated with iron chelation, ROS levels decreased significantly for both substrates (NADH,  $p = 0.0012$ ; FADH<sub>2</sub>,  $p = 0.0138$ ). This suggests a protective effect by mitigating iron-mediated oxidative distress. In addition, a significant increase in ROS levels was observed in the Norm + Iron chelation group vs. the control, specifically in the NADH-linked substrate (+47.2%,  $p = 0.0033$ ). However, no significant differences were observed for the FADH<sub>2</sub>-linked substrate, suggesting a differential effect. Considering that complex I of the mitochondrial electron transport chain utilizes NADH as a substrate, its dysfunction due to iron deprivation shown in Fig. 2a may have contributed to the observed increase in ROS production.

### 3.6. Effects of iron chelation on glutathione status and antioxidant enzymes in the renal cortex mitochondria

Comparison between the control and diabetic groups revealed significant alterations in glutathione status and associated enzymatic activities. While total glutathione levels were not affected ( $p = 0.40$ ). The GSH levels were significantly lower in the diabetic group ( $p = 0.0125$ ) than in the control group, as illustrated in Table 3. Additionally, GSSG levels were significantly elevated in the diabetic group compared to those in the control group ( $p = 0.001$ ). Consequently, the GSH/GSSG ratio, reflecting cellular redox balance, was substantially reduced in the diabetic group ( $3.08 \pm 0.1$ ) compared to that in the control group ( $7.53 \pm 0.9$ ). Furthermore, the activities of glutathione reductase and glutathione peroxidase were significantly lower in the diabetic group than in the control group. The diabetic group treated with iron chelation therapy exhibited partial restoration of glutathione levels and enzymatic

activity. While total glutathione levels increased in the diabetic + iron chelation group compared to those in the diabetic group ( $p = 0.0143$ ), GSH levels also showed a significant increase ( $p = 0.0004$ ), accompanied by a 40% decrease in GSSG levels ( $p = 0.0001$ ). Consequently, the GSH/GSSG ratio was partially restored in the diabetic + iron chelation group compared to the diabetic group, suggesting the mitigation of oxidative distress. Compared with the control group, the normoglycemic + iron chelation group exhibited a significantly lower GSH/GSSG ratio ( $p = 0.023$ ). This decrease occurred despite the observed increases in GSH and total glutathione levels ( $p = 0.0118$  and  $p = 0.004$ , respectively), which were offset by a concurrent increase in GSSG levels ( $p = 0.001$ ). These findings suggest a disruption in the redox balance despite increased antioxidant reserves. Additionally, the glutathione peroxidase activity was significantly reduced ( $p = 0.0007$ ), indicating impaired antioxidant defense mechanisms. However, no significant differences were observed in glutathione reductase activity ( $p = 0.22$ ). The superoxide dismutase (SOD) activity shown in Table 3 was significantly lower in the diabetic group than in the control ( $p = 0.0025$ ), indicating increased oxidative distress. Iron chelation under diabetic conditions led to a notable increase in SOD activity ( $p < 0.0001$ ), suggesting a potential decrease in oxidative distress. Conversely, the normoglycemic + iron chelation group exhibited significantly higher SOD activity than the control group ( $p < 0.0001$ ).

### 3.7. Effects of iron chelation on oxidative damages in mitochondria

Western blot analysis of the oxidative distress biomarker 3-nitrotyrosine, as shown in Fig. 4a and b, demonstrated significant alterations among the experimental groups. 3-nitrotyrosine is a post-translational modification resulting from the reaction of tyrosine residues with reactive nitrogen species, particularly peroxynitrite, which is formed by the reaction of nitric oxide with superoxide radicals. Compared with controls, the diabetic group exhibited a 48.73% increase in 3-nitrotyrosine levels ( $p < 0.0001$ ), indicative of elevated oxidative distress attributed to diabetic pathophysiology. Iron chelation therapy in the diabetic group effectively mitigated this increase by 39.81% ( $p < 0.0001$ ) compared with the diabetic group without treatment. However, the norm + iron chelation group displayed higher 3-nitrotyrosine levels

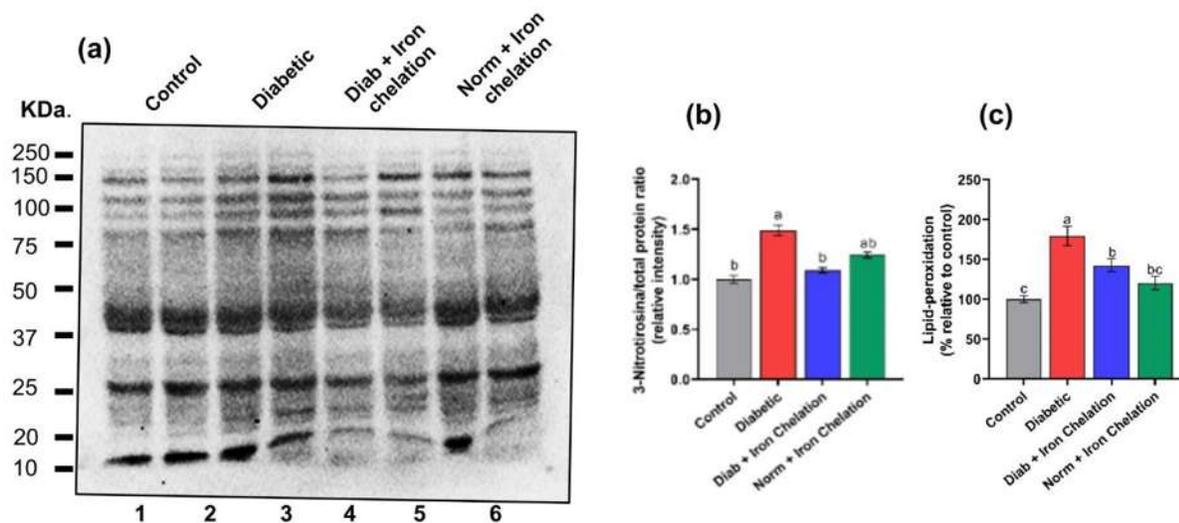


Fig. 4. Effects of iron chelation on oxidative damage biomarkers in renal cortex mitochondria. (a) Representative Western blot of anti-3-nitrotyrosine. Lanes 1–2 correspond to independent control rats, lanes 3–4 correspond to independent diabetic rats, lanes 5–6 correspond to independent diabetic + iron chelation rats and lanes 7–8 correspond to independent normal + iron chelation rats. (b) Corresponding 3-nitrotyrosine densitometry analysis. (c) Lipid-peroxidation (TBARS) levels in mitochondria. Data is expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. Differences between groups were determined using two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ). Groups that share a letter are not significantly different from each other.

induced by iron depletion than the control group, representing a relative increase of 24.33 %. In the diabetic group, lipid-peroxidation levels were significantly elevated compared with those in the control group, indicating increased oxidative distress associated with diabetes ( $p < 0.0001$ ), as illustrated in Fig. 4c. In the diabetic + iron chelation group, lipid-peroxidation levels were significantly reduced vs. the diabetic group ( $p = 0.034$ ). This suggests that iron chelation effectively mitigated lipid peroxidation and oxidative damage under diabetic conditions. In contrast, no significant changes were observed in lipid peroxidation levels in the normoglycemic group treated with iron chelation compared to that in the control group.

3.8. Effects of iron chelation on the antioxidant system

Analysis of Keap1 levels revealed no significant differences among the experimental groups, as shown in Fig. 5a. Similarly, cytosolic Nrf2 levels showed no statistical variation across all groups (Fig. 5a). However, in terms of nuclear translocated Nrf2, notable differences were observed. When comparing the diabetic group to the diab + iron chelation group, a significant increase in Nrf2 nuclear translocation was

noted ( $p = 0.0158$ ), as well as vs. the control group ( $p = 0.0042$ ) (Fig. 5b). Similarly, the normoglycemic + iron chelation group showed a significant increase in the levels of nuclear-translocated Nrf2 compared to those in the control group ( $p = 0.0002$ ), indicating a potential effect of iron chelation on promoting Nrf2 nuclear translocation under diabetic and non-diabetic conditions. Next, we evaluated antioxidant enzyme expression in the mitochondria and observed a significant increase in the expression of SOD2, GPX1/2, and GPX4 in the diabetic + iron chelation group compared to the diabetic group (SOD2:  $p = 0.0105$ ; GPX1/2:  $p = 0.028$ ; GPX4:  $p = 0.0040$ ) (Fig. 5c). This increase in expression was consistent with the corresponding changes observed in the activities of these enzymes (Table 3). These results suggest the potential therapeutic effect of iron chelation in enhancing antioxidant defenses in diabetes. Furthermore, this upregulation was directly associated with an increase in the activation of the Keap1-Nrf2 pathway, likely due to the translocation of Nrf2 to the nucleus, further supporting the protective role of iron chelation in the management of oxidative distress. Finally, the results obtained from the expression of SIRT3, a pivotal regulator of mitochondrial homeostasis, showed a decrease in the diabetic group compared to those in the control group ( $p = 0.0095$ ). Comparing the

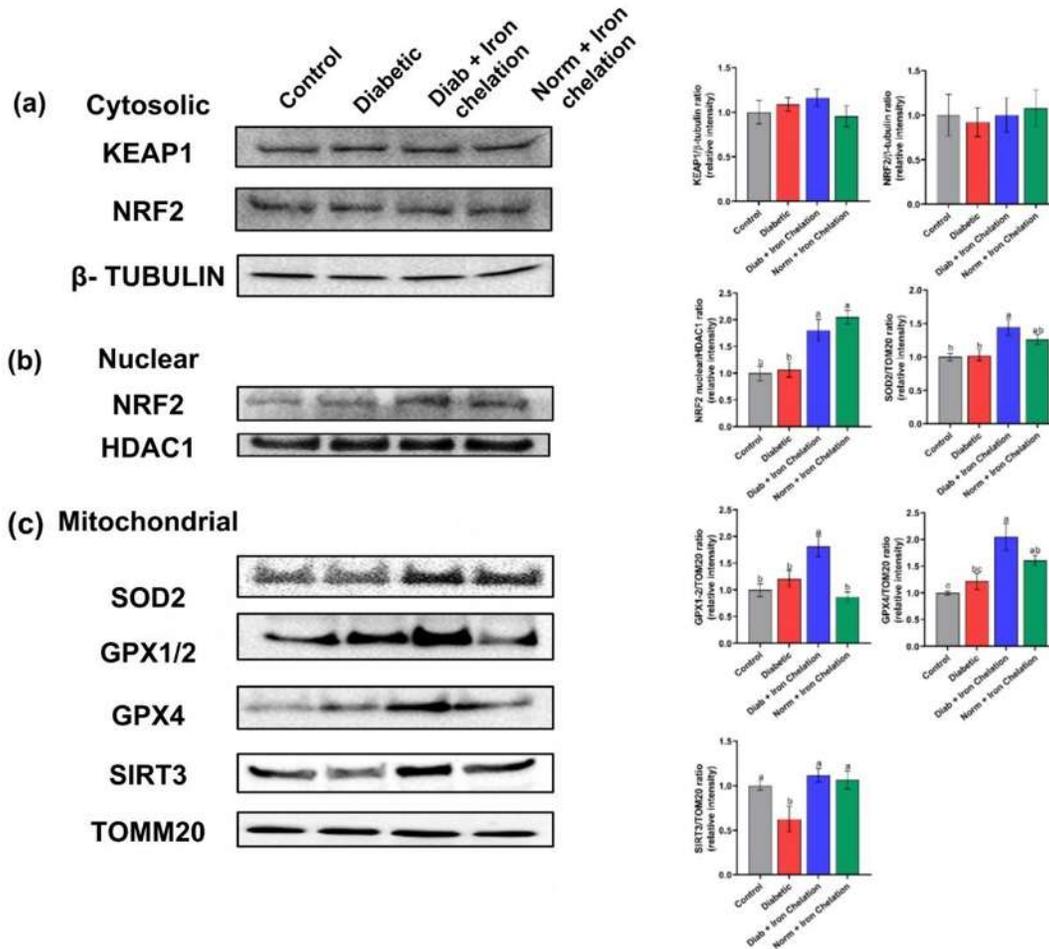


Fig. 5. Western blot and corresponding densitometry analyses in renal cortex. (a) Cytosolic (b) Nuclear and (c) Mitochondrial proteins. Equal loading was confirmed by western blot with an anti-β-tubulin, anti-HDAC1 or anti-TOMM20 antibody. Densitometry analyses are expressed as the mean ± S.E.M. Differences between groups were determined using two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ). Groups that share a letter are not significantly different from each other.

Diabetic group to the Diab + Iron chelation group, a significant increase in SIRT3 expression was observed ( $p = 0.0011$ ), suggesting a potential therapeutic effect of iron chelation in restoring SIRT3 levels (Fig. 5c).

#### 4. Discussion

The renal cortex is a metabolic epicenter, where nephrons perform intricate biochemical steps to filter blood, reabsorb essential nutrients, and regulate fluid and electrolyte balance (Zeni et al., 2017; Bhargava & Schnellmann, 2017). This energy-intensive process translates into high metabolic demand, with the renal cortex consuming a significant amount of molecular oxygen and nutrients to maintain its functional activity via oxidative phosphorylation (OXPHOS) in the mitochondria, indicating a close relationship between mitochondrial metabolism and normal renal function (Bhargava & Schnellmann, 2017; Forbes & Thorburn, 2018). In the present study, our results showed that type 2 diabetes induced using a high-fat diet and a low dose of streptozotocin caused mitochondrial dysfunction and mitochondrial oxidative stress, accompanied by alterations in renal function and hypertrophy (Tables 1–3). Our results demonstrate a significant increase in mitochondrial ROS production in the renal cortex of diabetic rats, as evidenced by the elevated levels of NADH- and FADH<sub>2</sub>-linked ROS (Fig. 3). This finding is consistent with previous studies reporting enhanced mitochondrial ROS generation in the kidneys of diabetic animals (Coughlan et al., 2009; Munusamy & MacMillan-Crow, 2009). Modifications in mitochondrial bioenergetics associated with diabetes result in the supraphysiological production of mitochondrial reactive oxygen species (ROS), causing damage to cellular components and resulting in oxidative distress, consistent with previous studies that have observed redox alterations in diabetes (Flemming et al., 2018; Wei & Szeto, 2019). These observations can be partially attributed to damage to mitochondrial components, such as aconitase and voltage-dependent anion channels (VDAC), including components of the respiratory chain, such as cytochrome *c* or complex subunits, leading to the accumulation and persistence of reduced intermediates, such as semi-ubiquinone, which can leak electrons capable of reacting with oxygen and forming superoxide anions (Frohnert & Bernlohr, 2013; Aluksanasuwan et al., 2020). In addition, our findings of reduced activity of mitochondrial complexes I, II, III, and IV in the diabetic group (Fig. 2) suggest that impaired electron transport chain function may contribute to the increased ROS generation. Studies have demonstrated that damage to the ETC, particularly at complex I, can lead to increased electron leak and ROS production, even in the presence of a reduced membrane potential (Robb et al., 2015; Zhao et al., 2019). This phenomenon has been attributed to the accumulation of reduced intermediates, such as NADH and ubiquinone, which can donate electrons to oxygen, generating superoxide (Murphy, 2009; Quinlan et al., 2012). In our study, the reduced activity of complex I in the diabetic group (Fig. 2) suggests that this mechanism may contribute to the increased ROS production despite the lower membrane potential. In healthy mitochondria, a high membrane potential is maintained by the proton gradient generated by the electron transport chain (ETC). This high membrane potential is essential for ATP production but can also promote ROS formation, particularly at complex I and III of the ETC (Turrens, 2003). However, in the context of mitochondrial dysfunction, such as that observed in diabetic nephropathy, the relationship between membrane potential and ROS production may be altered. Furthermore, the increased ROS production in the diabetic group may itself contribute to the reduction in mitochondrial membrane potential. ROS can damage mitochondrial proteins, lipids, and DNA, leading to a vicious cycle of mitochondrial dysfunction and further ROS generation (Galloway & Yoon, 2012). Oxidative damage to the ETC complexes and mitochondrial membrane can impair proton pumping and increase membrane permeability, resulting in a dissipation of the proton gradient and a decrease in membrane potential (Susuki et al., 2012). Importantly, iron chelation with deferiprone significantly attenuated mitochondrial ROS production in the diabetic group, as

demonstrated by the reduced levels of NADH- and FADH<sub>2</sub>-linked ROS (Fig. 3). This protective effect can be attributed to the ability of deferiprone to reduce the labile iron pool and prevent iron-catalyzed ROS formation (Kalinowski & Richardson, 2005). Iron plays a crucial role in mitochondrial function, as it is a key component of the electron transport chain complexes and is essential for the synthesis of heme and iron-sulfur clusters (Paul et al., 2017; Rouault, 2019). However, excess free iron can catalyze the formation of ROS, such as hydroxyl radicals through the Fenton/Haber-Weiss reaction, leading to oxidative stress and cellular damage (Galaris et al., 2019). Recently, alterations in iron metabolism and ferroptosis, a type of iron-dependent programmed cell death driven by lipid peroxidation, have been proposed as factors involved in the pathogenesis of diabetic complications (Geng et al., 2022; Mengstie et al., 2023). Previous studies have reported renal iron accumulation and iron overload in diabetes and significant accumulation of iron in the renal mitochondria of streptozotocin-induced diabetic rats (Dominguez et al., 2015; Morita et al., 2015; Peña-Montes et al., 2020). Ferroptosis is also characterized by the perturbation of the antioxidant systems, particularly GPX4 and glutathione, leading to the accumulation of iron-dependent lipid peroxides (Li et al., 2020). Mitochondria play a crucial role in the execution of ferroptosis, as they are major sites of iron metabolism and ROS production (Gao et al., 2019). In the context of diabetic nephropathy, hyperglycemia-induced oxidative stress and iron overload can create a favorable environment for ferroptosis in renal cells (Zhu et al., 2016). Our findings of decreased GSH/GSSG ratio and increased lipid peroxidation in the mitochondrial renal cortex of diabetic rats are consistent with the hallmarks of ferroptosis. The iron chelator deferiprone in the diabetic group effectively mitigated these alterations, suggesting that targeting iron metabolism may be a promising strategy to prevent ferroptosis in diabetic nephropathy. Interventions targeting iron overload in diabetes, including dietary iron restriction and/or iron chelation therapy, have shown promising outcomes in ameliorating renal function (Morita et al., 2015; Marquez-Ibarra et al., 2016; Peña-Montes et al., 2020). Deferiprone is an iron chelator that forms stable complexes with ferric ions, is excreted in urine, and is used to treat transfusion iron overload in thalassemia and sickle cell disease (Hider & Hoffbrand, 2018). Deferiprone has been associated with renoprotective effects by inhibiting inflammation and renal fibrosis and inhibiting the expression of tenascin C and NF- $\kappa$ B under diabetic conditions in rats at the dose of 50 mg/kg BW (Zou et al., 2013; Zou et al., 2017). The activation of Nrf2, a master regulator of antioxidant responses, has been proposed as a potential therapeutic strategy for diabetic nephropathy (Choi et al., 2014; Uruno et al., 2016). Our results demonstrate that iron chelation with deferiprone increases Nrf2 nuclear translocation, which is associated with the upregulation of antioxidant enzymes such as SOD2, GPX1/2, and GPX4. These findings are consistent with previous studies showing that Nrf2 activation can protect against oxidative stress and inflammation in the diabetic kidney (Shelton et al., 2013; David et al., 2017). Nrf2 also regulates the genes involved in iron metabolism, including those related to heme synthesis and catabolism (Zhang et al., 2021). Nrf2 deficiency is associated with age-dependent cardiomyopathy, which is characterized by inflammation, fibrosis, and cardiac dysfunction due to iron accumulation and oxidative distress (Federti et al., 2023). Additionally, Nrf2 can regulate iron storage and efflux through the transcriptional activation of genes such as ferritin and ferroportin, contributing to the maintenance of cellular iron balance and redox homeostasis (Kerins & Ooi, 2018; Zhang et al., 2021). Additionally, Nrf2 target genes, such as MT-1G and HMOX-1, have been identified as regulators of ferroptosis (Sun et al., 2016; Kerins & Ooi, 2018). Thus, the renoprotective effects of deferiprone in diabetes may involve a dual mechanism of reducing iron-mediated oxidative stress and enhancing Nrf2-dependent antioxidant responses. While iron chelation therapy showed beneficial effects in the diabetic group, it is crucial to consider its potential impact on healthy individuals. Interestingly, our study demonstrated that the healthy normoglycemic group treated with an iron chelator exhibited increased

oxidative damage, as evidenced by elevated levels of 3-nitrotyrosine (Fig. 4a), and loss of mitochondrial function, as shown by reduced mitochondrial respiration (Table 2) and decreased activity of electron transport chain complexes (Fig. 2). This phenomenon can be attributed to the iron deficiency caused by chronic iron chelation, which can disrupt the delicate balance of iron homeostasis, leading to increased oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the kidneys (Zhao et al., 2021). Iron is an essential cofactor for several mitochondrial enzymes, including those involved in the electron transport chain and TCA cycle (Paul et al., 2017). Thus, excessive iron chelation in the absence of iron overload may impair mitochondrial function and lead to increased ROS production (Zhao et al., 2021). Dysregulation of iron metabolism can trigger a cascade of events that compromise mitochondrial integrity and function, ultimately contributing to cellular damage and dysfunction (van Swelm et al., 2020). Moreover, iron deficiency has been associated with uncontrolled mitophagy, a process of selective degradation of damaged or dysfunctional mitochondria (Hara et al., 2020). While mitophagy is a crucial quality control mechanism, excessive or unregulated mitophagy can lead to a depletion of functional mitochondria and exacerbate cellular dysfunction (Allen et al., 2013). Although the underlying mechanism linking iron deficiency and uncontrolled mitophagy is not fully understood, it is plausible that iron-dependent enzymes involved in mitochondrial quality control pathways may be impaired, leading to aberrant mitophagy (van Swelm et al., 2020; Onukwufor et al., 2022). These results have implications for the use of iron chelation therapy, particularly in non-iron overload conditions. It is crucial to monitor iron status and assess the risk–benefit ratio when considering iron chelation therapy to avoid potential adverse effects on mitochondrial health and cellular function. Additional studies are required to investigate the potential benefits of iron chelation therapy. Moreover, it is essential to fully understand the role of the Nrf2 pathway in this context and to validate its potential as a therapeutic target.

