



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EFFECTO DEL SULFORAFANO EN LA BIOGÉNESIS Y DINÁMICA MITOCONDRIAL  
COMO MECANISMOS DE CITOPROTECCIÓN Y MUERTE CELULAR

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. MARIO FELIPE NEGRETTE GUZMÁN

TUTOR PRINCIPAL

Dr. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. ROGELIO HERNÁNDEZ PANDO

Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán

Dr. ROLANDO HERNÁNDEZ MUÑOZ

Instituto de Fisiología Celular

Ciudad de México, junio, 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de doctorado se realizó bajo la dirección del Dr. José Pedraza Chaverri en el laboratorio 209, edificio F, Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo conformado por:

Dr. José Pedraza Chaverri	Facultad de Química, UNAM
Dr. Rogelio Hernández Pando	Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán
Dr. Rolando Hernández Muñoz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Se reconoce la colaboración y asesoría de:

La Dra. Sara Huerta Yépez de la Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas del Hospital Infantil de México Federico Gómez, en los ensayos de inmucitoquímica.

La Dra. Edilia Tapia Rodríguez del Departamento de Nefrología y la Dra. Cecilia Zazueta del Departamento de Biomedicina Cardiovascular, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, en los procedimientos practicados en ratas y los estudios en mitocondria aislada, respectivamente.

El Dr. Mario Israel Vega de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Centro Médico Nacional Siglo XXI, en los ensayos de Western blot.

El Biol. Juan Carlos León Contreras del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán, en los experimentos de microscopía electrónica.

Esta tesis fue apoyada parcialmente por CONACYT (CB220046 y 252008), PAPIIT (IN201316) y PAIP (5000-9105). Durante los estudios de doctorado gocé de una beca otorgada por CONACYT (CVU 378487) y un crédito educativo condonable otorgado por COLCIENCIAS (Colombia). Se agradece el apoyo económico del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) para asistir al IV Congreso de Especies Reactivas de Oxígeno en Biología y Medicina y al XXI Congreso Nacional de Inmunología.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día de junio de 2016.

El Jurado de examen de doctorado estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Salvador Uribe Carvajal	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Francisco Plasencia de la Parra	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Eleazar Martínez Barajas	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Helena Porta Ducoing	Instituto de Biotecnología, UNAM
Secretario	Dra. Soledad Funes Argüello	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

***“Un poco de ciencia aleja de Dios, mucha devuelve a Él.”***

***Desconocido.***

## **DEDICATORIA**

Al Dios que no me deja alejar por mucho que lo intento.

A Scarleth, Helena e Isabel: mis motivos, mi espíritu, mi vitalidad, las mujeres de mi vida. No hay razones más fuertes por las que quiera seguir viviendo y creciendo.

A Edelmira: el amor inagotable. Sigo creyendo que sólo gracias a ti, Dios nunca se aleja de mí.

A Juan Miguel, Juan Miguel y Juan Mario: siempre me lamenté por el tiempo lejos de ustedes. Es el momento para recuperarlo.

A Miguel: parte del aire, parte del tiempo, parte de mí, por siempre.

## AGRADECIMIENTOS

A los animales, cuyas vidas se transformaron en datos que mejorarán otras; principio básico recurrente en nuestra historia.

A la UNAM, porque hoy hablo con el espíritu y el orgullo que siento no puede ser mayor.

Al Dr. José Pedraza y la Dra. Edilia Tapia, por el *saber-hacer* transmitido durante todos estos años, pero, sobre todo, por toda la confianza y la empatía. Espero nuestra relación se mantenga por mucho tiempo.

Al Dr. Rogelio Hernández Pando, por sus acertados comentarios, su colaboración y su deferencia. De mi parte, toda la admiración y el mayor de los respetos.

Al Dr. Rolando Hernández Muñoz, por impulsar cambios importantes en este proyecto desde sus inicios y por su cordialidad en todos los momentos.

A la Dra. Sara Huerta y el Dr. Mario Vega, por integrarme a sus equipos como uno de los suyos. Lo aprendido en sus laboratorios será para siempre parte fundamental de mi desempeño como investigador.

A la Dra. Cecilia Zazueta, por su calidez, su disponibilidad y sus precisas explicaciones.

A los doctores Rosendo Luria y Guillermina Baay, por el permanente apoyo, las valiosas discusiones y los buenos momentos.

A la Dra. Laura Bonifaz Alfonzo, por la amabilidad con la que me ofreció sus recursos disponibles.