## 5. Conclusion

In summary, our findings suggest that iron chelation mitigates mitochondrial dysfunction and oxidative stress by enhancing Nrf2-mediated antioxidant responses in the renal cortex of a murine model of type 2 diabetes. Conversely, under non-diabetic conditions, iron deficiency induced by chronic iron chelation negatively affects mitochondrial functionality and alters redox status, highlighting the importance of iron in renal homeostasis.

## Funding

This research was partially funded by Coordinación de Investigación Científica, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo to A.S.M. CIC-UMSNH-2024 (18070). D.J.P.M. received scholarships from CONAHCYT.

## CRedit authorship contribution statement

**Donovan J. Peña-Montes:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Resources, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Maribel Huerta-Cervantes:** Methodology, Formal analysis, Resources. **Héctor Riveros-Rosas:** Conceptualization, Resources. **Salvador Manzo-Avalos:** Resources, Methodology. **Asdrubal Aguilera-Méndez:** Resources, Supervision. **Miguel Huerta:** Supervision, Investigation. **Xóchitl Trujillo:** Conceptualization, Investigation. **Christian Cortés-Rojo:** Methodology, Formal analysis, Resources. **Rocío Montoya-Pérez:** Conceptualization, Resources. **Rafael Salgado-Garciglia:** Resources, Methodology. **Alfredo Saavedra-Molina:** Conceptualization, Resources, Funding acquisition, Supervision, Writing – review & editing.

## Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgments

The authors would like to express their gratitude to Dra. Esther Olvera-Cortes and Dr. Miguel A. López-Vázquez (CIBIMI-IMSS) for their generous donation of experimental animals, which was instrumental in the completion of this study. This research.

## References

- Agudejo-Butero, M., Valdez-Ortiz, R., Giraldo-Rodríguez, L., González-Robledo, M.C., Mino León, D., Rosales Herrera, M.F., Cahuana Hurtado, L., Rojas Russell, M.E., Dávila-Cervantes, C.A., 2020. Overview of the burden of chronic kidney disease in Mexico: secondary data analysis based on the Global Burden of Disease Study 2017. *BMJ Open* 10 (3), e035285.
- Aguilera-Aguirre, L., González-Hernández, J.C., Pérez-Vázquez, V., Ramírez, J., Clemente Guerrero, M., Villalobos Molina, R., Saavedra Molina, A., 2002. Role of intramitochondrial nitric oxide in rat heart and kidney during hypertension. *Mitochondrion* 1 (5), 413–423. [https://doi.org/10.1016/s1567-7249\(02\)00002-8](https://doi.org/10.1016/s1567-7249(02)00002-8).
- Alicic, R.Z., Rooney, M.T., Tuttle, K.R., 2017. Diabetic kidney disease: Challenges, progress, and possibilities. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN* 12 (12), 2032–2045. <https://doi.org/10.2215/cjn.11491116>.
- Allen, G.F.G., Toth, R., James, J., Ganley, I.G., 2013. Loss of iron triggers PINK1/Parkin-independent mitophagy. *EMBO Rep.* 14 (12), 1127–1135. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.168>.
- Aluksanasuwan, S., Plunworasawat, S., Malaitad, T., Chaiyarit, S., Thongboonkerd, V., 2020. High glucose induces phosphorylation and oxidation of mitochondrial proteins in renal tubular cells: A proteomics approach. *Sci. Rep.* 10 (1), 5843. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62665-w>.
- Ambachew, S., Biadgo, B., 2017. Hepcidin in iron homeostasis: Diagnostic and therapeutic implications in type 2 diabetes mellitus patients. *Acta Haematol.* 138 (4), 183–193. <https://doi.org/10.1159/000481391>.
- American Diabetes Association Professional Practice Committee. (2022). 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of Medical Care in diabetes—2022. *Diabetes Care*, 45(Supplement 1), S17–S38. doi: 10.2337/dc22-s002.
- Andrews, M., Soto, N., Arredondo-Olguín, M., 2015. Association between ferritin and hepcidin levels and inflammatory status in patients with type 2 diabetes mellitus and obesity. *Nutrition* 31 (1), 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2014.04.019>.
- Batandier, C., Guigas, B., Detaille, D., El Mir, M., Fontaine, E., Rigoulet, M., Leverve, X.M., 2006. The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-chain complex 1 is hampered by metformin. *J. Bioenerg. Biomech.* 38 (1), 33–42. <https://doi.org/10.1007/s10863-006-9003-8>.
- Bhargava, P., Schnellmann, R.G., 2017. Mitochondrial energetics in the kidney. *Nat. Rev. Nephrol.* 13 (10), 629–646. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.107>.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. [30] Microsomal lipid peroxidation. In: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 302–310. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(78)52032-6).
- Carlberg, I., & Mannervik, B. (1985). [59] Glutathione reductase. In *Glutamate, Glutamine, Glutathione, and Related Compounds* (pp. 484–490). Elsevier. doi: 10.1016/s0076-6879(85)13062-4.
- Choi, B. H., Kang, K. S., Kwak, M. K., 2014. Effect of redox modulating NRF2 activators on chronic kidney disease. *Molecules (basel, Switzerland)* 19 (8), 12727–12759. <https://doi.org/10.3390/molecules190812727>.
- David, J.A., Rifkin, W.J., Rabbani, P.S., Ceradini, D.J., 2017. The Nrf2/Keap1/ARE pathway and oxidative stress as a therapeutic target in type II diabetes mellitus. *Journal of Diabetes Research* 2017, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2017/4826724>.
- Diabetes and kidney disease. (2023). *Diabetesatlas.org*. Retrieved December 15, 2023, from <https://diabetesatlas.org/atlas/diabetes-and-kidney-disease/>.
- Dixon, S.J., Stockwell, B.R., 2014. The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nat. Chem. Biol.* 10 (1), 9–17. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1416>.
- Dixon, S.J., Lemberg, K.M., Lamprecht, M.R., Skouta, R., Zaitsev, E.M., Gleason, C.E., Patel, D.N., Bauer, A.J., Cantley, A.M., Yang, W.S., Morrison III, B., Stockwell, B.R., 2012. Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 149 (5), 1060–1072. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>.
- Domínguez, J.H., Liu, Y., Kelly, K.J., 2015. Renal iron overload in rats with diabetic nephropathy. *Physiol. Rep.* 3 (12), e12654.
- Federti, E., Vinchi, F., Iatcenko, I., Ghigo, A., Matte, A., Taya, S.C.M., Siciliano, A., Chiabrando, D., Tolosano, E., Vance, S.Z., Riccardi, V., Andolfo, I., Iezzi, M., Lamolinara, A., Iolascon, A., De Franceschi, L., 2023. Duality of Nrf2 in iron-overload cardiomyopathy. *Haematologica* 108 (5), 1335–1348. <https://doi.org/10.3324/haematol.2022.281995>.
- Figueira, T.R., Melo, D.R., Vercesi, A.E., Castilho, R.F., 2012. Safranin as a fluorescent probe for the evaluation of mitochondrial membrane potential in isolated organelles and permeabilized cells. In: *Mitochondrial Bioenergetics*. Humana Press, pp. 103–117. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-382-0\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-382-0_7).

- Flemming, N.B., Gallo, L.A., Forbes, J.M., 2018. Mitochondrial dysfunction and signaling in diabetic kidney disease. *Oxidative stress and beyond*. *Semin. Nephrol.* 38 (2), 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2018.01.001>.
- Forbes, J.M., Thorburn, D.R., 2018. Mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* 14 (5), 291–312. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2018.9>.
- Forbes, J.M., Coughlan, M.T., Cooper, M.E., 2008. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes* 57 (6), 1446–1454. <https://doi.org/10.2337/diabetes.2008.0057>.
- Frohner, B.L., Bernlohr, D.A., 2013. Protein carbonylation, mitochondrial dysfunction, and insulin resistance. *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)* 4 (2), 157–163. <https://doi.org/10.3945/advn.112.003319>.
- Galaris, D., Barbouti, A., Pantopoulos, K., 2019. Iron homeostasis and oxidative stress: An intimate relationship. *Biochim. Biophys. Acta* 1866 (12), 118535. <https://doi.org/10.1016/j.bba.2019.118535>.
- Galloway, C.A., Yoon, Y., 2013. Mitochondrial morphology in metabolic diseases. *Antioxid. Redox Signal.* 19 (4), 415–430. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4779>.
- Gang, T., Neumeth, E., 2012. Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta* 1823 (9), 1434–1443. <https://doi.org/10.1016/j.bba.2012.01.014>.
- Ge, M., Yi, J., Zhu, J., Minikes, A.M., Manion, P., Thompson, C.B., Jiang, X., 2019. Role of mitochondria in ferroptosis. *Mol. Cell* 73 (3), 354–363.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.10.042>.
- Ge, W., Pan, L., Shen, L., Sun, Y., Sun, J., Yu, S., Qiu, J., Xiang, W., 2022. Evaluating renal iron overload in diabetes mellitus by blood oxygen level dependent magnetic resonance imaging: a longitudinal experimental study. *BMC Med. Imaging* 22 (1). <https://doi.org/10.1186/s12880-022-00939-7>.
- Gianni, S., Bevilacqua, D., Cooper, M.E., 2006. Mechanisms of diabetic nephropathy: Role of hypertension. *Hypertension* 48 (4), 519–526. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.0000240331.32352.6f>.
- Gornall, A.G., Bardawill, C.J., David, M.M., 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177 (3), 751–766. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)57021-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)57021-6).
- Hara, Y., Yanatori, I., Tanaka, A., Kishi, F., Lemasters, J.L., Nishina, S., Sasaki, K., Hino, K., 2020. Iron loss triggers mitophagy through induction of mitochondrial ferritin. *EMBO Rep.* 21 (11). <https://doi.org/10.15252/embr.202004202>.
- IDF diabetes atlas 2021. (2021). <https://diabetesatlas.org/sites/default/files/IDF-diabetes-atlas-2021.pdf>. Retrieved December 15, 2023.
- Jellinger, P.S., 2009. Metabolic consequences of hyperglycemia and insulin resistance. *Insulin* 4 (1), 2–14. [https://doi.org/10.1016/s1557-0838\(09\)00031-1](https://doi.org/10.1016/s1557-0838(09)00031-1).
- Kalinowski, D.S., Richardson, D.R., 2005. The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacol. Rev.* 57 (4), 547–583. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.2>.
- Kerins, M.J., Ooi, A., 2018. The roles of Nrf2 in modulating cellular iron homeostasis. *Antioxid. Redox Signal.* 29 (17), 1756–1773. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7176>.
- Lawrence, R.A., Burk, R.F., 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71 (4), 953–958. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(76\)90737-6](https://doi.org/10.1016/0006-291x(76)90737-6).
- Li, J., Cao, F., Yu, H.-L., Huang, Z.-J., Liu, Z.-T., Sun, M., Sun, B., Wang, G., 2020. Ferroptotic past, present and future. *Cell Death Dis.* 11 (2), 88. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2298-2>.
- Li, Z., Graham, B.H., 2012. Measurement of mitochondrial oxygen consumption using a Clark electrode. In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 837. Humana Press, pp. 63–72.
- López, M., Quintero Macías, L., Huerta, M., Rodríguez Hernández, A., Melnikov, V., Girdenas, Y., Bricio Barrios, J.A., Sánchez Pastor, E., Gamboa Domínguez, A., Izal, C., Trujillo, X., Ríos-Silva, M., 2022. Capsaicin decreases kidney iron deposits and increases hepcidin levels in diabetic rats with iron overload: A preliminary study. *Molecules* 27 (22), 7764. <https://doi.org/10.3390/molecules27227764>.
- Mengiste, M.A., Seid, M.A., Gebeyehu, N.A., Adella, G.A., Kassie, G.A., Bayih, W.A., Gesese, M.M., Anley, D.T., Feleke, S.F., Zemene, M.A., Dessie, A.M., Solomon, Y., Basie, B., Dejenie, T.A., Tesfome, A.A., Abebe, E.C., 2023. Ferroptosis in diabetic nephropathy: Mechanisms and therapeutic implications. *Metabolism Open* 18 (100243), 100243. <https://doi.org/10.1016/j.metop.2023.100243>.
- Morita, T., Kabanro, D., Kitada, K., Morimoto, S., Ichihara, A., Hitomi, H., Kohori, H., Shigino, I., Nishiyama, A., 2015. Chelation of dietary iron prevents iron accumulation and macrophage infiltration in the type 1 diabetic kidney. *Eur. J. Pharmacol.* 756, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.063>.
- Murphy, M.P., 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417 (1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/bj009013>.
- Omokunor, J.O., Dirksen, R.T., Wojtowicz, A.P., 2022. Iron dysregulation in mitochondrial dysfunction and Alzheimer's disease. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 11 (4), 692. <https://doi.org/10.3390/antiox11040692>.
- Paul, B.T., Blanz, D.H., Torti, F.M., Torti, S.V., 2017. Mitochondria and iron: current questions. *Expert Rev. Hematol.* 10 (1), 65–79. <https://doi.org/10.1080/17470883.2016.1268947>.
- Peña Montes, D.J., Huerta Cercantes, M., Ríos Silva, M., Trujillo, X., Cortés Rojo, C., Huerta, M., Saavedra-Molina, A., 2020. Effects of dietary iron restriction on kidney mitochondrial function and oxidative stress in streptozotocin diabetic rats. *Mitochondrion* 54, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.07.001>.
- Quinlan, C.L., Orr, A.L., Peresvelichikov, I.V., Treberg, J.R., Arkrell, B.A., Brand, M.D., 2012. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *J. Biol. Chem.* 287 (32). <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.574626>.
- Rajagurkar, M.M., Hegde, U., Bhattacharya, A., Alam, M.G., Shah, S.V., 2013. Effect of deferiprone, an oral iron chelator, in diabetic and non diabetic glomerular disease. *Toxicol. Meth. Methods* 23 (1), 5–10. <https://doi.org/10.31007/15376516.2012.730558>.
- Rohb, E.L., Gaweil, J.M., Alsenjwerit, D., Gachemi, H.M., Stewart, T.S., Sbcchinom, M. M., Qiang, L., Prime, T.A., Bright, T.P., James, A.M., Shattuck, M.J., Sena, H.M., Hartley, R.C., Murphy, M.P., 2015. Selective superoxide generation within mitochondria by the targeted redox cyclor MitoFarnesyl. *Free Radic. Biol. Med.* 89, 883–894. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.08.021>.
- Rouault, T.A., 2016. Mitochondrial iron overload: causes and consequences. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 38, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.cog.2016.02.004>.
- Rouault, T.A., 2019. The indispensable role of mammalian iron sulfur proteins in function and regulation of multiple diverse metabolic pathways. *Isometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine* 32 (3), 343–353. <https://doi.org/10.1007/s10534-019-00191-7>.
- Ruiz, S., Pergola, P.E., Zager, R.A., Vaziri, N.D., 2013. Targeting the transcription factor Nrf2 to ameliorate oxidative stress and inflammation in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 83 (6), 1029–1041. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.439>.
- Saavedra-Molina, A., Declis, T.M., 1997. Effect of estrus and intra mitochondrial calcium on citrulline synthesis. *Amino Acids* 12 (3–4), 293–298. <https://doi.org/10.1007/bf01373009>.
- Sha, W., Hu, F., Xi, Y., Chu, Y., Bu, S., 2021. Mechanism of ferroptosis and its role in type 2 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes Research* 2021, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2021/9999612>.
- Shelton, L.M., Kevin Park, B., Copple, L.M., 2013. Role of Nrf2 in protection against acute kidney injury. *Kidney Int.* 84 (6), 1090–1095. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.248>.
- Spisozzi, M., Cossari, A., Perrotto, V., Salvisio, L., Angelini, C., 2012. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nat. Protoc.* 7 (6), 1235–1246. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.058>.
- Sun, X., Niu, X., Chen, R., He, W., Chen, D., Kang, R., Tang, D., 2016. Metallothionein 1G facilitates ferroptosis resistance through inhibition of ferroptosis. *Hepatology (Baltimore, Md)* 64 (2), 488–500. <https://doi.org/10.1002/hep.28574>.
- Suski, J.M., Lechowicz, M., Bonora, M., Pinton, P., Duszyński, J., Wiczkowski, M.R., 2012. Relation between mitochondrial membrane potential and ROS formation. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 810, 183–203. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-382-0\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-382-0_12).
- Swaminathan, S., Fonseca, V.A., Alam, M.G., Shah, S.V., 2007. The role of iron in diabetes and its complications. *Diabetes Care* 30 (7), 1926–1933. <https://doi.org/10.2337/dc06.2625>.
- Turecek, J.F., 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552 (Pt 2), 335–344. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.099478>.
- Urrutia, P.J., Mens, N.P., Nijacz, M.T., 2014. The interplay between iron accumulation, mitochondrial dysfunction, and inflammation during the execution step of neurodegenerative disorders. *Front. Pharmacol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00938>.
- Uruha, A., Yagishita, Y., Yamamoto, M., 2015. The Keap1–Nrf2 system and diabetes mellitus. *Arch. Biochem. Biophys.* 566, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.12.012>.
- van Swaen, R.P.L., Weizels, J.F.M., Switzels, D.W., 2020. The multifaceted role of iron in renal health and disease. *Nat. Rev. Nephrol.* 16 (2), 77–98. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0197-5>.
- Vargas Vargat, M.A., Saavedra-Molina, A., Gómez Barroso, M., Peña Montes, D., Cortés Rojo, C., Miguel, H., Trujillo, X., Montoya Pérez, R., 2022. Dietary iron restriction improves muscle function, dyslipidemia, and decreased muscle oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 11 (4), 731. <https://doi.org/10.3390/antiox11040731>.
- Venkatesan, P., Varghese, J., Archi, T.S., James, J.V., Amis, A., Prasad, J., Jacob, M., 2021. Evidence of dysregulated iron homeostasis in newly diagnosed diabetes, but not in pre-diabetes. *J. Diabetes Complications* 35 (9), 107977. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2021.107977>.
- Wang, H., Li, H., Jiang, X., Shi, W., Shen, Z., Li, M., 2014. Hepcidin is directly regulated by insulin and plays an important role in iron overload in streptozotocin induced diabetic rats. *Diabetes* 63 (5), 1506–1518. <https://doi.org/10.2337/db13-1195>.
- Wei, P.Z., Sesto, C.C., 2019. Mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease. *Chinica Clinica Acta: International Journal of Clinical Chemistry* 496, 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.07.005>.
- Zeni, L., Norden, A.G.W., Cascarini, G., Unwin, R.J., 2017. A more tubulocentric view of diabetic kidney disease. *J. Nephrol.* 30 (6), 701–717. <https://doi.org/10.1007/s40620-017-0423-9>.
- Zhang, Z., Huang, Q., Zhao, D., Han, F., Li, X., Qi, W., 2023. The impact of oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction on diabetic microvascular complications. *Front. Endocrinol.* 14. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1113363>.
- Zhang, L., Zhang, J., Jia, Y., Yao, G., Zhao, H., Qiao, P., Wu, S., 2021. Nrf2 is a potential modulator for orchestrating iron homeostasis and redox balance in cancer cells. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 728172. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.728172>.
- Zhao, R., Jiang, S., Zhang, L., Yu, Z., 2019. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int. J. Mol. Med.* <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4188>.
- Zhao, S., Wang, X., Zheng, X., Liang, X., Wang, Z., Zhang, J., Zhao, X., Zhang, S., Pan, Q., Sun, F., Shang, W., Bansal, J., Qiu, A., 2021. Iron deficiency exacerbates cisplatin- or doxorubicin-induced acute kidney injury through promoting iron-catalyzed oxidative damage. *Free Radic. Biol. Med.* 173, 81–96. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.07.025>.

Zhu, Y., Cui, H., Xia, Y., Gan, H., 2016. RDPK3-mediated necroptosis and apoptosis contributes to renal tubular cell progressive loss and chronic kidney disease progression in rats. *PLoS One* 11 (6), e0156729.

Zou, C., Xie, R., Bao, Y., Liu, X., Sui, M., Saloung, L., S., Yin, H., 2013. Iron chelator alleviates tubulointerstitial fibrosis in diabetic nephropathy rats by inhibiting the

expression of tenascinC and other correlation factors. *Endocrine* 44 (3), 666–674. <https://doi.org/10.1007/s12020-013-9807-0>

Zou, C., Liu, X., Liu, R., Wang, M., Sui, M., Min, S., Li, L., Ji, L., Xie, R., 2017. Effect of the oral iron chelator deferoxime in diabetic nephropathy rats. *J. Diabetes* 9 (4), 332–340. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12420>

## 11. DISCUSIÓN

En el presente estudio proporcionamos evidencia sobre los efectos de la quelación del hierro en el contexto de la enfermedad renal diabética, particularmente en relación con la función mitocondrial, el estrés oxidativo y la activación de la respuesta antioxidante mediada por Nrf2. Uno de los hallazgos clave de nuestro estudio es la alteración significativa del metabolismo renal del hierro en ratas diabéticas, lo que conduce a una sobrecarga de hierro mitocondrial. Esta observación se alinea con investigaciones previas que indican que la diabetes altera la homeostasis del hierro, lo que podría exacerbar el daño renal (Fernández-Real & Manco, 2014; Dominguez *et al.*, 2015). La acumulación excesiva de hierro que observamos en el tejido renal de ratas diabéticas es consistente con los hallazgos de Nankivell *et al.* (1994), quienes informaron un aumento de los depósitos de hierro en los túbulos proximales de ratas diabéticas y en biopsias de pacientes diabéticos.

El mecanismo detrás de esta acumulación de hierro en la diabetes probablemente es multifacético. Se ha demostrado que la hiperglucemia aumenta la absorción de hierro y altera la expresión de las proteínas reguladoras del hierro (Simcox *et al.*, 2013). Además, la inflamación crónica asociada con la diabetes puede contribuir a la desregulación de la homeostasis del hierro mediante la desregulación de la hepcidina, un regulador clave del metabolismo del hierro (Ganz & Nemeth, 2012). Wang *et al.* (2014), demostró que la deficiencia de insulina y una dieta alta en grasas redujeron significativamente la expresión de hepcidina, lo que condujo a altos niveles de hierro corporal. Este hallazgo indica que la insulina desempeña un papel importante en la sobrecarga de hierro en la diabetes al regular la expresión de hepcidina a través de la activación de STAT3 mediante la vía de la

cinasa relacionada con la señal extracelular (ERK). Estas observaciones se ven reforzadas sobre los efectos negativos de la sobrecarga de hierro en la señalización de la insulina.

Nuestros resultados mostraron que tanto la restricción dietética de hierro como la quelación farmacológica de hierro utilizando deferiprona mitigaron eficazmente la sobrecarga de hierro observada en ratas diabéticas. Este hallazgo es particularmente significativo ya que sugiere que las intervenciones dirigidas al metabolismo del hierro podrían ser una estrategia terapéutica viable en el manejo de la nefropatía diabética. La eficacia de la quelación del hierro en nuestro modelo es consistente con estudios previos en otras complicaciones diabéticas. Por ejemplo, Cooksey *et al.* (2010) informaron que la quelación del hierro con FBS0701 mejoró la homeostasis de la glucosa y redujo el estrés oxidativo en un modelo DT2. La deferiprona, el quelante empleado en nuestro estudio ha mostrado efectos renoprotectores reportados donde se observó una mejoría en la inflamación y la fibrosis renal a través de la regulación NF- $\kappa$ B, MCP-1, MMP-9, TIMP-1, COX-2, así como una disminución en la infiltración de macrófagos y una mejoría en los marcadores de función renal como la tenascin C a las dosis de 50 y 100 mg/kg en roedores (Zou *et al.*, 2013; Zou *et al.*, 2017). Morita *et al.* (2015) reportaron un aumento en los niveles de hierro, senescencia de las células tubulares e infiltración de macrófagos en los riñones de ratones tratados con STZ a las 28 semanas, mientras que la administración de deferasirox, un quelante de hierro, redujo significativamente la acumulación de hierro en los túbulos proximales y disminuyó el número de macrófagos infiltrantes. En este mismo estudio se emplearon animales mutantes que carecían de p21, un regulador clave del ciclo celular que se induce en respuesta a varios estímulos, incluido el daño

del ADN y el estrés oxidativo y observaron que la ausencia de p21 disminuyó la acumulación de hierro tubular renal, sin embargo, no se observaron cambios en la senescencia de las células tubulares. Este hallazgo sugiere que p21 puede desempeñar un papel en la mediación de la acumulación de hierro en la ERD, potencialmente a través de un mecanismo independiente de sus efectos sobre la regulación del ciclo celular (Kitada *et al.*, 2014; Morita *et al.*, 2015).

La disfunción mitocondrial es un factor clave en la patogénesis de la ERD, contribuyendo al estrés oxidativo, la inflamación y el daño celular. Una observación clave en nuestro estudio fue la mejora en la bioenergética mitocondrial con el tratamiento de quelación de hierro en ratas diabéticas. Este hallazgo es crucial ya que la disfunción mitocondrial se reconoce cada vez más como una característica central en la patogénesis de la ERD (Forbes & Thorburn, 2018). Observamos que la quelación del hierro previno las alteraciones en la bioenergética mitocondrial de ratas diabéticas no tratadas. Específicamente, notamos mejoras en la capacidad respiratoria mitocondrial, la actividad de la cadena de transporte electrones y el potencial de membrana mitocondrial. La mejora de la bioenergética mitocondrial puede impactar significativamente en la progresión de la enfermedad y mejorar la función renal. Una función mitocondrial optimizada conduce a una producción de ATP más eficiente, lo cual es esencial para mantener la homeostasis celular y una adecuada función renal. Esto es particularmente importante en los túbulos proximales con altas demandas energéticas, los cuales son altamente susceptibles al daño en la ERD. Otro factor importante es el daño a la cadena de transporte de electrones, particularmente en el complejo I, puede llevar a un aumento en la fuga de electrones y la producción

de ERO, incluso en presencia de un potencial de membrana reducido (Robb *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2019).

Estas observaciones concuerdan con las obtenidas por Lee *et al.* (2020), que investigaron los efectos de la quelación del hierro sobre la función de las células  $\beta$  en un modelo de DT2. Encontraron que la quelación del hierro mejoró la función mitocondrial y la secreción de insulina en las células  $\beta$  pancreáticas. El mecanismo detrás de esta mejora puede ser explicado parcialmente por una reducción del estrés oxidativo mediado por hierro libre en exceso. El exceso de hierro puede catalizar la formación de ERO a través de la reacción de Fenton, lo que lleva al daño mitocondrial (Rouault, 2015). Al reducir los niveles de hierro, la terapia de quelación puede disminuir la producción de ERO, preservando así la integridad y función mitocondrial.

Además, nuestros hallazgos sugieren que la quelación del hierro puede tener efectos directos sobre la homeostasis del hierro mitocondrial. La mejora de la función mitocondrial que observamos podría deberse a la prevención de la sobrecarga de hierro mitocondrial, que se ha demostrado que deteriora la cadena de transporte de electrones y promueve el estrés oxidativo (Ward & Cloonan, 2019).

Nuestro estudio demostró una reducción significativa en los marcadores de estrés oxidativo dante y una mejora de los sistemas de defensa antioxidante después de la quelación del hierro en ratas diabéticas. Este hallazgo es particularmente relevante dado el papel central del estrés oxidativo en la patogénesis de la ERD (Brownlee, 2005; Coughlan *et al.*, 2018).

Observamos niveles disminuidos de productos de peroxidación lipídica y carbonilación de proteínas, lo que indica una reducción del daño oxidativo. Al mismo tiempo, notamos un aumento en la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD2), la catalasa y la glutatión peroxidasa (GPx4). Los efectos antioxidantes de la quelación del hierro pueden atribuirse a varios mecanismos. En primer lugar, al reducir los niveles de hierro, la terapia de quelación disminuye directamente el potencial de producción de ERO catalizada por hierro. En segundo lugar, la quelación del hierro promueve la activación de Nrf2, un regulador maestro de la respuesta antioxidante.

Nuestros resultados mostraron un incremento en la activación de la vía de señalización Nrf2 después de la quelación del hierro en ratas diabéticas. Nrf2 es un factor de transcripción que regula la expresión de numerosos genes antioxidantes y citoprotectores y se ha demostrado que su activación es protectora en varios modelos de enfermedad renal (Tanase et al., 2022).

Observamos una mayor translocación nuclear de Nrf2 y una expresión mejorada de sus genes diana, incluidos la SOD2, la GPX4, GPX1/2 y una mejoría en el estado redox de los tioles (glutatión). Esta activación de la vía Nrf2 es probablemente un mecanismo clave por el cual la quelación del hierro ejerce sus efectos protectores en nuestro modelo. El vínculo entre la quelación del hierro y la activación de Nrf2 se ha sugerido previamente en otros contextos. Por ejemplo, Liang *et al.* (2019) informaron que el quelante de hierro deferoxamina activó Nrf2 y protegió contra el estrés oxidativo en un modelo de nefropatía inducida por contraste. Nuestros hallazgos extienden este concepto a la nefropatía diabética,

lo que sugiere que la activación de Nrf2 podría ser un mediador crucial de los efectos renoprotectores de la quelación del hierro en la diabetes.

El mecanismo por el cual la quelación del hierro activa Nrf2 no está completamente dilucidado, pero puede involucrar varias vías. Una posibilidad es que, al reducir el estrés oxidativo mediado por hierro, la terapia de quelación altera el equilibrio redox de una manera que promueve la activación de Nrf2. Además, se ha demostrado que algunos quelantes de hierro interactúan directamente con Keap1, el represor citoplásmico de Nrf2, lo que lleva a la activación de Nrf2 (Wang *et al.*, 2014).

La evidencia acumulada sugiere que la ferroptosis juega un papel crucial en la patogénesis de la ERD. A pesar de los avances en el manejo de la diabetes, la ERD continúa siendo un reto clínico importante, lo que subraya la necesidad urgente de identificar nuevos mecanismos patológicos y desarrollar estrategias terapéuticas innovadoras para su tratamiento (Wu & Chen, 2022). Aunque se reconoce que la patogénesis de la ERD es compleja y multifactorial, la investigación reciente ha arrojado luz sobre la ferroptosis como un posible actor clave en este proceso. La ferroptosis es una forma de muerte celular regulada caracterizada por la peroxidación lipídica dependiente del hierro (Dixon *et al.*, 2012). La reducción de la peroxidación lipídica mediada por la quelación del hierro y la mejora de las defensas antioxidantes observadas en nuestro estudio podrían potencialmente inhibir los procesos ferroptóticos en el riñón diabético.

Nuestros resultados, por lo tanto, sugieren que la quelación del hierro puede ofrecer un doble beneficio en la nefropatía diabética: no solo reduce el estrés oxidativo y mejora la función mitocondrial, sino que también puede inhibir las vías

de muerte celular ferroptótica. Esta perspectiva se ve respaldada por múltiples estudios que han proporcionado evidencia directa y multifacética de la implicación de la ferroptosis en la ERD. Por ejemplo, Kim *et al.* (2021) observaron una disminución significativa en la expresión de genes clave relacionados con la ferroptosis, como SLC7A11 y GPX4, en los túbulos renales de pacientes diabéticos. Estos hallazgos se replicaron en modelos *in vitro* e *in vivo*, donde también se detectaron alteraciones en los niveles de glutatión y un aumento en la peroxidación lipídica.

De manera similar, Li *et al.* (2021) y Wu *et al.* (2020) encontraron evidencia de ferroptosis en modelos de nefropatía diabética, incluyendo cambios en la expresión génica, alteraciones en los niveles de glutatión y productos de peroxidación lipídica y cambios morfológicos mitocondriales. Estos estudios también destacaron el papel potencial de la vía Nrf2 en la regulación de la ferroptosis en el contexto de la ERD.

Además, la eficacia demostrada de los inhibidores de ferroptosis, como la ferrostatina-1 y los quelantes de hierro, como la deferiprona, en la atenuación de los cambios relacionados con la ferroptosis y la mejora de la función renal en modelos de ERD, sugiere que la inhibición de la ferroptosis podría ser una estrategia terapéutica viable para mitigar el daño renal en pacientes con ERD.

Vale la pena señalar que, si bien se han explorado muchas estrategias antioxidantes en el contexto de la nefropatía diabética, la quelación del hierro ofrece algunas ventajas únicas. A diferencia de la suplementación directa con antioxidantes, que ha mostrado una eficacia limitada en ensayos clínicos (Golbidi

*et al.*, 2011), la quelación del hierro aborda una causa fundamental del estrés oxidativo en la diabetes: la sobrecarga de hierro.

Además, la activación de Nrf2 por la quelación del hierro representa un enfoque más fisiológico para mejorar las defensas antioxidantes. Al estimular los propios sistemas antioxidantes de la célula, este enfoque puede proporcionar una protección más sostenida y completa contra el daño oxidativo en comparación con la suplementación exógena con antioxidantes.

Si bien nuestro estudio demostró los efectos beneficiosos de la quelación del hierro en el contexto de la ERD, también reveló efectos adversos significativos de la quelación excesiva de hierro en ratas sanas. La disminución de hierro iatrogénica en ratas sanas resalta la importancia crítica del hierro en la función celular normal y destaca los riesgos potenciales de la terapia de quelación de hierro indiscriminada. En ratas sanas sometidas a quelación de hierro, observamos una marcada disminución en el hierro disponible, lo que condujo a alteraciones significativas en el metabolismo celular y la función mitocondrial. Esta deficiencia de hierro iatrogénica resultó en una funcionalidad mitocondrial comprometida y una producción de energía reducida, efectos que no se observaron en las ratas diabéticas sometidas a quelación de hierro.

Los efectos perjudiciales de la depleción de hierro sobre la función mitocondrial pueden atribuirse en parte a la interrupción de los procesos dependientes del hierro que son cruciales para la salud mitocondrial. El hierro es un componente esencial del hemo y los grupos hierro-azufre, que son parte integral de la cadena de transporte de electrones y numerosas otras enzimas mitocondriales (Rouaul *et al.*, 2015). Nuestros hallazgos se alinean con los de Rensvold *et al.* (2013),

quienes demostraron que la deficiencia de hierro conduce a una reconfiguración del proteoma mitocondrial y una disminución de la capacidad oxidativa. Estas alteraciones pueden explicarse parcialmente por las observaciones de Allen et al., 2013 y Goodwin *et al.* (2017), quienes demostraron que la depleción crónica de hierro puede conducir a una mitofagia y una ferritinofagia alterada y una homeostasis del hierro alterada de manera independiente de PINK1/Parkin, a través de la activación de p62, al activar vías de reconocimiento para mitocondrias dañadas y facilitando su eliminación. Este proceso, aunque inicialmente adaptativo, podría contribuir a la disfunción mitocondrial si se activa excesivamente. La desregulación de la ferritinofagia tiene varias implicaciones importantes. En primer lugar, sugiere que la quelación prolongada de hierro puede agotar no solo el hierro circulante sino también las reservas de hierro celular, lo que potencialmente conduce a un estado de deficiencia severa de hierro. En segundo lugar, dado que la ferritinofagia es un componente importante de la respuesta al estrés celular, su deterioro puede reducir la capacidad de la célula para adaptarse a otros factores estresantes (Quiles Del Rey & Mancias, 2019).

Adicionalmente nuestros resultados demostraron que la depleción/pérdida de hierro en ratas sanas condujo a una alteración significativa en el estado redox celular. Contrariamente a los efectos antioxidantes observados con la quelación de hierro en ratas diabéticas, la depleción excesiva de hierro en ratas sanas resultó en un aumento de los marcadores de estrés oxidativo y una disminución de la capacidad antioxidante. Este efecto paradójico puede explicarse por la naturaleza dual del hierro en las reacciones redox. Si bien el exceso de hierro puede promover el estrés oxidativo a través de la reacción de Fenton, el hierro

también es un componente esencial de muchas enzimas antioxidantes, incluida la catalasa (Koskenkorva-Frank *et al.*, 2013).

## 12. CONCLUSIONES

En conclusión, nuestros hallazgos demuestran que la diabetes afecta significativamente el metabolismo del hierro renal, resultando en una sobrecarga mitocondrial de este elemento. Esta alteración puede ser mitigada mediante estrategias tanto alimentarias (restricción de hierro) como farmacológicas (quelación del hierro). Estas intervenciones previenen las alteraciones en la bioenergética mitocondrial y reducen el estrés oxidativo, promoviendo la expresión de sistemas de defensa antioxidante a través de la activación de NRF2, mejorando el estado redox y los daños oxidativos a nivel mitocondrial (fig.6) Por otro lado, nuestros resultados subrayan que la quelación de hierro, si bien es beneficiosa en el contexto de la diabetes y la sobrecarga de hierro, puede tener consecuencias perjudiciales en individuos sanos. En sujetos con niveles normales de hierro, la quelación excesiva puede conducir a una deficiencia iatrogénica de este elemento esencial. Esta reducción del hierro disponible afecta negativamente el estado redox celular, comprometiendo la funcionalidad mitocondrial y, por ende, la producción de energía (fig. 7).

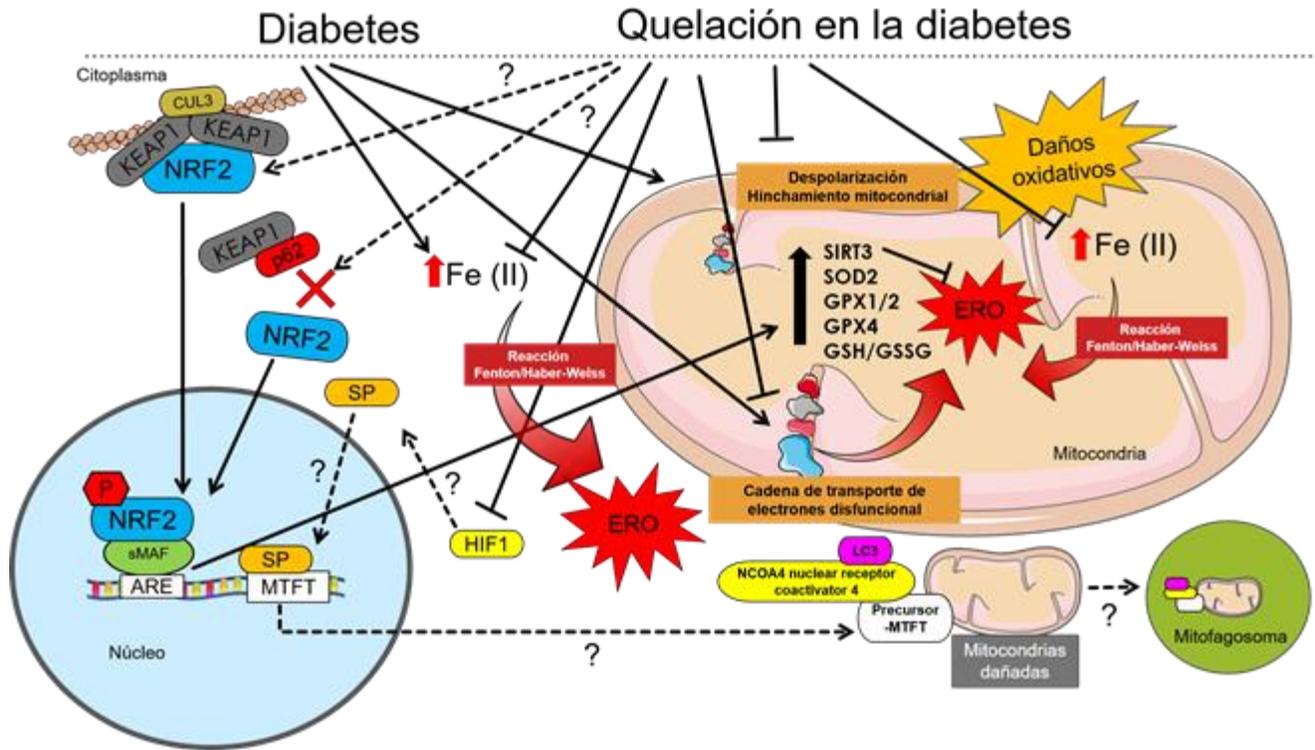


Figura 12. Efectos de la quelación de hierro con deferiprona en la corteza renal en un modelo murino de diabetes mellitus tipo 2.

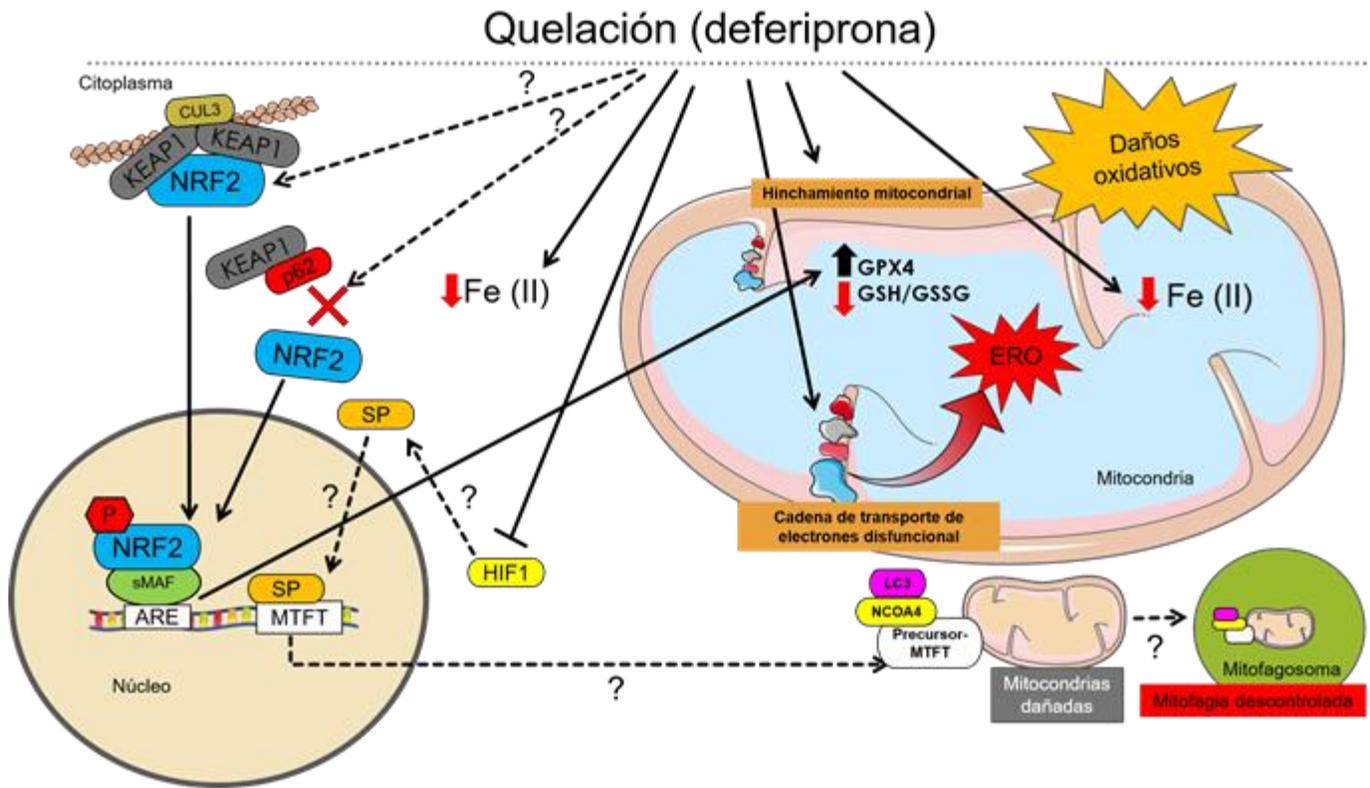


Figura 13. Efecto de la quelación de hierro con deferiprona en la corteza renal de un modelo murino.