A Gabriel Vega, por sus recomendaciones y el valioso intercambio de impresiones acerca de nuestros trabajos.

A Paty Rojo y Marcela Alcántara, por su buena y valiosa disposición para mi introducción en la citometría de flujo.

A Juan Carlos León, por las tardes-noches de trabajo bien conversado.

A Lucero Chávez, por haber sido mi mano derecha –literalmente- en un momento aciago.

A Leticia García y su siempre buena actitud, que levantó los ánimos varias veces en esta carrera de obstáculos. Muchísimas gracias por todo y muchas bendiciones.

A Amelia González, nuestra más desinteresada y feliz abuela... quiero decir, colaboradora. No sé qué hubiera sido de esto sin su compañía.

A la familia Lizarazo Moreno, nuestro pedazo de Colombia en México, nuestra familia; y la familia nunca se olvida, nunca se aleja. Vernos aprender, crecer y proliferar juntos ha sido de las experiencias más bonitas que pudimos tener en estos años.

A Enrique Valencia, Betty Carranza y su familia alrededor, la primera familia mexicana que nos brindó su hospitalidad. Tal vez por ustedes, México siempre será tan especial para nosotros. Hoy son nuestros amigos para toda la vida en cualquier lugar que nuestra vida sea.

A Ramsés García y toda su familia, por esa gran amistad, por la celebración en los buenos momentos y el apoyo en aquellos más difíciles. También por el placer de trabajar juntos. Seguiremos encontrándonos en la vida, estoy seguro.

A Omar Medina, porque el soporte no sólo fue técnico, en muchas ocasiones alivió el día, a pesar de lo frustrante que pudiera ser para cualquiera de los dos.

A los amigos y compañeros que fui dejando regados en mi periplo por diferentes laboratorios, soy de ustedes y espero poder verlos continuamente.

# ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	i
ABSTRACT .....	iii
RESUMEN .....	iv
1. ANTECEDENTES.....	1
1.1. MITOCONDRIAS EN LA CITOPROTECCION Y LA MUERTE	
CELULAR.....	1
1.1.1. Funciones básicas de la mitocondria.....	1
1.1.2. Mitocondria y apoptosis.....	2
1.1.3. Dinámica mitocondrial.....	4
1.1.4. Biogénesis mitocondrial.....	7
1.1.5. El factor Nrf2 y la biogénesis mitocondrial.....	10
1.1.6. Mitocondrias y cáncer.....	11
1.2. SULFORAFANO (SFN).....	12
1.2.1. Generalidades y mecanismos citoprotectores.....	12
1.2.2. SFN y mitocondria. Inducción e inhibición de la apoptosis.....	13
1.2.3. El SFN induce la biogénesis mitocondrial.....	14
1.2.4. ¿Otros activadores de Nrf2 inducen la biogénesis mitocondrial?.	17
2. JUSTIFICACIÓN.....	17
3. HIPÓTESIS.....	17
4. OBJETIVOS.....	18
4.1. Objetivo general.....	18
4.2. Objetivos específicos.....	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
5.1. Materiales.....	18
5.2. Cultivos celulares.....	20
5.3. Diseño experimental.....	21
5.4. Reducción de MTT.....	21
5.5. Proliferación celular.....	21
5.6. Viabilidad (Cristal violeta) .....	22
5.7. Masa y dinámica mitocondrial.....	22



5.8. Caracterización de la apoptosis en células en cultivo.....	23
5.9. Expresión y localización celular de factores, coactivadores y marcadores vinculados a la biogénesis y dinámica mitocondrial.....	23
5.10.    Abatimiento de la expresión de NRF1 .....	25
5.11.    Cotratamiento SFN-CDDP en células tumorales.....	25
5.12.    Validación de la participación de Nrf2 en la inducción farmacológica de la biogénesis mitocondrial.....	25
5.13.    Análisis estadístico.....	28
6. RESULTADOS.....	28
6.1. El SFN indujo activación mitocondrial en células LLCPK1.....	28
6.2. El SFN indujo una disminución en la viabilidad de células PC3 acompañada por activación mitocondrial.....	30
6.3. El SFN indujo un aumento en masa mitocondrial relativa y en proteínas marcadoras de la biogénesis mitocondrial en células LLCPK1 a las 24 h de tratamiento.....	32
6.4. El SFN indujo aumento en masa mitocondrial relativa y proteínas marcadoras de biogénesis mitocondrial en células PC3 desde las 48 de tratamiento.....	34
6.5. El SFN indujo disrupción del PMM en células PC3.....	36
6.6. El SFN indujo fusión mitocondrial en células LLCPK1.....	37
6.7. El SFN indujo división mitocondrial en células PC3.....	39
6.8. El SFN indujo un aumento en la expresión y/o translocación nuclear de Nrf2 y PGC1 $\alpha$ e inhibición del factor HIF1 $\alpha$ en células PC3.....	41
6.9. NRF1 cumple un papel en el efecto del SFN sobre células PC3.....	42
6.10.    El cotratamiento SFN-CDDP tuvo un efecto aditivo en células PC3.....	43
6.11.    La curcumina, un estabilizador de Nrf2, atenúa el daño mitocondrial renal inducido por gentamicina, al parecer, por un mecanismo asociado a la biogénesis mitocondrial .....	45
7. DISCUSIÓN.....	55

8. CONCLUSIONES.....	64
9. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.....	64
10.REFERENCIAS.....	65
11.ANEXOS.....	79
11.1.    Figuras anexas.....	79
11.2.    Artículos publicados.....	80

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico.
<b>ARE</b>	Elemento de respuesta antioxidante.
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico.
<b>ARNm</b>	ARN mensajero.
<b>ARNmt</b>	ARN mitocondrial.
<b>ARNr</b>	ARN ribosomal.
<b>ASB</b>	Albumina sérica bovina.
<b>Bax</b>	Proteína X asociada a Bcl2.
<b>Bcl2</b>	Linfoma de célula B 2.
<b>BrdU</b>	5-bromo-2'-desoxiuridina.
<b>CCCP</b>	Carbonilcianuro m-clorofenilhidrazona.
<b>CR</b>	Control respiratorio.
<b>CS</b>	Citrato sintasa.
<b>CsA</b>	Ciclosporina A.
<b>CT</b>	Grupo Control.
<b>CUR</b>	Curcumina.
<b>CYP</b>	Citocromo P450.
<b>cyt c</b>	Citocromo c.
<b>DMEM</b>	Medio Eagle modificado de Dulbecco.
<b>EEM</b>	Error estándar de la media.
<b>ERK</b>	Cinasa regulada por señal extracelular.
<b>ERO</b>	Especies reactivas de oxígeno.
<b>ERR<math>\alpha</math></b>	Receptor relacionado al estrógeno.
<b>GM</b>	Gentamicina.
<b>HO-1</b>	Hemo-oxigenasa 1.
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano.
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno.
<b>JNK</b>	Cinasa jun N-terminal.
<b>Keap1</b>	Proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch.
<b>MAPK</b>	Proteínas cinasa activadas por mitógenos.

<b>mTERF</b>	Factor de terminación de la transcripción mitocondrial.
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.
<b>MT-ND1</b>	Subunidad 1 de la NADH deshidrogenasa.
<b>NDGA</b>	Ácido nordihidroguayarético.
<b>NF-κB</b>	Factor nuclear kappa B.
<b>NRF1</b>	Factor nuclear respiratorio 1.
<b>NRF2</b>	Factor nuclear respiratorio 2.
<b>Nrf2</b>	Factor 2 relacionado al factor nuclear eritroide 2.
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anión superóxido.
<b>PBS</b>	Amortiguador salino de fosfatos.
<b>PGC1</b>	Coactivador-1 del receptor-γ activado por proliferadores de peroxisomas.
<b>PMM</b>	Potencial de membrana mitocondrial.
<b>POLRMT</b>	ARN polimerasa mitocondrial.
<b>PPARα</b>	Receptor α activado por proliferadores de peroxisomas.
<b>PRC</b>	Coactivador-1 relacionado a PGC-1.
<b>SAC</b>	S-alilcisteína.
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida.
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino.
<b>SFN</b>	Sulforafano.
<b>siRNA</b>	ARN pequeño de interferencia.
<b>Sp1</b>	Proteína estimuladora 1.
<b>Tfam</b>	Factor A de transcripción mitocondrial.
<b>TFB1M</b>	Factor B1 de transcripción mitocondrial.
<b>TFB2M</b>	Factor B2 de transcripción mitocondrial.
<b>TPM</b>	Transición de permeabilidad mitocondrial.