### 13. ANEXO: CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS

Durante el desarrollo del presente trabajo se participó como co-autor en la publicación de los siguientes textos académicos derivado de la capacitación impartida por el presente, donde se le proporcionaron conocimientos y habilidades especializadas alumnos y colaboradores dentro y fuera del Laboratorio de Bioquímica del IIQB-UMSNH.

1. *Eryngium carlinae* Ethanol Extract Corrects Lipid Abnormalities in Wistar Rats with Experimental Diabetes. 10.1089/jmf.2019.0189.
2. Gestational Diabetes Triggers Oxidative Stress in Hippocampus and Cerebral Cortex and Cognitive Behavior Modifications in Rat Offspring: Age-and Sex-Dependent Effects. 10.3390/nu12020376.
3. Un delicado balance entre el hierro y la diabetes, *SaberMas*.
4. Effects of Apocynin on Heart Muscle Oxidative Stress of Rats with Experimental Diabetes: Implications for Mitochondria. 10.3390/antiox10030335.
5. Effects of Gestational Diabetes in Cognitive Behavior, Oxidative Stress and Metabolism on the Second-Generation Off-Spring of Rats. 10.3390/nu13051575.
6. Capítulo: Mitochondrial metabolism in diabetes en el libro MITOCHONDRIAL METABOLISM. 10.1016/B978-0-12-822416-8.00007-5.

7. Hypolipidemic and Antioxidant Effects of Guishe Extract from *Agave lechuguilla*, a Mexican Plant with Biotechnological Potential, on Streptozotocin-Induced Diabetic Male Rats. 10.3390/plants10112492.
8. Dietary Iron Restriction Improves Muscle Function, Dyslipidemia, and Decreased Muscle Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. 10.3390/antiox11040731.
9. Antilipidemic and Hepatoprotective Effects of Ethanol Extract of *Justicia spicigera* in Streptozotocin Diabetic Rats. 10.3390/nu14091946.
10. Comparative Effect of Three Different Exercise Intensities in Combination with Diazoxide on Contraction Capacity and Oxidative Stress of Skeletal Muscle in Obese Rats. 10.3390/biology11091367.
11. Diazoxide improves muscle function in association with improved dyslipidemia and decreased muscle oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. 10.1007/s10863-023-09958-7.
12. Antioxidant effects of silver nanoparticles obtained by green synthesis from the aqueous extract of *Eryngium carlinae* on the brain mitochondria of streptozotocin-induced diabetic rats. 10.1007/s10863-023-09963-w.

13. An Ethyl Acetate Extract of *Eryngium carlinae* Inflorescences Attenuates Oxidative Stress and Inflammation in the Liver of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. 10.3390/antiox12061235.
14. Antioxidant Effect of the Ethyl Acetate Extract of *Potentilla indica* on Kidney Mitochondria of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. 10.3390/plants12183196.
15. *Eryngium carlinae* Extract and Exercise Improve Blood Lipid Profile and Skeletal Muscle Function in Obese Rats. 10.21926/obm.icm.2403040
16. Capítulo: Análisis bioquímicos: aislamiento, purificación y funcionalidad de mitocondrias de cerebro de roedores, Manual del Centro Universitario Lagos de Moreno, UDG.
17. Polydatin prevents electron transport chain dysfunction and ROS overproduction in iron-overloaded rat liver mitochondria by decreasing lipid peroxidation and enhancing cardiolipin levels. ijms-3202345.
18. Protective effect of methylene blue in 3-nitropropionic acid rat model: behavioral and mitochondrial implications. *En revisión*.

## *Eryngium carlinae* Ethanol Extract Corrects Lipid Abnormalities in Wistar Rats with Experimental Diabetes

Ruth Noriega-Cisneros,<sup>1</sup> Donovan J. Peña-Montes,<sup>2,3</sup> Maribel Huerta-Cervantes,<sup>2</sup> Rafael Torres-Martínez,<sup>2</sup> Miguel Huerta,<sup>3</sup> Salvador Manzo-Avalos,<sup>2</sup> Rafael Salgado-Garciglia,<sup>2</sup> and Alfredo Saavedra-Molina<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Nursing; <sup>2</sup>Institute of Chemistry and Biological Research; Michoacan University of Saint Nicholas of Hidalgo, Morelia, México.

<sup>3</sup>University Center for Biomedical Research, University of Colima, Colima, México.

**ABSTRACT** Abnormalities in lipid metabolism, associated with increased risk of cardiovascular disease (CVD), frequently occur in people with diabetes. *Eryngium carlinae* is a plant used in traditional medicine to treat lipid abnormalities. The chemical composition and hypolipidemic activity of the ethanolic extract of *E. carlinae* were analyzed to broaden our knowledge of its mechanism of action. The ethanolic extract of *E. carlinae* was tested for hypolipidemic activity by oral administration for 40 days. Atorvastatin, a widely used statin, was also administered to compare its effect with that of the extract. Serum was used for analysis of the lipid profile and liver microsomes to assess 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase activity and low-density lipoprotein receptor (LDL-r) levels. The extract was able to reduce total cholesterol and non-high-density lipoprotein cholesterol (C-HDL) levels and increase the C-HDL levels reduced in diabetes, decreasing the atherogenic index and therefore the risk of suffering CVD at the same level as atorvastatin. The HMG-CoA reductase activity and LDL-r levels were not modified by the administration of *E. carlinae*. The results demonstrate the hypolipidemic potential of ethanol extract of *E. carlinae* and support its use in traditional medicine as a hypolipidemic agent.

**KEYWORDS:** • atorvastatin • cholesterol • diabetes • lipids • medicinal plant

### INTRODUCTION

**D**IABETES MELLITUS (DM) is a chronic and progressive metabolic disorder characterized by hyperglycemia due to absolute or relative deficiency of insulin.<sup>1</sup> It is estimated that there are ~425 million adults living with diabetes in the world, a figure that could reach 629 million by 2045. DM is a risk factor for the development of cardiovascular disease (CVD), which in turn is the main cause of death of people with diabetes.<sup>2</sup> Abnormalities in lipoprotein metabolism, associated with increased risk of CVD, are frequent in people with diabetes. Among the characteristics of diabetic dyslipidemia are low levels of high-density lipoprotein cholesterol (C-HDL) and high levels of triglyceride (TG) and low-density lipoprotein cholesterol (C-LDL).<sup>3</sup> Among the actions that contribute to preventing or delaying CVD in people with diabetes is controlling glucose and dyslipidemias.<sup>2</sup> In addition to diet and exercise, medication to treat lipid disorders is necessary for most patients with diabetes, and statins are the drugs most commonly used to

correct them.<sup>4</sup> Atorvastatin, a statin, inhibits 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase, a key enzyme in cholesterol biosynthesis, lowering circulating cholesterol levels.<sup>5</sup> However, in chronic consumption of statins, the appearance of drug interactions and adverse effects is frequent.<sup>6</sup>

Although a wide variety of medicines are currently available to treat dyslipidemia and other conditions, people around the world maintain a strong attachment to the use of medicinal plants to cure diseases. Their use is based on knowledge acquired with their consumption and transmitted from generation to generation, becoming part of the culture of a population.<sup>7</sup> Therefore, knowing that the plants are used without any prescription, we cannot neglect to consider the effect they may have when consumed either alone or in conjunction with conventional medicine. Hence, it is important to study medicinal plants to ensure their effectiveness and safety in consumption. Many plants are used in traditional medicine to treat diabetes; however, few plants have proven their effectiveness, such as *Ocimum tenuiflorum* L. and *Trigonella foenum-graecum* L., whose use are supported by clinical data.<sup>8</sup> The purpose of this study was to contribute to the evidence on the beneficial effects of consuming the ethanolic extract of *Eryngium carlinae* F. Delaroche (EC) to improve lipid alterations in diabetes.

Manuscript received 21 August 2019. Revision accepted 23 October 2019.

Address correspondence to: Alfredo Saavedra-Molina, PhD, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio B-3, C.U., Morelia 58030, México. E-mail: saavedra@umich.mx

Article

# Gestational Diabetes Triggers Oxidative Stress in Hippocampus and Cerebral Cortex and Cognitive Behavior Modifications in Rat Offspring: Age- and Sex-Dependent Effects

Maribel Huerta-Cervantes <sup>1</sup> , Donovan J. Peña-Montes <sup>1,2</sup> , Rocío Montoya-Pérez <sup>1</sup> ,  
 Xóchitl Trujillo <sup>2</sup> , Miguel Huerta <sup>2</sup> , Miguel Ángel López-Vázquez <sup>3</sup>,  
 María Esther Olvera-Cortés <sup>3,\*</sup> and Alfredo Saavedra-Molina <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 58030 Morelia, Mich., Mexico; marzy112@yahoo.com.mx (M.H.-C.); yodonnie@gmail.com (D.J.P.-M.); rmontoya@umich.mx (R.M.-P.)

<sup>2</sup> Centro Universitario de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Colima, 28045 Colima, Colima, Mexico; rosio@uacol.mx (X.T.); huertam@uacol.mx (M.H.)

<sup>3</sup> Centro de Investigación Biomédica de Michoacán, Instituto Mexicano del Seguro Social, 58341 Morelia, Mich., Mexico; migangelv@yahoo.com.mx

\* Correspondence: saavedra@umich.mx (A.S.-M.); maesolco@yahoo.com (M.E.O.-C.);  
 Tel.: +52-443-326-5790 (A.S.-M.); + 52-443-322-2600 (M.E.O.-C.)

Received: 23 November 2019; Accepted: 27 January 2020; Published: 31 January 2020



**Abstract:** Gestational diabetes (GD) has been linked with an increased risk of developing metabolic disorders and behavioral abnormalities in the offspring. Oxidative stress is strongly associated with neurodegeneration and cognitive disruption. In the offspring brains in a GD experimental rat model, increased oxidative stress in the prenatal and postnatal stages was reported. However, long-term alterations to offspring behavior and oxidative stress, caused by changes in the cerebral cortex and hippocampus, remain unclear. In this study, we evaluated the effect of GD on young and adult male and female rat offspring in metabolic parameters, cognitive behavior, and oxidative stress. GD was induced using streptozotocin in dams. Next, the offspring were evaluated at two and six months of age. Anxiety-like behavior was evaluated using the elevated plus maze and open field maze; spatial learning and short-term memory were evaluated using the Morris water maze and radial maze, respectively. We determined oxidative stress biomarkers (reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation and glutathione status) and antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in the brain of offspring. We observed that male GD offspring showed a reduced level of anxiety at both ages as they spent less time in the closed arms of the elevated plus maze at adult age ( $P = 0.019$ ,  $d = 1.083$  (size effect)) and spent more time in the open area of an open field ( $P = 0.0412$ ,  $d = 0.743$ ) when young and adult age ( $P = 0.018$ ,  $d = 0.65$ ). Adult female GD offspring showed a reduced level of anxiety ( $P = 0.036$ ;  $d = 0.966$ ), and young female GD offspring showed a deficiency in spatial learning ( $P = 0.0291$  vs. control,  $d = 3.207$ ). Adult male GD offspring showed a deficiency in short-term memory ( $P = 0.017$ ,  $d = 1.795$ ). We found an increase in ROS and lipid peroxidation, a disruption in the glutathione status, and decreased activity of catalase and superoxide dismutase ( $P < 0.05$  vs. control,  $d > 1.0$ ), in the cerebral cortex and hippocampus of male and female GD offspring. GD altered metabolism; male offspring of both ages and adult females showed a high level of triglycerides and a lower level of high-density lipoprotein-cholesterol ( $P < 0.05$  vs. control,  $d > 1.0$ ). Young and adult female offspring displayed higher insulin levels ( $P < 0.05$ ,  $d > 1.0$ ). These results suggest that gestational diabetes modifies oxidative stress and cognitive behavior in an age- and sex-dependent manner.

## ARTÍCULO

### Un delicado balance entre la diabetes y el hierro

Donovan Javier Peña Montes y Alfredo Saavedra Molina



*Donovan Javier Peña Montes*, estudiante del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Experimental del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. [yodonnie@gmail.com](mailto:yodonnie@gmail.com)

*Alfredo Saavedra Molina*, Profesor e Investigador en el Laboratorio de Bioquímica del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. [saavedra@umich.mx](mailto:saavedra@umich.mx)

**E**l hierro es un metal que juega un papel fundamental en casi todos los organismos, incluidos nosotros los seres humanos; no obstante, un exceso o una falta de éste, puede ser perjudicial. En este sentido, los niveles de hierro se deben mantener **delicadamente equilibrados**, ya que el hierro intracelular en exceso, es una fuente y un amplificador de especies reactivas de oxígeno y, por lo tanto, tóxico a concentraciones elevadas.

En este artículo te mostramos la importancia de este elemento, el **hierro**, en relación con la enfermedad crónica llamada **diabetes mellitus**, enfermedad metabólica de carácter mundial y que

Article

# Effects of Apocynin on Heart Muscle Oxidative Stress of Rats with Experimental Diabetes: Implications for Mitochondria

Estefanía Bravo-Sánchez <sup>1,†</sup>, Donovan Peña-Montes <sup>1,†</sup>, Sarai Sánchez-Duarte <sup>1</sup>, Alfredo Saavedra-Molina <sup>1</sup>, Elizabeth Sánchez-Duarte <sup>2,\*</sup> and Rocío Montoya-Pérez <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Francisco J. Múgica S/N, Col. Felicitas del Río, Morelia 58030, Michoacán, Mexico; 1541910b@umich.mx (E.B.-S.); 0618853j@umich.mx (D.P.-M.); 1315649c@umich.mx (S.S.-D.); saavedra@umich.mx (A.S.-M.)
- <sup>2</sup> Departamento de Ciencias Aplicadas al Trabajo, Universidad de Guanajuato Campus León, Eugenio Garza Sada 572, Lomas del Campestre Sección 2, León 37150, Guanajuato, Mexico
- \* Correspondence: elizabeth.sanchez@ugto.mx (E.S.-D.); rmontoya@umich.mx (R.M.-P.); Tel.: +521-477-2670-4900 (ext. 4833) (E.S.-D.); +521-(443)-322-3500 (ext. 4217) (R.M.-P.)
- † These authors contributed in the same way and amount.



**Citation:** Bravo-Sánchez, E.; Peña-Montes, D.; Sánchez-Duarte, S.; Saavedra-Molina, A.; Sánchez-Duarte, E.; Montoya-Pérez, R. Effects of Apocynin on Heart Muscle Oxidative Stress of Rats with Experimental Diabetes: Implications for Mitochondria. *Antioxidants* **2021**, *10*, 335. <https://doi.org/10.3390/antiox10030335>

Academic Editor: Cristina Carvalho

Received: 18 January 2021

Accepted: 20 February 2021

Published: 24 February 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Diabetes mellitus (DM) constitutes one of the public health problems today. It is characterized by hyperglycemia through a defect in the  $\beta$ -cells function and/or decreased insulin sensitivity. Apocynin has been tested acting directly as an NADPH oxidase inhibitor and reactive oxygen species (ROS) scavenger, exhibiting beneficial effects against diabetic complications. Hence, the present study's goal was to dissect the possible mechanisms by which apocynin could mediate its cardio-protective effect against DM-induced oxidative stress. Male Wistar rats were assigned into 4 groups: Control (C), control + apocynin (C+A), diabetes (D), diabetes + apocynin (D+A). DM was induced with streptozotocin. Apocynin treatment (3 mg/kg/day) was applied for 5 weeks. Treatment significantly decreased blood glucose levels and insulin resistance in diabetic rats. In cardiac tissue, ROS levels were higher, and catalase enzyme activity was reduced in the D group compared to the C group; the apocynin treatment significantly attenuated these responses. In heart mitochondria, Complexes I and II of the electron transport chain (ETC) were significantly enhanced in the D+A group. Total glutathione, the level of reduced glutathione (GSH) and the GSH/oxidized glutathione (GSSG) ratio were increased in the D+A group. Superoxide dismutase (SOD) and the glutathione peroxidase (GSH-Px) activities were without change. Apocynin enhances glucose uptake and insulin sensitivity, preserving the antioxidant defense and mitochondrial function.

**Keywords:** antioxidant; apocynin; diabetes; heart mitochondria; oxidative stress

## 1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is considered an epidemic disease and is one of the fastest-growing challenges of the 21st century. The continued increase is mainly due to progressive urbanization, aging, rising obesity levels, unhealthy diets, tobacco use, and generalized physical inactivity [1]. DM can cause numerous health-weakening complications, decrease quality of life, and cause early death. It is associated with vascular and heart diseases, such as high blood pressure, coronary artery disease, and heart failure, responsible for increased morbidity and mortality [2,3]. The set of cardiovascular diseases causes about 80% of the deaths of diabetic patients. In turn, it has been linked to a broad spectrum of cardiovascular disorders, leading to atherogenesis, endothelial dysfunction, inflammation, vascular remodeling, and oxidative stress [4,5]. The increase in the production of reactive oxygen species (ROS) caused by metabolic changes triggered by diabetes is considered an essential factor in generating heart problems [6,7]. Oxidative stress during DM plays a crucial role in regulating coronary blood flow in response to myocardial metabolism (4) and

## CHAPTER 8

# Mitochondrial metabolism in diabetes

**Alfredo Saavedra-Molina, Christian Cortés-Rojo, Rocío Montoya-Pérez, Rafael Salgado-Garciglia, Donovan J. Peña-Montes, and Maribel Huerta-Cervantes**

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacan, Mexico

## Contents

1	Introduction	179
2	Medicinal plants in diabetes	181
2.1	Avocado oil in diabetes	182
	References	188

## 1 Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a chronic degenerative disease characterized by chronic high blood glucose levels (hyperglycemia). The International Diabetes Federation<sup>1</sup> classifies DM into type 1 diabetes mellitus, type 2 diabetes mellitus, gestational diabetes, and other specific types. Chronic hyperglycemia in diabetes is associated with long-term complications that affect various organs and tissues, including the eyes, nerves, liver, muscle, heart, and kidneys.<sup>2</sup> The incidence and prevalence of type 2 diabetes mellitus (DM2) has increased in recent years. DM2 is the most common form of diabetes (90%–95%) and is characterized by glucose intolerance or insulin resistance and abnormalities in insulin production in pancreatic  $\beta$  cells or insulin-dependent tissues. Abnormalities in the metabolism of lipids are one of the most frequent complications in diabetes.<sup>3</sup> Dyslipidemia (disruption in the normal levels of lipids, mainly cholesterol, and triglycerides) is considered a major cardiovascular risk factor in diabetes.<sup>3</sup> Therefore the detection of dyslipidemia and its treatment to reduce the cardiovascular risk and its consequences are required in diabetic patients.<sup>3</sup> Hyperglycemia can also stimulate the generation of reactive oxygen species (ROS) from different sources, such as oxidative phosphorylation, NADPH oxidase, xanthine oxidase, among others.<sup>4</sup> The development of diabetic encephalopathy is a multifactorial process in which both vascular and metabolic

Article

# Effects of Gestational Diabetes in Cognitive Behavior, Oxidative Stress and Metabolism on the Second-Generation Off-Spring of Rats

Maribel Huerta-Cervantes <sup>1</sup>, Donovan J. Peña-Montes <sup>1</sup>, Miguel Ángel López-Vázquez <sup>2</sup>,  
Rocío Montoya-Pérez <sup>1</sup>, Christian Cortés-Rojo <sup>1</sup>, María Esther Olvera-Cortés <sup>2,\*</sup>  
and Alfredo Saavedra-Molina <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia 58030, Michoacán, Mexico; marzy112@yahoo.com.mx (M.H.-C.); yodonne@gmail.com (D.J.P.-M.); rmontoya@umich.mx (R.M.-P.); christian.cortes@umich.mx (C.C.-R.)  
<sup>2</sup> Centro de Investigación Biomédica de Michoacán, Instituto Mexicano del Seguro Social, Morelia 58341, Michoacán, Mexico; migangelv@yahoo.com.mx  
\* Correspondence: maesolco@yahoo.com (M.E.O.-C.); saavedra@umich.mx (A.S.-M.);  
Tel.: +52-443-322-2600 (M.E.O.-C.); +52-443-326-5790 (A.S.-M.)



**Citation:** Huerta-Cervantes, M.; Peña-Montes, D.J.; López-Vázquez, M.Á.; Montoya-Pérez, R.; Cortés-Rojo, C.; Olvera-Cortés, M.E.; Saavedra-Molina, A. Effects of Gestational Diabetes in Cognitive Behavior, Oxidative Stress and Metabolism on the Second-Generation Off-Spring of Rats. *Nutrients* **2021**, *13*, 1575. <https://doi.org/10.3390/nu13051575>

Academic Editor: Clive J. Petry

Received: 3 March 2021

Accepted: 4 May 2021

Published: 8 May 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Gestational diabetes (GD) has a negative impact on neurodevelopment, resulting in cognitive and neurological deficiencies. Oxidative stress (OS) has been reported in the brain of the first-generation offspring of GD rats. OS has been strongly associated with neurodegenerative diseases. In this work, we determined the effect of GD on the cognitive behavior, oxidative stress and metabolism of second-generation offspring. GD was induced with streptozotocin (STZ) in pregnant rats to obtain first-generation offspring (F1), next female F1 rats were mated with control males to obtain second-generation offspring (F2). Two and six-month-old F2 males and females were employed. Anxious-type behavior, spatial learning and spatial working memory were evaluated. In cerebral cortex and hippocampus, the oxidative stress and serum biochemical parameters were measured. Male F2 GD offspring presented the highest level of anxiety-type behavior, whilst females had the lowest level of anxiety-type behavior at juvenile age. In short-term memory, adult females presented deficiencies. The offspring F2 GD females presented modifications in oxidative stress biomarkers in the cerebral cortex as lipid-peroxidation, oxidized glutathione and catalase activity. We also observed metabolic disturbances, particularly in the lipid and insulin levels of male and female F2 GD offspring. Our results suggest a transgenerational effect of GD on metabolism, anxiety-like behavior, and spatial working memory.