## ABSTRACT

Mitochondrial morphology regulates cellular responses to stress and in apoptosis. Mitochondrial biogenesis can be modulated by the nuclear factor E2-related factor-2 (Nrf2), main target of the antioxidant sulforaphane (SFN). It is interesting to know if SFN-induced mitochondrial biogenesis and changes in mitochondrial dynamics (fusion and fission) mediate seemingly contradictory effects: cytoprotection against oxidative damage in non-tumor cells and pro-apoptotic activity in tumor cells. In order to drive that, renal tubular cells LLCPK1 and prostate cancer cells PC3 were treated with SFN, and mitochondrial activity, biogenesis, and morphology were evaluated. In PC3 cells, Nrf2 nuclear accumulation and intrinsic apoptosis markers were also evaluated; it was explored if the nuclear respiratory factor 1 (NRF1) knock-down affects the effect of SFN on cell viability; and SFN-cisplatin (CDDP) co-treatment was studied. In addition, Nrf2-mediated mitochondrial biogenesis was validated in a gentamicin-induced renal mitochondrial dysfunction model in both LLCPK1 cells and rats treated with curcumin. SFN induced mitochondrial activation in both LLCPK1 and PC3 cells at the same concentration and exposure time. In LLCPK1 cells, this mitochondrial activation was associated to mitochondrial biogenesis at the first 24 h and, then, to mitochondrial fusion. In PC3 cells, mitochondrial activation was parallel to cell viability decrease and mitochondrial biogenesis was evidenced since 48 h of SFN treatment. Events linked to intrinsic apoptosis as mitochondrial depolarization and fragmentation as well as Bcl-2-associated X protein (Bax) accumulation were also observed. All of these effects in PC3 cells were preceded by nuclear accumulation of Nrf2. The increase in the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ) and the inhibition in hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) at 72 h of treatment would indicate a metabolic shift that activates mitochondrial functions, e.g. intrinsic apoptosis. NRF1 knock-down evidenced an important role in SFN-induced death in PC3 cells. SFN-CDDP co-treatment in PC3 cells was additive and there was no cytoprotection induced by SFN. Finally, curcumin protected renal cells against gentamicin-induced death and mitochondrial dysfunction, probably, by activation of a mitochondrial biogenesis program triggered by Nrf2. In conclusion,

SFN induces cell-specific responses by differential modulation of mitochondrial biogenesis and dynamics, with a fundamental role of Nrf2, its main target.

## RESUMEN

La morfología mitocondrial regula la respuesta celular frente al estrés y en la apoptosis. La biogénesis mitocondrial puede regularse mediante el factor 2 relacionado al factor nuclear eritroide 2 (Nrf2), principal blanco del antioxidante sulforafano (SFN). Es de interés establecer si la biogénesis mitocondrial y los cambios en la dinámica mitocondrial (fusión y fisión) inducidos por el SFN, median sus efectos aparentemente contradictorios: citoprotección ante el daño oxidante en células no tumorales y actividad proapoptótica intrínseca en células tumorales. Para esto, células de túbulo renal LLCPK1 y de cáncer de próstata PC3 se trataron con SFN y se evaluó su actividad, biogénesis y morfología mitocondrial. En la línea PC3, también se evaluó la acumulación nuclear de Nrf2 y marcadores de la apoptosis intrínseca; se exploró cómo el silenciamiento del factor nuclear respiratorio 1 (NRF1) altera el efecto del SFN sobre la viabilidad; y se determinó el efecto del cotratamiento SFN-cisplatino (CDDP). Adicionalmente, se validó la biogénesis mitocondrial a través de Nrf2 usando curcumina en un modelo de disfunción mitocondrial renal inducida por gentamicina en células LLCPK1 y ratas. El SFN, a una misma concentración y tiempo de exposición, indujo activación mitocondrial en células LLCPK1 y PC3. En la línea LLCPK1, la activación mitocondrial se dio por biogénesis mitocondrial las primeras 24 h y posterior fusión mitocondrial. En las PC3, donde la activación mitocondrial fue paralela a una reducción en la viabilidad, se evidenció biogénesis mitocondrial desde las 48 h de tratamiento con SFN. También se observaron despolarización y fragmentación mitocondrial e incremento en la expresión de la proteína X asociada a Bcl-2 (Bax), eventos asociados a la apoptosis intrínseca. Estos efectos en células PC3 fueron precedidos por la acumulación nuclear de Nrf2. El incremento en el coactivador-1 $\alpha$  del receptor- $\gamma$  activado por proliferadores de peroxisomas (PGC1 $\alpha$ ) y la inhibición del factor 1 $\alpha$  inducible por hipoxia (HIF $\alpha$ ) a las 72 horas de tratamiento, indicarían una inversión