**Keywords:** gestational diabetes; second-generation; offspring; anxiety; hippocampus; cerebral cortex; spatial working memory; metabolism; oxidative stress

## 1. Introduction

It is estimated that 21.3 million live births worldwide are affected by some type of hyperglycemia in pregnancy, of which 83% are due to GD and currently, one in six pregnancies are affected by GD [1]. The transport of glucose across the placenta affects the pregnant woman's metabolic status and interferes with fetal development [2]. Diabetes during pregnancy causes an abnormal intrauterine metabolic state that in extreme cases results in congenital malformations and neonatal hypoglycemia depending on the severity of diabetes [3,4]. These alterations have short- and long-term consequences, including birth weight changes, insulin resistance, obesity, and diabetes [5,6]. Exposure to an adverse intrauterine environment, including hyperglycemia and hyperinsulinemia, programs the development of offspring in a way that can affect more than one generation through epigenetic changes [7]. Previous studies have shown that second-generation offspring

## Article

# Hypolipidemic and Antioxidant Effects of *Guishe* Extract from *Agave lechuguilla*, a Mexican Plant with Biotechnological Potential, on Streptozotocin-Induced Diabetic Male Rats

Edgar R. Esquivel-Gutiérrez <sup>1</sup> , Salvador Manzo-Avalos <sup>2</sup>, Donovan J. Peña-Montes <sup>2</sup> , Alfredo Saavedra-Molina <sup>2</sup> , Zoé P. Morreeuw <sup>1</sup>  and Ana G. Reyes <sup>3,\*</sup> 

<sup>1</sup> Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C., Av. Instituto Politécnico Nacional 195, Col. Playa Palo de Santa Rita Sur, La Paz C.P. 23096, Baja California Sur, Mexico; edgar.esquivel@umich.mx (E.R.E.-G.); zpelletier@pg.cibnor.mx (Z.P.M.)

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones, Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia C.P. 58030, Michoacan, Mexico; smanzo@umich.mx (S.M.-A.); 0618853j@umich.mx (D.J.P.-M.); saavedra@umich.mx (A.S.-M.)

<sup>3</sup> CONACYT—Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C., Av. Instituto Politécnico Nacional 195, Col. Playa Palo de Santa Rita Sur, La Paz C.P. 23096, Baja California Sur, Mexico

\* Correspondence: agalvarado@cibnor.mx; Tel.: +52-61212-38484 (ext. 5129)



**Citation:** Esquivel-Gutiérrez, E.R.; Manzo-Avalos, S.; Peña-Montes, D.J.; Saavedra-Molina, A.; Morreeuw, Z.P.; Reyes, A.G. Hypolipidemic and Antioxidant Effects of *Guishe* Extract from *Agave lechuguilla*, a Mexican Plant with Biotechnological Potential, on Streptozotocin-Induced Diabetic Male Rats. *Plants* **2021**, *10*, 2492. <https://doi.org/10.3390/plants10112492>

Academic Editor: Corina Danciu

Received: 23 October 2021

Accepted: 11 November 2021

Published: 18 November 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** In the present study, we used a by-product from *Agave lechuguilla* (*guishe*) to test its antidiabetic effect, hypolipidemic activity, and capacity to mitigate the oxidative stress in kidney mitochondria from streptozotocin-induced diabetic rats. Orally, a crude aqueous extract from lyophilized *guishe* was administered over 5 weeks at different doses. Blood glucose and body weight were monitored. Also, blood chemistry, bilirubin, and alanine aminotransferase were assayed. Furthermore, the activity of catalase, thiobarbituric acid reactive species, mitochondrial superoxide dismutase, glutathione and glutathione peroxidase were determined in isolated kidney mitochondria. Our results show that *guishe* extracts have no antidiabetic properties at any dose. Nevertheless, it was able to diminish serum triglyceride levels and regulate the oxidative stress observed in isolated kidney mitochondria. These observations indicate that the aqueous extract from *guishe* can be used to treat abnormalities in serum lipids, as a hypolipidemic, and mitigate the oxidative stress, as an antioxidant, occurring during diabetes.

**Keywords:** diabetes; dyslipidemias; flavonoids; oxidative stress; saponins

## 1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a long-lasting health condition that affects glucose metabolism. Over time, it is also a strong and common risk factor for chronic kidney disease, nephropathy being the most common cause for end-stage renal disease [1]. In 2019, the number of people with DM increased globally by over two times more than during the last three decades. In Mexico, it has been growing steadily at approximately 25% every six years since 2000 [2]; for this reason, DM remains the most important public health problem worldwide [3]. Historically, the diagnosis of DM was presumptively made based on symptomatology. Nonetheless, in the current times, a simple blood test can effectively diagnose this pathology [4].

Diabetic patients have an increased risk of developing cardiovascular diseases, due to the altered lipid metabolism. Abnormal serum lipids are frequently present before diabetes onset; thus, dyslipidemia (high triglycerides and cholesterol) becomes a cardiovascular risk factor for DM and its complications. Due to the latter, lipid control and careful monitoring are typically recommended [5]. Notwithstanding, not only do hyperglycemia and lipid alterations affect health conditions, but increased oxidative stress also causes impairment in physiological functions [6]. Oxidative stress could be mitigated by the main antioxidant



## Article

# Dietary Iron Restriction Improves Muscle Function, Dyslipidemia, and Decreased Muscle Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

Manuel Alejandro Vargas-Vargas <sup>1</sup>, Alfredo Saavedra-Molina <sup>1</sup> , Mariana Gómez-Barroso <sup>1</sup>, Donovan Peña-Montes <sup>1</sup> , Christian Cortés-Rojo <sup>1</sup> , Huerta Miguel <sup>2</sup> , Xochitl Trujillo <sup>2</sup> and Rocío Montoya-Pérez <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Francisco J. Múgica S/N, Col. Felicitas del Río, Morelia 58030, Mexico; 1371614e@umich.mx (M.A.V.-V.); francisco.saavedra@umich.mx (A.S.-M.); 0939531k@umich.mx (M.G.-B.); 0618853j@umich.mx (D.P.-M.); christian.cortes@umich.mx (C.C.-R.)

<sup>2</sup> Centro Universitario de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Colima, Av. 25 de Julio 965, Las Víboras, Colima 24040, Mexico; huertam@uocol.mx (H.M.); rosio@uocol.mx (X.T.)

\* Correspondence: rocio.montoya@umich.mx



**Citation:** Vargas-Vargas, M.A.; Saavedra-Molina, A.; Gómez-Barroso, M.; Peña-Montes, D.; Cortés-Rojo, C.; Miguel, H.; Trujillo, X.; Montoya-Pérez, R. Dietary Iron Restriction Improves Muscle Function, Dyslipidemia, and Decreased Muscle Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Antioxidants* **2022**, *11*, 731. <https://doi.org/10.3390/antiox11040731>

Academic Editors: Sérgio Paulo Bydlowski, José Carlos Toledo Junior and Débora Levy

Received: 8 March 2022

Accepted: 5 April 2022

Published: 7 April 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Diabetes mellitus is a chronic degenerative disease characterized by hyperglycemia and oxidative stress. Iron catalyzes free radical overproduction. High iron concentrations have previously been reported to promote an increase in oxidative stress; however, the effect of iron restriction in diabetes has not yet been explored, so we tested to see if iron restriction in diabetic rats reduces oxidative damage and improved muscle function. Wistar rats were assigned to 4 groups: Control; Diabetic; Diabetic rats with a high iron diet, and Diabetic with dietary iron restriction. After 8 weeks the rats were sacrificed, the muscles were extracted to prepare homogenates, and serum was obtained for biochemical measurements. Low iron diabetic rats showed an increase in the development of muscle strength in both muscles. Dietary iron restriction decreased triglyceride concentrations compared to the untreated diabetic rats and the levels of extremely low-density lipoproteins. Aggravation of lipid peroxidation was observed in the diabetic group with a high iron diet, while these levels remained low with iron restriction. Iron restriction improved muscle strength development and reduced fatigue times; this was related to better lipid profile control and decreased oxidant stress markers.

**Keywords:** diabetes; fatigue; iron; oxidative stress

## 1. Introduction

Diabetes mellitus is characterized by metabolic dysfunction resulting from changes in insulin secretion and/or resistance to its actions [1]. Chronic hyperglycemia in diabetes increases oxidative stress, causing cell damage that eventually leads to acute and chronic complications [2–4]. Muscle fatigue is an acute symptom of diabetes, causing loss of strength and mass in muscle [5]. Oxidative stress is a key factor involved in the development of muscle fatigue [6,7]. Dyslipidemia is another hallmark of diabetes associated with a higher risk of cardiovascular disease [8]; hereby, the decrease in blood lipids improves cardiovascular outcomes [9,10]. Dyslipidemia has been related to impaired muscle function in rodents [11] and humans [12]. Thus, dyslipidemia may enhance the deleterious effects of oxidative stress on muscles.

On the other hand, high intracellular iron concentrations (i.e., iron overload) enhance oxidative stress by catalyzing ROS production via the iron/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-based formation of hydroxyl radicals [13]. Oxidative stress due to iron overload accelerates both the development and progression of diabetic complications [14,15]. Accordingly, the role of iron overload in the impaired metabolism of lipids and carbohydrates has been confirmed in diabetic

## Article

# Antilipidemic and Hepatoprotective Effects of Ethanol Extract of *Justicia spicigera* in Streptozotocin Diabetic Rats

Marina Murillo-Villicaña <sup>1</sup>, Ruth Noriega-Cisneros <sup>2</sup>, Donovan J. Peña-Montes <sup>1</sup> , Maribel Huerta-Cervantes <sup>1</sup> , Asdrubal Aguilera-Méndez <sup>1</sup> , Christian Cortés-Rojo <sup>1</sup> , Rafael Salgado-Garciglia <sup>1</sup> , Rocío Montoya-Pérez <sup>1</sup>, Héctor Riveros-Rosas <sup>3</sup>  and Alfredo Saavedra-Molina <sup>1,\*</sup> 

- <sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia 58030, Mexico; 0850421k@umich.mx (M.M.-V.); 0618853j@umich.mx (D.J.P.-M.); marzy112@yahoo.com.mx (M.H.-C.); amendez@umich.mx (A.A.-M.); christian.cortes@umich.mx (C.C.-R.); rafael.salgado@umich.mx (R.S.-G.); rocio.montoya@umich.mx (R.M.-P.)
- <sup>2</sup> Facultad de Enfermería, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia 58030, Mexico; ruth.noriega@umich.mx
- <sup>3</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, Cd. Universitaria, Ciudad de México 04510, Mexico; hriveros@unam.mx
- \* Correspondence: francisco.saavedra@umich.mx; Tel.: +52-443-326-5790



**Citation:** Murillo-Villicaña, M.; Noriega-Cisneros, R.; Peña-Montes, D.J.; Huerta-Cervantes, M.; Aguilera-Méndez, A.; Cortés-Rojo, C.; Salgado-Garciglia, R.; Montoya-Pérez, R.; Riveros-Rosas, H.; Saavedra-Molina, A. Antilipidemic and Hepatoprotective Effects of Ethanol Extract of *Justicia spicigera* in Streptozotocin Diabetic Rats. *Nutrients* **2022**, *14*, 1946. <https://doi.org/10.3390/nu14091946>

Academic Editor: Anna Alisi

Received: 27 March 2022

Accepted: 4 May 2022

Published: 6 May 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Oxidative stress is a factor that contributes to the development of complications in diabetes; however, its effects can be counteracted using exogenous antioxidants that are found in some plants, which is why people turn to traditional medicines in the search for therapeutic treatment. *Justicia spicigera* has been demonstrated to have the capacity to reduce glycemic levels; however, its effects on non-insulin-dependent organs such as the liver have not been reported. During 30 days of administration of *Justicia spicigera* ethanol extract, the blood glucose and weight of rats were measured every 5 days. Once the treatment was concluded, the rats were sacrificed. Corporal weight, blood glucose, cholesterol, very-low-density lipoprotein (VLDL), triglycerides, total lipids, and liver profile were reduced in the diabetic condition and normalized with the application of ethanol extract from *J. spicigera* (EJS). Additionally, there was a significant increase in catalase and superoxide dismutase activity in the control diabetic rats, a decrease in their activity with the extract administration, and no effect on normoglycemic rats. In conclusion, EJS is considered to be capable of reducing oxidative stress by maintaining diminished lipid and liver function profiles in male Wistar rats with streptozotocin-induced diabetes.

**Keywords:** antioxidant; bioactive compounds; diabetes; *Justicia spicigera*; liver; streptozotocin

## 1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a heterogeneous set of multifactorial pathogenetic syndromes with a common nexus of metabolic disorder, mainly chronic hyperglycemia and alterations in lipid and protein metabolism. Glucose transportation through the plasma membrane of mammalian cells is one of the most important events of nutrient transport, since this monosaccharide has a central role in metabolism and cell homeostasis. To transport glucose inside the cells, the organs in the body have different GLUT proteins, and they are divided into two groups. One group is insulin-dependent, including skeletal muscle, adipose tissue, and heart tissue, which have GLUT4 transporters [1]. The other group is tissues that do not depend on insulin to transport glucose inside them, such as the brain, kidney, and erythrocytes, and the epithelial cells of the intestine and liver [1].

The liver performs several biochemical functions of synthesis and excretion, so there is no test that can define the state of total liver function. The National Academy of Clinical Biochemistry and the American Association for the Study of Liver Diseases recommend a specific panel of tests to be used in the initial evaluation of patients with known or

## Article

# Comparative Effect of Three Different Exercise Intensities in Combination with Diazoxide on Contraction Capacity and Oxidative Stress of Skeletal Muscle in Obese Rats

Mariana Gómez-Barroso <sup>1</sup>, Manuel A. Vargas-Vargas <sup>1</sup>, Donovan J. Peña-Montes <sup>1</sup> , Christian Cortés-Rojo <sup>1</sup> , Alfredo Saavedra-Molina <sup>1</sup>, Elizabeth Sánchez-Duarte <sup>2</sup> , Alain R. Rodríguez-Orozco <sup>3</sup> , and Rocio Montoya-Pérez <sup>1,\*</sup> 

- <sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Francisco J. Múgica S/N, Col. Felicitas del Río, Morelia 58030, Mexico
  - <sup>2</sup> Departamento de Ciencias Aplicadas al Trabajo, Universidad de Guanajuato, Campus León, Eugenio Garza Sada 572, Lomas del Campestre Sección 2, León 37150, Mexico
  - <sup>3</sup> Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chavez”, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo Av. Dr. Rafael Carrillo S/N Esq. Dr. Salvador González Herrejon, Bosque Cuauhtémoc, Morelia 58020, Mexico
- \* Correspondence: rocio.montoya@umich.mx



**Citation:** Gómez-Barroso, M.; Vargas-Vargas, M.A.; Peña-Montes, D.J.; Cortés-Rojo, C.; Saavedra-Molina, A.; Sánchez-Duarte, E.; Rodríguez-Orozco, A.R.; Montoya-Pérez, R. Comparative Effect of Three Different Exercise Intensities in Combination with Diazoxide on Contraction Capacity and Oxidative Stress of Skeletal Muscle in Obese Rats. *Biology* **2022**, *11*, 1367. <https://doi.org/10.3390/biology11091367>

Academic Editors: Juana María Sanz and Luis Carrasco Páez

Received: 19 August 2022  
Accepted: 14 September 2022  
Published: 17 September 2022

**Publisher’s Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Simple Summary:** Obesity is a growing public health problem worldwide. It is a pathological state that degrades the proper functioning of skeletal muscle. Diazoxide treatment and exercise have been shown to generally improve muscle function. However, the effect that each of the different exercise intensities has when combined with diazoxide on the contraction capacity, resistance to fatigue and oxidative stress levels in rat skeletal muscle is unknown. Therefore, this work focused on analyzing which exercise intensity was more efficient in combination with diazoxide in improving muscle tissue and its metabolic capacities. The best results were obtained with low- and moderate-intensity exercise when combined with the drug. These results expected to open a window of time that allows the implementation of a constant and prolonged exercise protocol that completely reverses the harmful effects of obesity on muscle tissue and obesity itself.

**Abstract:** Obesity is a chronic disease that impairs skeletal muscle function, affects the ability to contract, and promotes the development of fatigue. For this reason, the study of treatments that seek to reduce the harmful effects of obesity on muscle tissue has been deepened. Diazoxide treatment and various exercise protocols have been proposed to protect skeletal muscle against oxidative stress and its effects. However, the intensity and duration of exercise combined with diazoxide that would obtain the best results for improving skeletal muscle function in obese rats is unknown. To this end, this study evaluated the effects of three different exercise intensities combined with diazoxide on contraction capacity, resistance to fatigue, markers of oxidative stress, lipid peroxidation, ROS, and glutathione redox status of skeletal muscle. The results showed that treatments with diazoxide and exercise at different intensities improved muscle contraction capacity by reducing oxidative stress during obesity, with the best results being obtained with low-intensity exercise in combination with diazoxide. Therefore, these results suggest that diazoxide and low-intensity exercise improve muscle function during obesity by decreasing oxidative stress with the same efficiency as a moderate-intensity exercise protocol.

**Keywords:** skeletal muscle; obesity; fatigue; oxidative stress; exercise; diazoxide

## 1. Introduction

Obesity is a chronic disease triggered by multiple factors, including disordered eating, lack of physical activity and sedentary lifestyle, or metabolic, hormonal, or genetic



## Diazoxide improves muscle function in association with improved dyslipidemia and decreased muscle oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats

Manuel Alejandro Vargas-Vargas<sup>1</sup> · Alfredo Saavedra-Molina<sup>1</sup> · Mariana Gómez-Barroso<sup>1</sup> · Donovan Peña-Montes<sup>1</sup> · Christian Cortés-Rojo<sup>1</sup> · Alain R. Rodríguez-Orozco<sup>2</sup> · Montoya-Pérez Rocío<sup>1</sup>

Received: 30 November 2022 / Accepted: 22 January 2023

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2023

### Abstract

**Aim/Introduction:** Diabetes Mellitus is a chronic degenerative disease, and its main biochemical characteristic is hyperglycemia due to impaired insulin secretion, resistance to peripheral actions of insulin, or both. Hyperglycemia causes dyslipidemia and stimulates oxidative damage, leading to the main symptoms, such as fatigue and culminates in diabetic complications. Previous studies have shown that ATP-sensitive potassium channels counteract muscle fatigue and metabolic stress in healthy mouse models. To determine the effect of diazoxide on muscle strength development during diabetes, we tested the effect of diazoxide in streptozotocin-diabetic rats in muscle function, lipid profile and oxidative stress biomarkers. **Materials and methods:** Wistar rats were divided into 4 groups of six animals each: (1) Control group, (2) diabetes group, (3) Control group + diazoxide, and (4) Diabetic + diazoxide (DB + DZX). 4 weeks after rats were sacrificed, soleus and extensor digitorum longus muscles (EDL) were extracted to prepare homogenates and serum was obtained for biochemical measurements. Oxidative damage was evaluated by the thiobarbituric acid method and the fluorescent probe for reactive oxygen species (ROS) probe 2,4-H<sub>2</sub>DCFDA, respectively. **Results:** Diabetic rats with diazoxide administration showed an increase in the development of muscle strength in both muscles; in turn, the onset of fatigue was longer compared to the group of diabetic rats without treatment. Regarding the lipid profile, diazoxide decreased total cholesterol levels in the group of diabetic rats treated with diazoxide ( $\bar{x}$ 46.2 mg/dL) compared to the untreated diabetic group ( $\bar{x}$ =104.4 mg/dL); secondly, diazoxide decreased triglyceride concentrations ( $\bar{x}$ =105.3 mg/dL) compared to the untreated diabetic rats ( $\bar{x}$ =412.2 mg/dL) as well as the levels of very low-density lipoproteins ( $\bar{x}$ =20.4 mg/dL vs.  $\bar{x}$ =82.44 mg/dL). Regarding the various markers of oxidative stress, the diabetic group treated with diazoxide was able to reduce the concentrations of TBARS and total reactive oxygen species as well as preserve the concentrations of reduced glutathione. **Conclusion:** Diazoxide administration in diabetic rats increases muscle strength development in EDL and soleus muscle, decreases fatigue, reduces cholesterol and triglyceride concentrations and improves oxidative stress parameters such as TBARS, ROS, and glutathione status.

**Keywords** Diabetes · Diazoxide · Oxidative stress · Lipid profile

✉ Montoya-Pérez Rocío  
rocio.montoya@umich.mx

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas,  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo,  
Francisco J. Múgica S/N, Col. Felicitas del Río,  
58030 Morelia, Michoacán, México

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio  
Chávez", Universidad Michoacana de San Nicolás de  
Hidalgo, Av. Dr. Rafael Carrillo S/N, Esq. Dr. Salvador  
González Herrejón Bosque,  
58020, 58000 Cuauhtémoc, Morelia, Michoacán, México

### Introduction

Diabetes mellitus is a chronic metabolic disorder characterized by persistent hyperglycemia, which may be due to impaired insulin secretion, resistance to peripheral actions of insulin, or both (Goyal et al. 2022). In 2019, 463 million people had diabetes worldwide; over 70% of global deaths are due to non-communicable diseases, including respiratory disease, cancer, cardiovascular disease, and diabetes (Juliana et al. 2020). Hyperglycemia resulting from



## Article

# An Ethyl Acetate Extract of *Eryngium carlinae* Inflorescences Attenuates Oxidative Stress and Inflammation in the Liver of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

Cristian M. Trejo-Hurtado <sup>1</sup>, Cinthia I. Landa-Moreno <sup>1</sup>, Jenaro Lemus-de la Cruz <sup>1</sup>, Donovan J. Peña-Montes <sup>1</sup> , Rocío Montoya-Pérez <sup>1</sup> , Rafael Salgado-Garciglia <sup>1</sup> , Salvador Manzo-Avalos <sup>1</sup>, Christian Cortés-Rojo <sup>1</sup> , Juan Luis Monribot-Villanueva <sup>2</sup> , José Antonio Guerrero-Analco <sup>2</sup> and Alfredo Saavedra-Molina <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia 58030, Mexico; 1920749g@umich.mx (C.M.T.-H.); 1419561g@umich.mx (C.I.L.-M.); 1315680c@umich.mx (J.L.-d.l.C.); 0618853j@umich.mx (D.J.P.-M.); rmontoya@umich.mx (R.M.-P.); rsalgado@umich.mx (R.S.-G.); smanzo@umich.mx (S.M.-A.); christian.cortes@umich.mx (C.C.-R.)
- <sup>2</sup> Red de Estudios Moleculares Avanzados, Clúster BioMimic®, Instituto de Ecología, A.C., Xalapa 91073, Mexico; juan.monribot@inecol.mx (J.L.M.-V.); joseantonio.guerrero@inecol.mx (J.A.G.-A.)
- \* Correspondence: francisco.saavedra@umich.mx



**Citation:** Trejo-Hurtado, C.M.; Landa-Moreno, C.I.; la Cruz, J.L.-d.; Peña-Montes, D.J.; Montoya-Pérez, R.; Salgado-Garciglia, R.; Manzo-Avalos, S.; Cortés-Rojo, C.; Monribot-Villanueva, J.L.; Guerrero-Analco, J.A.; et al. An Ethyl Acetate Extract of *Eryngium carlinae* Inflorescences Attenuates Oxidative Stress and Inflammation in the Liver of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Antioxidants* **2023**, *12*, 1235. <https://doi.org/10.3390/antiox12061235>

Academic Editor: Zhihui Feng

Received: 15 May 2023

Revised: 31 May 2023

Accepted: 31 May 2023

Published: 7 June 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Secondary metabolites such as flavonoids are promising in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), which is one of the complications of diabetes due to oxidative stress and inflammation. Some plants, such as *Eryngium carlinae*, have been investigated regarding their medicinal properties in in vitro and in vivo assays, showing favorable results for the treatment of various diseases such as diabetes and obesity. The present study examined the antioxidant and anti-inflammatory effects of the phenolic compounds present in an ethyl acetate extract of the inflorescences of *Eryngium carlinae* on liver homogenates and mitochondria from streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. Phenolic compounds were identified and quantified by UHPLC-MS. In vitro assays were carried out to discover the antioxidant potential of the extract. Male Wistar rats were administered with a single intraperitoneal injection of STZ (45 mg/kg) and were given the ethyl acetate extract at a level of 30 mg/kg for 60 days. Phytochemical assays showed that the major constituents of the extract were flavonoids; in addition, the in vitro antioxidant activity was dose dependent with IC<sub>50</sub> = 57.97 mg/mL and IC<sub>50</sub> = 30.90 mg/mL in the DPPH and FRAP assays, respectively. Moreover, the oral administration of the ethyl acetate extract improved the effects of NAFLD, decreasing serum and liver triacylglycerides (TG) levels and oxidative stress markers and increasing the activity of the antioxidant enzymes. Likewise, it attenuated liver damage by decreasing the expression of NF-κB and iNOS, which lead to inflammation and liver damage. We hypothesize that solvent polarity and consequently chemical composition of the ethyl acetate extract of *E. carlinae*, exert the beneficial effects due to phenolic compounds. These results suggest that the phenolic compounds of the ethyl acetate extract of *E. carlinae* have antioxidant, anti-inflammatory, hypolipidemic, and hepatoprotective activity.

**Keywords:** antioxidants; anti-inflammatory activity; diabetes mellitus; *Eryngium carlinae*; phenolic compounds; rosmarinic acid

## 1. Introduction

Diabetes mellitus is a metabolic disorder characterized by increased blood glucose or hyperglycemia [1]. Hyperglycemia is one of the causes of the development of various complications such as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), in which there is an accumulation of lipids in the liver greater than 5–10%; in some cases, there is evidence of inflammation progressing to non-alcoholic steatohepatitis (NASH). This accumulation of lipids derived from an imbalance in their acquisition and disposition leads to metabolic



## Antioxidant effects of silver nanoparticles obtained by green synthesis from the aqueous extract of *Eryngium carlinae* on the brain mitochondria of streptozotocin-induced diabetic rats

Jenaro Lemus-de la Cruz<sup>1</sup> · Mitchell Trejo-Hurtado<sup>1</sup> · Cinthia Landa-Moreno<sup>1</sup> · Donovan Peña-Montes<sup>1</sup> · José Luis Landeros-Páramo<sup>2</sup> · Christian Cortés-Rojo<sup>1</sup> · Rocio Montoya-Pérez<sup>1</sup> · Gerardo Rosas<sup>2</sup> · Alfredo Saavedra-Molina<sup>1</sup>

Received: 12 February 2023 / Accepted: 20 March 2023

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2023

### Abstract

Diabetes mellitus is a metabolic disorder characterized by chronic hyperglycemia that affects practically all tissues and organs, being the brain one of most susceptible, due to overproduction of reactive oxygen species induced by diabetes. *Eryngium carlinae* is a plant used in traditional Mexican medicine to treat diabetes, which has already been experimentally shown have hypoglycemic, antioxidant and hypolipidemic properties. The green synthesis of nanoparticles is a technique that combines plant extracts with metallic nanoparticles, so that the nanoparticles reduce the absorption and distribution time of drugs or compounds, increasing their effectiveness. In this work, the antioxidant effects and mitochondrial function in the brain were evaluated, as well as the hypoglycemic and hypolipidemic effect in serum of both the aqueous extract of the aerial part of *E. carlinae*, as well as its combination with silver nanoparticles of green synthesis. Administration with both, extract and the combination significantly decreased the production of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and restored the activity of superoxide dismutase 2, glutathione peroxidase, and electron transport chain complexes in brain, while that the extract-nanoparticle combination decreased blood glucose and triglyceride levels. The results obtained suggest that both treatments have oxidative activity and restore mitochondrial function in the brain of diabetic rats.

**Keywords** Antioxidant · Brain mitochondria · Diabetes mellitus · Green synthesis · Nanoparticles · Oxidative stress

### Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disorder of multiple etiologies characterized by chronic hyperglycemia and alterations in the metabolism of carbohydrates, lipids, and proteins as a result of defects in the secretion or action of insulin or a combination of both (International Diabetes Federation 2021). DM is one of the main health problems worldwide. It is estimated that the number of people with

DM in 2021 will reach 537 million, and by 2045 the figure will increase to 783 million (International Diabetes Federation 2021). With development for several years, DM causes different complications that are classified as microvascular (neuropathy, retinopathy, and nephropathy) and macrovascular (peripheral arterial disease, cerebrovascular disease, and diabetic heart disease), which affect practically all tissues and organs (International Diabetes Federation 2021). One of the organs most affected by diabetes is the brain; since high glucose levels cause increased production of reactive oxygen species (ROS) that are highly reactive and can react with any macromolecule, altering its normal structure and function and exacerbating the complication and damage caused by DM (Islam 2017). Excess glucose generates a greater amount of mitochondrial substrates (Du et al. 2003; Nishikawa et al. 2000), which causes a greater electron leakage from the respiratory chain, especially in complexes I and III, and this ultimately increases ROS production (Sivitz and Yorek 2010). Increased ROS production

✉ Alfredo Saavedra-Molina  
francisco.saavedra@umich.mx

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia 58030, Mich, México

<sup>2</sup> Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia 58030, Mich, México

## Article

# Antioxidant Effect of the Ethyl Acetate Extract of *Potentilla indica* on Kidney Mitochondria of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

Cynthia I. Landa-Moreno <sup>1</sup>, Cristian M. Trejo-Hurtado <sup>1</sup>, Jenaro Lemus-de la Cruz <sup>1</sup>, Donovan J. Peña-Montes <sup>1</sup> , Marina Murillo-Villicaña <sup>1</sup>, Maribel Huerta-Cervantes <sup>1</sup> , Rocío Montoya-Pérez <sup>1</sup> , Rafael Salgado-Garciglia <sup>1</sup> , Salvador Manzo-Avalos <sup>1</sup>, Christian Cortés-Rojo <sup>1</sup> , Juan Luis Monribot-Villanueva <sup>2</sup> , José Antonio Guerrero-Analco <sup>2</sup>  and Alfredo Saavedra-Molina <sup>1,\*</sup> 

- <sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Francisco J. Múgica S/N, Morelia 58030, Michoacán, Mexico; 1419561g@umich.mx (C.I.L.-M.); 1920749g@umich.mx (C.M.T.-H.); 1315680c@umich.mx (J.L.-d.l.C.); 0618853j@umich.mx (D.J.P.-M.); 0850421k@umich.mx (M.M.-V.); 1505572g@umich.mx (M.H.-C.); rmontoya@umich.mx (R.M.-P.); rsalgado@umich.mx (R.S.-G.); smanzo@umich.mx (S.M.-A.); christian.cortes@umich.mx (C.C.-R.)
- <sup>2</sup> Red de Estudios Moleculares Avanzados, Clúster BioMimic, Instituto de Ecología, A.C., Xalapa 91073, Veracruz, Mexico; juan.monribot@inecol.mx (J.L.M.-V.); joseantonio.guerrero@inecol.mx (J.A.G.-A.)
- \* Correspondence: francisco.saavedra@umich.mx; Tel.: +52-443-326-5790



**Citation:** Landa-Moreno, C.I.; Trejo-Hurtado, C.M.; Lemus-de la Cruz, J.; Peña-Montes, D.J.; Murillo-Villicaña, M.; Huerta-Cervantes, M.; Montoya-Pérez, R.; Salgado-Garciglia, R.; Manzo-Avalos, S.; Cortés-Rojo, C.; et al. Antioxidant Effect of the Ethyl Acetate Extract of *Potentilla indica* on Kidney Mitochondria of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Plants* **2023**, *12*, 3196. <https://doi.org/10.3390/plants12183196>

Academic Editors: Carmen Socaciu, Zorita Diaconeasa and Andreea Stănilă

Received: 27 June 2023

Revised: 17 August 2023

Accepted: 5 September 2023

Published: 7 September 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disorder characterized by persistent hyperglycemia. This state may lead to an increase in oxidative stress, which contributes to the development of diabetes complications, including diabetic kidney disease. *Potentilla indica* is a traditional medicinal herb in Asia, employed in the treatment of several diseases, including DM. In this study, we investigated the antioxidant effect of the ethyl acetate extract of *Potentilla indica* both in vitro and on kidneys of streptozotocin-induced diabetic male rats. Firstly, phytochemicals were identified via UPLC-MS/MS, and their in vitro antioxidant capabilities were evaluated. Subsequently, male Wistar rats were assigned into four groups: normoglycemic control, diabetic control, normoglycemic treated with the extract, and diabetic treated with the extract. At the end of the treatment, fasting blood glucose (FBG) levels, creatinine, blood urea nitrogen (BUN), and uric acid were estimated. Furthermore, the kidneys were removed and utilized for the determination of mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production, mitochondrial respiratory chain complex activities, mitochondrial lipid peroxidation, glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT) activities. The in vitro findings showed that the major phytochemicals present in the extract were phenolic compounds, which exhibited a potent antioxidant activity. Moreover, the administration of the *P. indica* extract reduced creatinine and BUN levels, ROS production, and lipid peroxidation and improved mitochondrial respiratory chain complex activity and GSH-Px, SODk, and CAT activities when compared to the diabetic control group. In conclusion, our data suggest that the ethyl acetate extract of *Potentilla indica* possesses renoprotective effects by reducing oxidative stress on the kidneys of streptozotocin-induced diabetic male rats.

**Keywords:** antioxidant; diabetes mellitus; kidney mitochondria; oxidative stress; *Potentilla indica*

## 1. Introduction

DM is a chronic metabolic disorder characterized by persistent hyperglycemia, resulting directly from defective insulin action, inadequate insulin secretion, or both [1], leading to abnormalities in carbohydrate, lipid, and protein metabolism and an increase in oxidative stress (OS) [2]. Currently, DM represents a significant public health problem worldwide because it has presented at alarming levels in recent years. In 2021, a diagnosis prevalence of 537 million people was registered, and according to the IDF (International Diabetes

Original Research

## ***Eryngium carlinae* Extract and Exercise Improve Blood Lipid Profile and Skeletal Muscle Function in Obese Rats**

Koré Montserrat Moreno-Calderón <sup>1</sup>, Alfredo Saavedra-Molina <sup>1</sup>, Mariana Gómez-Barroso <sup>1</sup>, Donovan Javier Peña-Montes <sup>1</sup>, Christian Cortés-Rojo <sup>1</sup>, Alain R. Rodríguez-Orozco <sup>2</sup>, Omar Ortiz-Avila <sup>3</sup>, Rocío Montoya-Pérez <sup>1,\*</sup>

1. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Francisco J. Múgica S/N. Col. Felicitas del Río, Morelia, Michoacán 58030, México; E-Mails: [0935000J@umich.mx](mailto:0935000J@umich.mx); [saavedra@umich.mx](mailto:saavedra@umich.mx); [0939531K@umich.mx](mailto:0939531K@umich.mx); [0618853j@umich.mx](mailto:0618853j@umich.mx); [christian.cortes@umich.mx](mailto:christian.cortes@umich.mx); [rocio.montoya@umich.mx](mailto:rocio.montoya@umich.mx)
2. Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Av. Dr. Rafael Carrillo S/N, Esq. Dr. Salvador González Herrejón, Bosque Cuauhtémoc, Morelia, Michoacán, 58020, México; E-Mail: [alain.rodriguez@umich.mx](mailto:alain.rodriguez@umich.mx)
3. Facultad de Enfermería, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Calz. Ventura Puente 122, Chapultepec Nte., Morelia, Michoacán, 58260, México; E-Mail: [omar.ortiz@umich.mx](mailto:omar.ortiz@umich.mx)

\* **Correspondence:** Rocío Montoya-Pérez; E-Mail: [rocio.montoya@umich.mx](mailto:rocio.montoya@umich.mx)

**Academic Editor:** Paul J. Arciero

**Collection:** [Nutrition and Exercise for Weight Loss](#)

*OBM Integrative and Complementary Medicine*

2024, volume 9, issue 3

doi:10.21926/obm.icm.2403040

**Received:** January 08, 2024

**Accepted:** July 03, 2024

**Published:** July 10, 2024

### **Abstract**

An excess of adipose tissue characterizes obesity; it is associated with complications such as diabetes and cardiovascular diseases due to an alteration in the lipid profile; this condition affects all tissues; even skeletal muscle is the most affected, causing its malfunction and bringing more significant consequences. Exercise has been described as one of the best treatments to combat obesity. At the same time, *E. carlinae* is a plant proven to have lipid-lowering and hypoglycemic effects, improving the function of various organs. However, its described effect has not been proven in skeletal muscle during obesity. Wistar male rats were



© 2024 by the author. This is an open access article distributed under the conditions of the [Creative Commons by Attribution License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium or format, provided the original work is correctly cited.



## **14. ANEXO: CONTRIBUCIONES EN LA FORMACIÓN DE CAPITAL HUMANO: DIRECCIÓN DE TESIS, CAPACITACIÓN ACADÉMICA, DIVULGACIÓN CIENTÍFICA**

Alumno: Jorge Francisco Guillén Sosa. Título: "Efecto de la quelación de hierro crónica durante la diabetes en la generación de especies reactivas de oxígeno mitocondrial en músculo cardíaco". Facultad de Químico Farmacobiología, UMSNH. Co-asesor.

Alumno: Brandon Santillán López. Título: Influencia de la diabetes mellitus tipo 2 en el testículo de rata durante el envejecimiento: participación de la mitocondria. TecNM Campus Cd. Hidalgo. Co-asesor.

Alumno: María Guadalupe Arellano Salgado. Título: "Estudio del efecto de la biotina en la función mitocondrial y el estrés oxidante en ratas diabéticas". Facultad de Químico Farmacobiología, UMSNH. Revisor.

Curso/Taller: "Inmunodetección de proteínas por Western blot, 2022". Centro Universitario Los Lagos, UDG.

Curso/Taller: "Espectroscopia de fluorescencia aplicada a la bioquímica, 2023". Centro Universitario Los Lagos, UDG.

Curso/Taller: "Inmunodetección de proteínas por Western blot, 2024". Centro Universitario Los Lagos, UDG.

## 15. BIBLIOGRAFÍA

1. Agarwal, R. (2021). Pathogenesis of Diabetic Nephropathy. *ADA Clinical Compendia*, 2021(1), 2–7. <https://doi.org/10.2337/db20211-2>
2. Ahmad, A. A., Draves, S. O., & Rosca, M. (2021). Mitochondria in diabetic kidney disease. *Cells (Basel, Switzerland)*, 10(11), 2945. <https://doi.org/10.3390/cells10112945>
3. Allen, G. F. G., Toth, R., James, J., & Ganley, I. G. (2013). Loss of iron triggers PINK1/Parkin-independent mitophagy. *EMBO Reports*, 14(12), 1127–1135. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.168>
4. American Diabetes Association Professional Practice Committee, ElSayed, N. A., Aleppo, G., Bannuru, R. R., Bruemmer, D., Collins, B. S., Eckhasspour, L., Gaglia, J. L., Hilliard, M. E., Johnson, E. L., Khunti, K., Lingvay, I., Matfin, G., McCoy, R. G., Perry, M. L., Pilla, S. J., Polsky, S., Prahalad, P., Pratley, R. E., ... Gabbay, R. A. (2024). 2. Diagnosis and classification of diabetes: *standards of care in diabetes—2024*. *Diabetes Care*, 47(Supplement\_1), S20–S42. <https://doi.org/10.2337/dc24-s002>
5. Aquilano, K., Baldelli, S., Pagliei, B., Cannata, S. M., Rotilio, G., & Ciriolo, M. R. (2013). p53 orchestrates the PGC-1 $\alpha$ -mediated antioxidant response

- upon mild redox and metabolic imbalance. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(4), 386–399. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4615>
6. Arnér, E. S. J. (2009). Focus on mammalian thioredoxin reductases--important selenoproteins with versatile functions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790(6), 495–526. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.01.014>
7. Arruda, A. P., & Hotamisligil, G. S. (2015). Calcium homeostasis and organelle function in the pathogenesis of obesity and diabetes. *Cell metabolism*, 22(3), 381–397. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.06.010>
8. Asher, G., Lotem, J., Kama, R., Sachs, L., & Shaul, Y. (2002). NQO1 stabilizes p53 through a distinct pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(5), 3099–3104. <https://doi.org/10.1073/pnas.052706799>
9. Ayanga, B. A., Badal, S. S., Wang, Y., Galvan, D. L., Chang, B. H., Schumacker, P. T., & Danesh, F. R. (2016). Dynamin-related protein 1 deficiency improves mitochondrial fitness and protects against progression of diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 27(9), 2733–2747. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015101096>
10. Backers, K., Blero, D., Paternotte, N., Zhang, J., & Erneux, C. (2003). The termination of PI3K signalling by SHIP1 and SHIP2 inositol 5-

- phosphatases. *Advances in Enzyme Regulation*, 43(1), 15–28.  
[https://doi.org/10.1016/s0065-2571\(02\)00043-2](https://doi.org/10.1016/s0065-2571(02)00043-2)
11. Baird, L., & Yamamoto, M. (2020). The molecular mechanisms regulating the KEAP1-NRF2 pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 40(13), 1–23.  
<https://doi.org/10.1128/mcb.00099-20>
12. Banning, A., Deubel, S., Kluth, D., Zhou, Z., & Brigelius-Flohé, R. (2005). The Gl-GPx gene is a target for Nrf2. *Molecular and Cellular Biology*, 25(12), 4914–4923. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.12.4914-4923.2005>
13. Barroso, I., & McCarthy, M. I. (2019). The genetic basis of metabolic disease. *Cell*, 177(1), 146–161. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.024>
14. Bhargava, P., & Schnellmann, R. G. (2017). Mitochondrial energetics in the kidney. *Nature Reviews. Nephrology*, 13(10), 629–646.  
<https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.107>
15. Bratic, A., & Larsson, N.-G. (2013). The role of mitochondria in aging. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(3), 951–957.  
<https://doi.org/10.1172/JCI64125>
16. Brigelius-Flohé, R., & Maiorino, M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(5), 3289–3303.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.020>

17. Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*, 54(6), 1615–1625.  
<https://doi.org/10.2337/diabetes.54.6.1615>
18. Buse, M. G. (2006). Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 290(1), E1–E8.  
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00329.2005>
19. Campbell, J. E., & Newgard, C. B. (2021). Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 22(2), 142–158. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00317-7>
20. Canning, P., Sorrell, F. J., & Bullock, A. N. (2015). Structural basis of Keap1 interactions with Nrf2. *Free Radical Biology & Medicine*, 88(Pt B), 101–107.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.034>
21. Cao, C., Leng, Y., Huang, W., Liu, X., & Kufe, D. (2003). Glutathione peroxidase 1 is regulated by the c-Abl and arg tyrosine kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(41), 39609–39614.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.m305770200>
22. Cao, C., Leng, Y., & Kufe, D. (2003). Catalase activity is regulated by c-Abl and Arg in the oxidative stress response. *The Journal of Biological*

- Chemistry*, 278(32), 29667–29675.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M301292200>
23. Cao, Z., & Cooper, M. E. (2011). Pathogenesis of diabetic nephropathy: Pathogenesis of diabetic nephropathy. *Journal of Diabetes Investigation*, 2(4), 243–247. <https://doi.org/10.1111/j.2040-1124.2011.00131.x>
24. Chavez, J. A., & Summers, S. A. (2010). Lipid oversupply, selective insulin resistance, and lipotoxicity: molecular mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1801(3), 252–265.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2009.09.015>
25. Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 61(2), 192–208. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3206-5>
26. Chevalier, R. L. (2023). Bioenergetics: the evolutionary basis of progressive kidney disease. *Physiological Reviews*, 103(4), 2451–2506.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2022>
27. Childs, B. G., Baker, D. J., Kirkland, J. L., Campisi, J., & van Deursen, J. M. (2014). Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Reports*, 15(11), 1139–1153.  
<https://doi.org/10.15252/embr.201439245>

28. Chistiakov, D. A., Savost'yanov, K. V., Turakulov, R. I., Titovich, E. V., Zilberman, L. I., Kuraeva, T. L., Dedov, I. I., & Nosikov, V. V. (2004). A new type 1 diabetes susceptibility locus containing the catalase gene (chromosome 11p13) in a Russian population. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 20(3), 219–224. <https://doi.org/10.1002/dmrr.442>
29. Colberg, S. R., Sigal, R. J., Yardley, J. E., Riddell, M. C., Dunstan, D. W., Dempsey, P. C., Horton, E. S., Castorino, K., & Tate, D. F. (2016). Physical activity/exercise and diabetes: A position statement of the American diabetes association. *Diabetes Care*, 39(11), 2065–2079. <https://doi.org/10.2337/dc16-1728>
30. Cole, J. B., & Florez, J. C. (2020). Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. *Nature Reviews. Nephrology*, 16(7), 377–390. <https://doi.org/10.1038/s41581-020-0278-5>
31. Cooke, M. S., Evans, Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(10). <https://doi.org/10.1096/fj.02-0752rev>
32. Cooksey, R. C., Jones, D., Gabrielsen, S., Huang, J., Simcox, J. A., Luo, B., Soesanto, Y., Rienhoff, H., Abel, E. D., & McClain, D. A. (2010). Dietary

- iron restriction or iron chelation protects from diabetes and loss of beta-cell function in the obese (ob/ob lep<sup>-/-</sup>) mouse. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 298(6), E1236-43. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00022.2010>
33. Copps, K. D., & White, M. F. (2012). Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia*, 55(10), 2565–2582. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2644-8>
34. Coughlan, M. T., Mibus, A. L., & Forbes, J. M. (2008). Oxidative stress and advanced glycation in diabetic nephropathy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1126(1), 190–193. <https://doi.org/10.1196/annals.1433.018>
35. Coughlan, M. T., Nguyen, T.-V., Penfold, S. A., Higgins, G. C., Thallas-Bonke, V., Tan, S. M., Van Bergen, N. J., Sourris, K. C., Harcourt, B. E., Thorburn, D. R., Trounce, I. A., Cooper, M. E., & Forbes, J. M. (2016). Mapping time-course mitochondrial adaptations in the kidney in experimental diabetes. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 130(9), 711–720. <https://doi.org/10.1042/CS20150838>

36. Cui, W., Bai, Y., Miao, X., Luo, P., Chen, Q., Tan, Y., Rane, M. J., Miao, L., & Cai, L. (2012). Prevention of diabetic nephropathy by sulforaphane: possible role of Nrf2 upregulation and activation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 821936. <https://doi.org/10.1155/2012/821936>
37. Culotta, V. C., Yang, M., & O'Halloran, T. V. (2006). Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763(7), 747–758. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.05.003>
38. Czajka, A., Ajaz, S., Gnudi, L., Parsade, C. K., Jones, P., Reid, F., & Malik, A. N. (2015). Altered mitochondrial function, mitochondrial DNA and reduced metabolic flexibility in patients with diabetic nephropathy. *EBioMedicine*, 2(6), 499–512. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.04.002>
39. Demir, S., Nawroth, P. P., Herzig, S., & Ekim Üstünel, B. (2021). Emerging targets in type 2 diabetes and diabetic complications. *Advanced Science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)*, 8(18). <https://doi.org/10.1002/advs.202100275>
40. Diabetes and kidney disease, IDF Atlas Report. (2023). Diabetesatlas.org. Recuperado el 15 de febrero de 2024, de <https://diabetesatlas.org/atlas/diabetes-and-kidney-disease/>

41. Di Guglielmo, G. M., Drake, P. G., Baass, P. C., Authier, F., Posner, B. I., & Bergeron, J. J. M. (1998). *Molecular and cellular biochemistry*, 182(1/2), 59–63. <https://doi.org/10.1023/a:1006883311233>
42. Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., Cole, R. N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Kato, Y., Yamamoto, M., & Talalay, P. (2002). Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(18), 11908–11913. <https://doi.org/10.1073/pnas.172398899>
43. Dinkova-Kostova, A. T., & Talalay, P. (2010). NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501(1), 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.03.019>
44. Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., Patel, D. N., Bauer, A. J., Cantley, A. M., Yang, W. S., Morrison, B., 3rd, & Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, 149(5), 1060–1072. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>

45. Dominguez, J. H., Liu, Y., & Kelly, K. J. (2015). Renal iron overload in rats with diabetic nephropathy. *Physiological Reports*, 3(12), e12654. <https://doi.org/10.14814/phy2.12654>
46. Donath, M. Y., & Halban, P. A. (2004). Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. *Diabetologia*, 47(3), 581–589. <https://doi.org/10.1007/s00125-004-1336-4>
47. Dongiovanni, P., Ruscica, M., Rametta, R., Recalcati, S., Steffani, L., Gatti, S., Girelli, D., Cairo, G., Magni, P., Fargion, S., & Valenti, L. (2013). Dietary iron overload induces visceral adipose tissue insulin resistance. *The American Journal of Pathology*, 182(6), 2254–2263. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.02.019>
48. Dou, Q., Turanov, A. A., Mariotti, M., Hwang, J. Y., Wang, H., Lee, S.-G., Paulo, J. A., Yim, S. H., Gygi, S. P., Chung, J.-J., & Gladyshev, V. N. (2022). Selenoprotein TXNRD3 supports male fertility via the redox regulation of spermatogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 298(8), 102183. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102183>
49. Dugan, L. L., You, Y.-H., Ali, S. S., Diamond-Stanic, M., Miyamoto, S., DeClevés, A.-E., Andreyev, A., Quach, T., Ly, S., Shekhtman, G., Nguyen, W., Chepetan, A., Le, T. P., Wang, L., Xu, M., Paik, K. P., Fogo, A., Viollet,

- B., Murphy, A., ... Sharma, K. (2013). AMPK dysregulation promotes diabetes-related reduction of superoxide and mitochondrial function. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(11), 4888–4899. <https://doi.org/10.1172/JCI66218>
50. Dumont, J. E. (2002). PTEN: countdown to understanding PIP3 signaling. *Trends in Cell Biology*, 12(7), 321. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(02\)02326-7](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(02)02326-7)
51. Dupré-Crochet, S., Erard, M., & Nüße, O. (2013). ROS production in phagocytes: why, when, and where? *Journal of Leukocyte Biology*, 94(4), 657–670. <https://doi.org/10.1189/jlb.1012544>
52. Eguchi, N., Vaziri, N. D., Dafoe, D. C., & Ichii, H. (2021). The role of oxidative stress in pancreatic  $\beta$  cell dysfunction in diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1509. <https://doi.org/10.3390/ijms22041509>
53. Emma, F., Montini, G., Parikh, S. M., & Salviati, L. (2016). Mitochondrial dysfunction in inherited renal disease and acute kidney injury. *Nature Reviews. Nephrology*, 12(5), 267–280. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2015.214>

54. Esmaili, S., Hemmati, M., & Karamian, M. (2020). Physiological role of adiponectin in different tissues: a review. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 126(1), 67–73.  
<https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1493606>
55. Fan, X., Yang, M., Lang, Y., Lu, S., Kong, Z., Gao, Y., Shen, N., Zhang, D., & Lv, Z. (2024). Mitochondrial metabolic reprogramming in diabetic kidney disease. *Cell Death & Disease*, 15(6), 442. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06833-0>
56. Fernández-Real, J. M., & Manco, M. (2014). Effects of iron overload on chronic metabolic diseases. *The Lancet. Diabetes & Endocrinology*, 2(6), 513–526. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(13\)70174-8](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(13)70174-8)
57. Flamment, M., Hajduch, E., Ferré, P., & Foufelle, F. (2012). New insights into ER stress-induced insulin resistance. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 23(8), 381–390.  
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.06.003>
58. Flemming, N. B., Gallo, L. A., & Forbes, J. M. (2018). Mitochondrial dysfunction and signaling in diabetic kidney disease: Oxidative stress and beyond. *Seminars in Nephrology*, 38(2), 101–110.  
<https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2018.01.001>

59. Fontecha-Barriuso, M., Martín-Sánchez, D., Martínez-Moreno, J. M., Monsalve, M., Ramos, A. M., Sánchez-Niño, M. D., Ruiz-Ortega, M., Ortiz, A., & Sanz, A. B. (2020). The role of PGC-1 $\alpha$  and mitochondrial biogenesis in kidney diseases. *Biomolecules*, *10*(2), 347. <https://doi.org/10.3390/biom10020347>
60. Forbes, J. M., & Cooper, M. E. (2013). Mechanisms of diabetic complications. *Physiological Reviews*, *93*(1), 137–188. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2011>
61. Forbes, J. M., Coughlan, M. T., & Cooper, M. E. (2008). Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes*, *57*(6), 1446–1454. <https://doi.org/10.2337/db08-0057>
62. Forbes, J. M., & Thorburn, D. R. (2018). Mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease. *Nature Reviews. Nephrology*, *14*(5), 291–312. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2018.9>
63. Friedman, J. (2016). The long road to leptin. *The Journal of Clinical Investigation*, *126*(12), 4727–4734. <https://doi.org/10.1172/JCI91578>
64. Fukui, T., & Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, *15*(6), 1583–1606. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.3999>

65. Galicia-Garcia, U., Benito-Vicente, A., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Siddiqi, H., Uribe, K. B., Ostolaza, H., & Martín, C. (2020). Pathophysiology of type 2 Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 6275. <https://doi.org/10.3390/ijms21176275>
66. Galvan, D. L., Green, N. H., & Danesh, F. R. (2017). The hallmarks of mitochondrial dysfunction in chronic kidney disease. *Kidney International*, 92(5), 1051–1057. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.05.034>
67. Gao, W., Guo, L., Yang, Y., Wang, Y., Xia, S., Gong, H., Zhang, B.-K., & Yan, M. (2021). Dissecting the crosstalk between Nrf2 and NF-κB response pathways in drug-induced toxicity. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 809952. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.809952>
68. Gào, X., & Schöttker, B. (2017). Reduction-oxidation pathways involved in cancer development: a systematic review of literature reviews. *Oncotarget*, 8(31), 51888–51906. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17128>
69. García-Guede, Á., Vera, O., & Ibáñez-de-Caceres, I. (2020). When oxidative stress meets epigenetics: Implications in cancer development. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(6), 468. <https://doi.org/10.3390/antiox9060468>

70. Gerschman, R., Gilbert, D. L., Nye, S. W., Dwyer, P., & Fenn, W. O. (1954). Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science (New York, N.Y.)*, *119*(3097), 623–626. <https://doi.org/10.1126/science.119.3097.623>
71. Glorieux, C., Zamocky, M., Sandoval, J. M., Verrax, J., & Calderon, P. B. (2015). Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radical Biology & Medicine*, *87*, 84–97. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.017>
72. Golbidi, S., Ebadi, S. A., & Laher, I. (2011). Antioxidants in the treatment of diabetes. *Current Diabetes Reviews*, *7*(2), 106–125. <https://doi.org/10.2174/157339911794940729>
73. Goldstein, B. J., Bittner-Kowalczyk, A., White, M. F., & Harbeck, M. (2000). Tyrosine dephosphorylation and deactivation of insulin receptor substrate-1 by protein-tyrosine phosphatase 1B. Possible facilitation by the formation of a ternary complex with the Grb2 adaptor protein. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(6), 4283–4289. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.6.4283>
74. Goodwin, J. M., Dowdle, W. E., DeJesus, R., Wang, Z., Bergman, P., Kobylarz, M., Lindeman, A., Xavier, R. J., McAllister, G., Nyfeler, B., Hoffman, G., & Murphy, L. O. (2017). Autophagy-independent lysosomal

- targeting regulated by ULK1/2-FIP200 and ATG9. *Cell Reports*, 20(10), 2341–2356. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.034>
75. Gray, S. G., & De Meyts, P. (2005). Role of histone and transcription factor acetylation in diabetes pathogenesis. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 21(5), 416–433. <https://doi.org/10.1002/dmrr.559>
76. Haendeler, J. (2006). Thioredoxin-1 and posttranslational modifications. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(9–10), 1723–1728. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.1723>
77. Haeusler, R. A., McGraw, T. E., & Accili, D. (2018). Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 19(1), 31–44. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.89>
78. Hamanishi, T., Furuta, H., Kato, H., Doi, A., Tamai, M., Shimomura, H., Sakagashira, S., Nishi, M., Sasaki, H., Sanke, T., & Nanjo, K. (2004). Functional variants in the glutathione peroxidase-1 (*GPx-1*) gene are associated with increased intima-media thickness of carotid arteries and risk of macrovascular diseases in Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes*, 53(9), 2455–2460. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.9.2455>

79. Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, 11(3), 298–300.  
<https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298>
80. Higgins, G. C., & Coughlan, M. T. (2014). Mitochondrial dysfunction and mitophagy: the beginning and end to diabetic nephropathy?: Disturbed mitophagy in diabetic nephropathy. *British Journal of Pharmacology*, 171(8), 1917–1942. <https://doi.org/10.1111/bph.12503>
81. Holmgren, A., & Björnstedt, M. (1995). Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods in Enzymology*, 252, 199–208.  
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)52023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)52023-6)
82. Hong, Y. A., & Park, C. W. (2021). Catalytic antioxidants in the kidney. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(1), 130.  
<https://doi.org/10.3390/antiox10010130>
83. Hotamisligil, G. S. (2017). Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature*, 542(7640), 177–185.  
<https://doi.org/10.1038/nature21363>
84. Huang, Z., Huang, L., Waters, M. J., & Chen, C. (2020). Insulin and growth hormone balance: Implications for obesity. *Trends in Endocrinology and*

*Metabolism: TEM*, 31(9), 642–654.

<https://doi.org/10.1016/j.tem.2020.04.005>

85. Ichimura, Y., Waguri, S., Sou, Y.-S., Kageyama, S., Hasegawa, J., Ishimura, R., Saito, T., Yang, Y., Kouno, T., Fukutomi, T., Hoshii, T., Hirao, A., Takagi, K., Mizushima, T., Motohashi, H., Lee, M.-S., Yoshimori, T., Tanaka, K., Yamamoto, M., & Komatsu, M. (2013). Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy. *Molecular Cell*, 51(5), 618–631. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.003>

i. *IDF diabetes atlas 2021*. (2021). Diabetesatlas.org.

<https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition/>

86. Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M., & Nabeshima, Y. (1997). An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236(2), 313–322. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6943>

87. Jain, A., Lamark, T., Sjøttem, E., Larsen, K. B., Awuh, J. A., Øvervatn, A., McMahon, M., Hayes, J. D., & Johansen, T. (2010). p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by

- inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(29), 22576–22591.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.118976>
88. Jaldin-Fincati, J. R., Pavarotti, M., Frendo-Cumbo, S., Bilan, P. J., & Klip, A. (2017). Update on GLUT4 vesicle traffic: A cornerstone of insulin action. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 28(8), 597–611.  
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.05.002>
89. Kato, M., & Natarajan, R. (2019). Epigenetics and epigenomics in diabetic kidney disease and metabolic memory. *Nature Reviews. Nephrology*, 15(6), 327–345. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0135-6>
90. Kato, Y., Itoh, K., Yoshida, E., Miyagishi, M., Fukamizu, A., & Yamamoto, M. (2001). Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 6(10), 857–868.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2001.00469.x>
91. Kaushal, G. P., Chandrashekar, K., & Juncos, L. A. (2019). Molecular interactions between reactive oxygen species and autophagy in kidney disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15), 3791.  
<https://doi.org/10.3390/ijms20153791>

92. Khalid, M., Petroianu, G., & Adem, A. (2022). Advanced glycation end products and diabetes mellitus: Mechanisms and perspectives. *Biomolecules*, 12(4), 542. <https://doi.org/10.3390/biom12040542>
93. Kim, K., & Lee, E.-Y. (2021). Excessively enlarged mitochondria in the kidneys of diabetic nephropathy. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(5), 741. <https://doi.org/10.3390/antiox10050741>
94. Kirkman, H. N., & Gaetani, G. F. (2007). Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1), 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.11.003>
95. Kitada, K., Nakano, D., Ohsaki, H., Hitomi, H., Minamino, T., Yatabe, J., Felder, R. A., Mori, H., Masaki, T., Kobori, H., & Nishiyama, A. (2014). Hyperglycemia causes cellular senescence via a SGLT2- and p21-dependent pathway in proximal tubules in the early stage of diabetic nephropathy. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 28(5), 604–611. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2014.05.010>
96. Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y.-S., Ueno, I., Sakamoto, A., Tong, K. I., Kim, M., Nishito, Y., Iemura, S.-I., Natsume, T., Ueno, T., Kominami, E., Motohashi, H., Tanaka, K., & Yamamoto, M. (2010). The selective autophagy substrate

- p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nature Cell Biology*, 12(3), 213–223. <https://doi.org/10.1038/ncb2021>
97. Koskenkorva-Frank, T. S., Weiss, G., Koppenol, W. H., & Burckhardt, S. (2013). The complex interplay of iron metabolism, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species: insights into the potential of various iron therapies to induce oxidative and nitrosative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 65, 1174–1194. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.09.001>
98. Kowluru, R. A., & Mishra, M. (2015). Oxidative stress, mitochondrial damage and diabetic retinopathy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1852(11), 2474–2483. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.08.001>
99. Kwak, M.-K., Itoh, K., Yamamoto, M., & Kensler, T. W. (2002). Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. *Molecular and Cellular Biology*, 22(9), 2883–2892. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.9.2883-2892.2002>
100. Lau, A., Wang, X.-J., Zhao, F., Villeneuve, N. F., Wu, T., Jiang, T., Sun, Z., White, E., & Zhang, D. D. (2010). A noncanonical mechanism of

- Nrf2 activation by autophagy deficiency: direct interaction between Keap1 and p62. *Molecular and Cellular Biology*, 30(13), 3275–3285. <https://doi.org/10.1128/MCB.00248-10>
101. Lee, H. J., Choi, J. S., Lee, H. J., Kim, W.-H., Park, S. I., & Song, J. (2015). Effect of excess iron on oxidative stress and gluconeogenesis through hepcidin during mitochondrial dysfunction. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(12), 1414–1423. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.07.008>
102. Lee, S.-H., Park, S.-Y., & Choi, C. S. (2022). Insulin resistance: From mechanisms to therapeutic strategies. *Diabetes & Metabolism Journal*, 46(1), 15–37. <https://doi.org/10.4093/dmj.2021.0280>
103. Lenoir, O., Jasiek, M., Hénique, C., Guyonnet, L., Hartleben, B., Bork, T., Chipont, A., Flosseau, K., Bensaada, I., Schmitt, A., Massé, J.-M., Souyri, M., Huber, T. B., & Tharaux, P.-L. (2015). Endothelial cell and podocyte autophagy synergistically protect from diabetes-induced glomerulosclerosis. *Autophagy*, 11(7), 1130–1145. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1049799>
104. Li, S., Zheng, L., Zhang, J., Liu, X., & Wu, Z. (2021). Inhibition of ferroptosis by up-regulating Nrf2 delayed the progression of diabetic

- nephropathy. *Free Radical Biology & Medicine*, 162, 435–449.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.323>
105. Ling, C., & Rönn, T. (2019). Epigenetics in human obesity and type 2 diabetes. *Cell Metabolism*, 29(5), 1028–1044.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.03.009>
106. Liochev, S. I. (2013). Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radical Biology & Medicine*, 60, 1–4.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.011>
107. Liu, Y., Uruno, A., Saito, R., Matsukawa, N., Hishinuma, E., Saigusa, D., Liu, H., & Yamamoto, M. (2022). Nrf2 deficiency deteriorates diabetic kidney disease in Akita model mice. *Redox Biology*, 58(102525), 102525.  
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102525>
108. Lu, J., & Holmgren, A. (2014). The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology & Medicine*, 66, 75–87.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036>
109. Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 164–175. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>

110. Mannar, V., Boro, H., Patel, D., Agstam, S., Dalvi, M., & Bundela, V. (2023). Epigenetics of the pathogenesis and complications of type 2 diabetes mellitus. *TouchREVIEWS in Endocrinology*, 19(1), 46–53. <https://doi.org/10.17925/EE.2023.19.1.46>
111. McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049–6055. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5389100/>
112. Miao, L., & St Clair, D. K. (2009). Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 47(4), 344–356. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.018>
113. Möllsten, A., Marklund, S. L., Wessman, M., Svensson, M., Forsblom, C., Parkkonen, M., Brismar, K., Groop, P.-H., & Dahlquist, G. (2007). A functional polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene and diabetic nephropathy. *Diabetes*, 56(1), 265–269. <https://doi.org/10.2337/db06-0698>
114. Moncada, S., & Higgs, E. A. (2006). The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology: The discovery of nitric oxide and its role in

- vascular biology. *British Journal of Pharmacology*, 147 Suppl 1(S1), S193-201. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706458>
115. Montgomery, M. K., & Turner, N. (2015). Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: an update. *Endocrine Connections*, 4(1), R1–R15. <https://doi.org/10.1530/EC-14-0092>
116. Morgan, M. J., & Liu, Z.-G. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B signaling. *Cell Research*, 21(1), 103–115. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.178>
117. Moscat, J., & Diaz-Meco, M. T. (2009). P62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell*, 137(6), 1001–1004. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.023>
118. Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical Journal*, 417(1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
119. Newsholme, P., Cruzat, V. F., Keane, K. N., Carlessi, R., & de Bittencourt, P. I. H., Jr. (2016). Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. *The Biochemical Journal*, 473(24), 4527–4550. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160503C>

120. Niki, E. (2009). Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radical Biology & Medicine*, 47(5), 469–484. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.032>
121. Niture, S. K., Kaspar, J. W., Shen, J., & Jaiswal, A. K. (2010). Nrf2 signaling and cell survival. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 244(1), 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.06.009>
122. Ohara T., & Kasuga M. (2001). Type 2 diabetes mellitus. *Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine*, 59 Suppl 8(1), 223–230. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.19>
123. Palmer, A. K., Gustafson, B., Kirkland, J. L., & Smith, U. (2019). Cellular senescence: at the nexus between ageing and diabetes. *Diabetologia*, 62(10), 1835–1841. <https://doi.org/10.1007/s00125-019-4934-x>
124. Pan, D., Xu, L., & Guo, M. (2022). The role of protein kinase C in diabetic microvascular complications. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 973058. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.973058>
125. Paul, B. T., Manz, D. H., Torti, F. M., & Torti, S. V. (2017). Mitochondria and Iron: current questions. *Expert Review of Hematology*, 10(1), 65–79. <https://doi.org/10.1080/17474086.2016.1268047>

126. Peng, L., Yuan, Z., Ling, H., Fukasawa, K., Robertson, K., Olashaw, N., Koomen, J., Chen, J., Lane, W. S., & Seto, E. (2011). SIRT1 deacetylates the DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein and alters its activities. *Molecular and Cellular Biology*, 31(23), 4720–4734. <https://doi.org/10.1128/MCB.06147-11>
127. Perry, R. J., Camporez, J.-P. G., Kursawe, R., Titchenell, P. M., Zhang, D., Perry, C. J., Jurczak, M. J., Abudukadier, A., Han, M. S., Zhang, X.-M., Ruan, H.-B., Yang, X., Caprio, S., Kaech, S. M., Sul, H. S., Birnbaum, M. J., Davis, R. J., Cline, G. W., Petersen, K. F., & Shulman, G. I. (2015). Hepatic acetyl CoA links adipose tissue inflammation to hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Cell*, 160(4), 745–758. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.012>
128. Petersen, M. C., & Shulman, G. I. (2018a). Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiological Reviews*, 98(4), 2133–2223. <https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>
129. Petersen, M. C., & Shulman, G. I. (2018b). Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiological Reviews*, 98(4), 2133–2223. <https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>

130. Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
131. Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative stress: Harms and benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 8416763. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
132. Powis, G., & Montfort, W. R. (2001). Properties and biological activities of thioredoxins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 30(1), 421–455. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.30.1.421>
133. Quiles Del Rey, M., & Mancias, J. D. (2019). NCOA4-mediated ferritinophagy: A potential link to neurodegeneration. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 238. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00238>
134. Rada, P., Rojo, A. I., Chowdhry, S., McMahon, M., Hayes, J. D., & Cuadrado, A. (2011). SCF/ $\beta$ -TrCP promotes glycogen synthase kinase 3-dependent degradation of the Nrf2 transcription factor in a Keap1-independent manner. *Molecular and Cellular Biology*, 31(6), 1121–1133. <https://doi.org/10.1128/MCB.01204-10>

135. Rajapurkar, M. M., Hegde, U., Bhattacharya, A., Alam, M. G., & Shah, S. V. (2013). Effect of deferiprone, an oral iron chelator, in diabetic and non-diabetic glomerular disease. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 23(1), 5–10. <https://doi.org/10.3109/15376516.2012.730558>
136. Reilly, S. M., & Saltiel, A. R. (2017). Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nature Reviews. Endocrinology*, 13(11), 633–643. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.90>
137. Rensvold, J. W., Krautkramer, K. A., Dowell, J. A., Denu, J. M., & Pagliarini, D. J. (2016). Iron deprivation induces transcriptional regulation of mitochondrial biogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(40), 20827–20837. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.727701>
138. Rezaee, A., Rahmanian, P., Nemati, A., Sohrabifard, F., Karimi, F., Elahinia, A., Ranjbarpazuki, A., Lashkarbolouki, R., Dezfulian, S., Zandieh, M. A., Salimimoghadam, S., Nabavi, N., Rashidi, M., Taheriazam, A., Hashemi, M., & Hushmandi, K. (2024). NF-κB axis in diabetic neuropathy, cardiomyopathy and nephropathy: A roadmap from molecular intervention to therapeutic strategies. *Heliyon*, 10(9), e29871. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e29871>

139. Rhee, S. G. (2006). Cell signaling. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a necessary evil for cell signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5782), 1882–1883. <https://doi.org/10.1126/science.1130481>
140. Robb, E. L., Gawel, J. M., Aksentijević, D., Cochemé, H. M., Stewart, T. S., Shchepinova, M. M., Qiang, H., Prime, T. A., Bright, T. P., James, A. M., Shattock, M. J., Senn, H. M., Hartley, R. C., & Murphy, M. P. (2015). Selective superoxide generation within mitochondria by the targeted redox cycler MitoParaquat. *Free Radical Biology & Medicine*, 89, 883–894. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.08.021>
141. Ross, D., & Siegel, D. (2017). Functions of NQO1 in cellular protection and CoQ10 metabolism and its potential role as a redox sensitive molecular switch. *Frontiers in Physiology*, 8, 595. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00595>
142. Rouault, T. A. (2015). Mammalian iron-sulphur proteins: novel insights into biogenesis and function. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 16(1), 45–55. <https://doi.org/10.1038/nrm3909>
143. Rushworth, S. A., & Macewan, D. J. (2011). The role of nrf2 and cytoprotection in regulating chemotherapy resistance of human leukemia cells. *Cancers*, 3(2), 1605–1621. <https://doi.org/10.3390/cancers3021605>

144. Saito, R., Suzuki, T., Hiramoto, K., Asami, S., Naganuma, E., Suda, H., Iso, T., Yamamoto, H., Morita, M., Baird, L., Furusawa, Y., Negishi, T., Ichinose, M., & Yamamoto, M. (2015). Characterizations of three major cysteine sensors of Keap1 in stress response. *Molecular and Cellular Biology*, 36(2), 271–284. <https://doi.org/10.1128/MCB.00868-15>
145. Sakashita, M., Tanaka, T., & Inagi, R. (2021). Metabolic changes and oxidative stress in diabetic kidney disease. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(7), 1143. <https://doi.org/10.3390/antiox10071143>
146. Salvadó, L., Palomer, X., Barroso, E., & Vázquez-Carrera, M. (2015). Targeting endoplasmic reticulum stress in insulin resistance. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 26(8), 438–448. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.05.007>
147. Samuel, V. T., & Shulman, G. I. (2016). The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(1), 12–22. <https://doi.org/10.1172/JCI77812>
148. Sandholm, N., Dahlström, E. H., & Groop, P.-H. (2023). Genetic and epigenetic background of diabetic kidney disease. *Frontiers in Endocrinology*, 14, 1163001. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1163001>

149. Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology: CB*, 24(10), R453-62. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
150. Schleicher, E. D., & Weigert, C. (2000). Role of the hexosamine biosynthetic pathway in diabetic nephropathy. *Kidney International Supplement*, 77, S13-8. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.07703.x>
151. Segal, A. W. (2005). How neutrophils kill microbes. *Annual Review of Immunology*, 23, 197–223. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653>
152. Shahzad, K., Bock, F., Dong, W., Wang, H., Kopf, S., Kohli, S., Al-Dabet, M. M., Ranjan, S., Wolter, J., Wacker, C., Biemann, R., Stoyanov, S., Reymann, K., Söderkvist, P., Groß, O., Schwenger, V., Pahernik, S., Nawroth, P. P., Gröne, H.-J., ... Isermann, B. (2015). Nlrp3-inflammasome activation in non-myeloid-derived cells aggravates diabetic nephropathy. *Kidney International*, 87(1), 74–84. <https://doi.org/10.1038/ki.2014.271>
153. Shanik, M. H., Xu, Y., Skrha, J., Dankner, R., Zick, Y., & Roth, J. (2008). Insulin resistance and hyperinsulinemia. *Diabetes Care*, 31(Supplement\_2), S262–S268. <https://doi.org/10.2337/dc08-s264>

154. Sharma, K., Karl, B., Mathew, A. V., Gangoiti, J. A., Wassel, C. L., Saito, R., Pu, M., Sharma, S., You, Y.-H., Wang, L., Diamond-Stanic, M., Lindenmeyer, M. T., Forsblom, C., Wu, W., Ix, J. H., Ideker, T., Kopp, J. B., Nigam, S. K., Cohen, C. D., ... Naviaux, R. K. (2013). Metabolomics reveals signature of mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 24(11), 1901–1912. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013020126>
155. Sharma, N., Pasala, M. S., & Prakash, A. (2019). Mitochondrial DNA: Epigenetics and environment. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 60(8), 668–682. <https://doi.org/10.1002/em.22319>
156. Sheng, Y., Abreu, I. A., Cabelli, D. E., Maroney, M. J., Miller, A.-F., Teixeira, M., & Valentine, J. S. (2014). Superoxide dismutases and superoxide reductases. *Chemical Reviews*, 114(7), 3854–3918. <https://doi.org/10.1021/cr4005296>
157. Shi, G.-J., Shi, G.-R., Zhou, J.-Y., Zhang, W.-J., Gao, C.-Y., Jiang, Y.-P., Zi, Z.-G., Zhao, H.-H., Yang, Y., & Yu, J.-Q. (2018). Involvement of growth factors in diabetes mellitus and its complications: A general review. *Biomedecine & Pharmacotherapie [Biomedicine & Pharmacotherapy]*, 101, 510–527. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.105>

158. Shojima, N., & Yamauchi, T. (2023). Progress in genetics of type 2 diabetes and diabetic complications. *Journal of Diabetes Investigation*, 14(4), 503–515. <https://doi.org/10.1111/jdi.13970>
159. Sies, H. (2020). Oxidative eustress and oxidative distress: Introductory remarks. En H. Sies (Ed.), *Oxidative Stress* (pp. 3–12). Elsevier.
160. Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative stress. *Annual Review of Biochemistry*, 86, 715–748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>
161. Simcox, J. A., & McClain, D. A. (2013). Iron and diabetes risk. *Cell Metabolism*, 17(3), 329–341. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.02.007>
162. Steinbrenner, H., & Sies, H. (2009). Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790(11), 1478–1485. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.02.014>
163. Stumvoll, M., Goldstein, B. J., & van Haeften, T. W. (2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*, 365(9467), 1333–1346. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(05\)61032-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(05)61032-x)
164. Sun, Z., Huang, Z., & Zhang, D. D. (2009). Phosphorylation of Nrf2 at multiple sites by MAP kinases has a limited contribution in modulating the

- Nrf2-dependent antioxidant response. *PloS One*, 4(8), e6588.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006588>
165. Suzuki, T., Takahashi, J., & Yamamoto, M. (2023). Molecular basis of the KEAP1-NRF2 signaling pathway. *Molecules and Cells*, 46(3), 133–141. <https://doi.org/10.14348/molcells.2023.0028>
166. Szabadkai, G., & Duchon, M. R. (2008). Mitochondria: the hub of cellular Ca<sup>2+</sup> signaling. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 23(2), 84–94. <https://doi.org/10.1152/physiol.00046.2007>
167. Taguchi, K., Fujikawa, N., Komatsu, M., Ishii, T., Unno, M., Akaike, T., Motohashi, H., & Yamamoto, M. (2012). Keap1 degradation by autophagy for the maintenance of redox homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(34), 13561–13566. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121572109>
168. Tait, S. W. G., & Green, D. R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(9), 621–632. <https://doi.org/10.1038/nrm2952>
169. Tan, S. M., & de Haan, J. B. (2014). Combating oxidative stress in diabetic complications with Nrf2 activators: How much is too much? *Redox*

*Report: Communications in Free Radical Research*, 19(3), 107–117.

<https://doi.org/10.1179/1351000214y.0000000087>

170. Tanase, D. M., Gosav, E. M., Anton, M. I., Floria, M., Seritean Isac, P. N., Hurjui, L. L., Tarniceriu, C. C., Costea, C. F., Ciocoiu, M., & Rezus, C. (2022). Oxidative stress and NRF2/KEAP1/ARE pathway in Diabetic Kidney Disease (DKD): New perspectives. *Biomolecules*, 12(9), 1227. <https://doi.org/10.3390/biom12091227>
171. Templeman, N. M., Skovsø, S., Page, M. M., Lim, G. E., & Johnson, J. D. (2017). A causal role for hyperinsulinemia in obesity. *The Journal of Endocrinology*, 232(3), R173–R183. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0449>
172. Thomas, M. C., Forbes, J. M., & Cooper, M. E. (2005). Advanced glycation end products and diabetic nephropathy. *American Journal of Therapeutics*, 12(6), 562–572. <https://doi.org/10.1097/01.mjt.0000178769.52610.69>
173. Tonelli, C., Chio, I. I. C., & Tuveson, D. A. (2018). Transcriptional regulation by Nrf2. *Antioxidants & Redox Signaling*, 29(17), 1727–1745. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7342>
174. Tong, K. I., Kato, Y., Kusunoki, H., Itoh, K., Tanaka, T., & Yamamoto, M. (2006). Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and

- DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Molecular and Cellular Biology*, 26(8), 2887–2900. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.8.2887-2900.2006>
175. Toppo, S., Flohé, L., Ursini, F., Vanin, S., & Maiorino, M. (2009). Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790(11), 1486–1500. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.04.007>
176. Um, S. H., D'Alessio, D., & Thomas, G. (2006). Nutrient overload, insulin resistance, and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1. *Cell metabolism*, 3(6), 393–402. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.05.003>
177. van Deursen, J. M. (2014). The role of senescent cells in ageing. *Nature*, 509(7501), 439–446. <https://doi.org/10.1038/nature13193>
178. van Niekerk, G., Christowitz, C., Conradie, D., & Engelbrecht, A.-M. (2020). Insulin as an immunomodulatory hormone. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 52, 34–44. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.11.006>
179. van Raaij, S., van Swelm, R., Bouman, K., Cliteur, M., van den Heuvel, M. C., Pertijs, J., Patel, D., Bass, P., van Goor, H., Unwin, R., Srai, S. K., & Swinkels, D. (2018). Tubular iron deposition and iron handling

- proteins in human healthy kidney and chronic kidney disease. *Scientific Reports*, 8(1), 9353. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27107-8>
180. Venugopal, R., & Jaiswal, A. K. (1996). Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(25), 14960–14965. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14960>
181. Vercellino, I., & Sazanov, L. A. (2022). The assembly, regulation and function of the mitochondrial respiratory chain. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 23(2), 141–161. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00415-0>
182. Vlassara, H., & Palace, M. R. (2002). Diabetes and advanced glycation endproducts. *Journal of Internal Medicine*, 251(2), 87–101. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2002.00932.x>
183. Vlassara, Helen, & Uribarri, J. (2014). Advanced glycation end products (AGE) and diabetes: Cause, effect, or both? *Current Diabetes Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1007/s11892-013-0453-1>
184. Wang, Hongyan, Liu, K., Geng, M., Gao, P., Wu, X., Hai, Y., Li, Y., Li, Y., Luo, L., Hayes, J. D., Wang, X. J., & Tang, X. (2013). RXR $\alpha$  inhibits the NRF2-ARE signaling pathway through a direct interaction with the Neh7

- domain of NRF2. *Cancer Research*, 73(10), 3097–3108.  
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3386>
185. Wang, Hui, Liu, D., Zheng, B., Yang, Y., Qiao, Y., Li, S., Pan, S., Liu, Y., Feng, Q., & Liu, Z. (2023). Emerging role of ferroptosis in diabetic kidney disease: Molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *International Journal of Biological Sciences*, 19(9), 2678–2694.  
<https://doi.org/10.7150/ijbs.81892>
186. Wang, L., Wang, H.-L., Liu, T.-T., & Lan, H.-Y. (2021). TGF-beta as a master regulator of diabetic nephropathy. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 7881. <https://doi.org/10.3390/ijms22157881>
187. Ward, D. M., & Cloonan, S. M. (2019). Mitochondrial iron in human health and disease. *Annual Review of Physiology*, 81(1), 453–482.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020518-114742>
188. Wondmkun, Y. T. (2020). Obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes: Associations and therapeutic implications. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 13, 3611–3616.  
<https://doi.org/10.2147/dmso.s275898>
189. Wu, Y., Zhao, Y., Yang, H.-Z., Wang, Y.-J., & Chen, Y. (2021). HMGB1 regulates ferroptosis through Nrf2 pathway in mesangial cells in

- response to high glucose. *Bioscience Reports*, 41(2).  
<https://doi.org/10.1042/bsr20202924>
190. Xiao, B., Goh, J.-Y., Xiao, L., Xian, H., Lim, K.-L., & Liou, Y.-C. (2017). Reactive oxygen species trigger Parkin/PINK1 pathway-dependent mitophagy by inducing mitochondrial recruitment of Parkin. *The Journal of Biological Chemistry*, 292(40), 16697–16708.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M117.787739>
191. Xu, J., Kitada, M., & Koya, D. (2020). The impact of mitochondrial quality control by Sirtuins on the treatment of type 2 diabetes and diabetic kidney disease. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, 1866(6), 165756. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165756>
192. Yamakura, F., & Kawasaki, H. (2010). Post-translational modifications of superoxide dismutase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804(2), 318–325. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.10.010>
193. Yan, L.-J. (2018). Redox imbalance stress in diabetes mellitus: Role of the polyol pathway. *Animal Models and Experimental Medicine*, 1(1), 7–13. <https://doi.org/10.1002/ame2.12001>

194. Yao, D., GangYi, Y., & QiNan, W. (2021). Autophagic dysfunction of  $\beta$  cell dysfunction in type 2 diabetes, a double-edged sword. *Genes & Diseases*, 8(4), 438–447. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2020.03.003>
195. Yoshihara, E., Masaki, S., Matsuo, Y., Chen, Z., Tian, H., & Yodoi, J. (2014). Thioredoxin/Txnip: redoxisome, as a redox switch for the pathogenesis of diseases. *Frontiers in Immunology*, 4, 514. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00514>
196. Zarain-Herzberg, A., García-Rivas, G., & Estrada-Avilés, R. (2014). Regulation of SERCA pumps expression in diabetes. *Cell Calcium*, 56(5), 302–310. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.09.005>
197. Zhan, M., Usman, I. M., Sun, L., & Kanwar, Y. S. (2015). Disruption of renal tubular mitochondrial quality control by Myo-inositol oxygenase in diabetic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 26(6), 1304–1321. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014050457>
198. Zhao, R.-Z., Jiang, S., Zhang, L., & Yu, Z.-B. (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 44(1), 3–15. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4188>

199. Zheng, H., Whitman, S. A., Wu, W., Wondrak, G. T., Wong, P. K., Fang, D., & Zhang, D. D. (2011). Therapeutic potential of Nrf2 activators in streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Diabetes*, *60*(11), 3055–3066. <https://doi.org/10.2337/db11-0807>
200. Zheng, Y., Ley, S. H., & Hu, F. B. (2018). Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nature Reviews. Endocrinology*, *14*(2), 88–98. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.151>
201. Zipper, L. M., & Mulcahy, R. T. (2002). The Keap1 BTB/POZ dimerization function is required to sequester Nrf2 in cytoplasm. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(39), 36544–36552. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206530200>
202. Zou, C., Xie, R., Bao, Y., Liu, X., Sui, M., M S, Li, S., & Yin, H. (2013). Iron chelator alleviates tubulointerstitial fibrosis in diabetic nephropathy rats by inhibiting the expression of tenascinC and other correlation factors. *Endocrine*, *44*(3). <https://doi.org/10.1007/s12020-013-9907-0>
203. Zou, Chunbo, Liu, X., Liu, R., Wang, M., Sui, M., Mu, S., Li, L., Ji, L., & Xie, R. (2017). Effect of the oral iron chelator deferiprone in diabetic

nephropathy rats. *Journal of Diabetes*, 9(4), 332–340.

<https://doi.org/10.1111/1753-0407.12420>

# Donovan Javier Peña Montes

## ESTUDIO DE LA QUELACIÓN DE HIERRO EN LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE MEDIADA POR NRF2 Y LA FUNCIONALIDAD M

 Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

### Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::3117:397219840

Fecha de entrega

22 oct 2024, 9:09 a.m. GMT-6

Fecha de descarga

22 oct 2024, 9:14 a.m. GMT-6

Nombre de archivo

ESTUDIO DE LA QUELACIÓN DE HIERRO EN LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE MEDIADA POR NRF2 Y ....pdf

Tamaño de archivo

14.0 MB

185 Páginas

33,314 Palabras

190,454 Caracteres

# Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



A quien corresponda,

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

- Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo.
- Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias.
- Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento.
- Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

Datos del manuscrito que se presenta a revisión		
Programa educativo	DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL	
Título del trabajo	ESTUDIO DE LA QUELACIÓN DE HIERRO EN LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE MEDIADA POR NRF2 Y LA FUNCIONALIDAD MITOCONDRIAL RENAL EN UN MODELO MURINO DE DIABETES TIPO 2	
Autor/es	Nombre	Correo electrónico
	Donovan Javier Peña Montes	0618853j@umich.mx
Director	Francisco Alfredo Saavedra Molina	francisco.saavedra@umich.mx
Codirector		
Coordinador del programa	Ernesto García Pineda	doc.cs.biologia.experimental@umich.mx

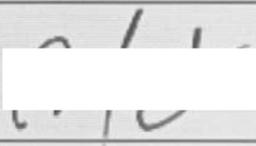
Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Asistencia en la redacción	No	No

# Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Traducción al español	Si	Traducción
Traducción a otra lengua	No	No
Revisión y corrección de estilo	Si	Revisión gramatical
Análisis de datos	No	No
Búsqueda y organización de información	No	No
Formateo de las referencias bibliográficas	Si	Organización y formato
Generación de contenido multimedia	No	No
Otro	No	No

Datos del solicitante	
Nombre y firma	Donovan Javier Peña Montes 
Lugar y fecha	Morelia, Michoacán, MX. 16-10-2024