metabólica que activa funciones mitocondriales (por ejemplo, la apoptosis). El silenciamiento de NRF1 en células PC3 evidenció su papel importante en la muerte inducida por el SFN. El cotratamiento SFN-CDDP en células PC3 resultó ser aditivo, sin citoprotección de la línea tumoral. Finalmente, la curcumina protegió contra la muerte celular y la disfunción mitocondrial renal inducidas por gentamicina, probablemente por la activación de un programa de biogénesis mitocondrial iniciado por Nrf2. Se concluye que el SFN induce respuestas específicas del tipo celular modulando diferencialmente la biogénesis y la dinámica mitocondrial, con un papel fundamental de su principal blanco, Nrf2.

## **1. ANTECEDENTES**

### **1.1. MITOCONDRIAS EN LA CITOPROTECCIÓN Y LA MUERTE CELULAR**

#### **1.1.1. Funciones básicas de la mitocondria**

Probablemente, el origen de la mitocondria está ligado al origen de las eucariotas. Se ha propuesto que la mitocondria surgió de una alfa-proteobacteria envuelta en un progenitor eucariota que se benefició enormemente dada la mayor demanda energética que involucraba un genoma 200,000 veces mayor que el de la bacteria huésped [1]. Sin embargo, el mantenimiento del suministro celular de energía no es la única función crítica de la mitocondria; esta también tiene una implicación importante en múltiples rutas de señalización celular y en la apoptosis [2].

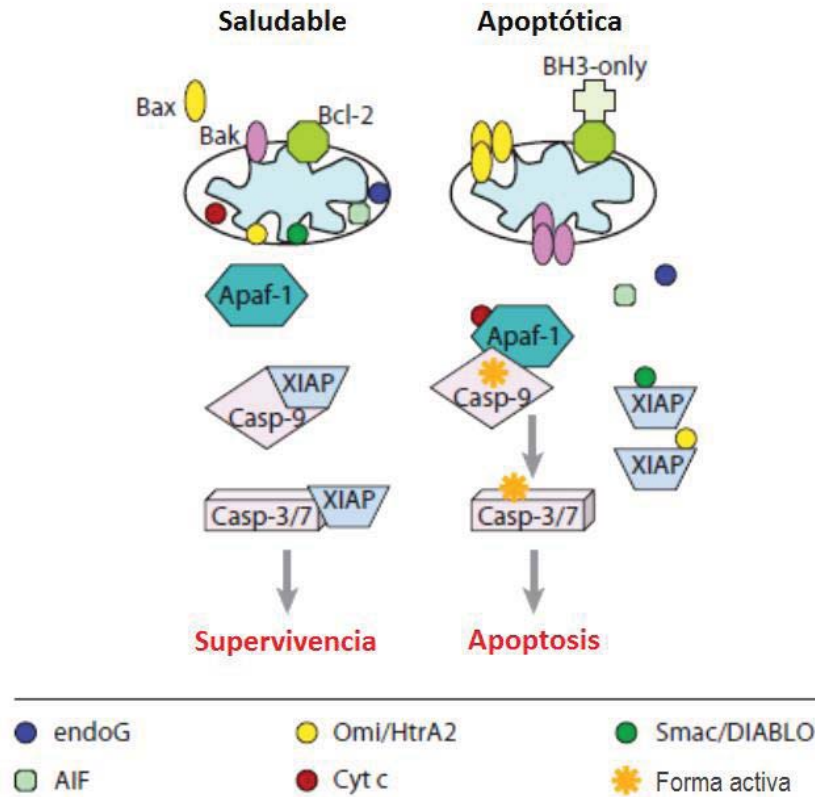
Los primeros bioquímicos reconocieron la importancia de las mitocondrias como sitios para la oxidación aeróbica de los combustibles metabólicos. La mitocondria es el organelo donde ocurre la cadena de transporte de electrones y el sistema de fosforilación oxidante que provee el grueso de la energía celular en forma de adenosina trifosfato (ATP). Gran parte de la energía de enlaces químicos de la oxidación de grasas y carbohidratos, se convierte en poder reductor como nicotinamida adenina dinucleótido reducida (NADH) y flavina adenina dinucleótido reducida (FADH<sub>2</sub>) en la matriz mitocondrial. Luego, la cadena respiratoria, consistente de una serie de bombas electrógenas de protones, convierten este potencial reductor en un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana interna mitocondrial. El potencial electroquímico de este gradiente se convierte en enlaces fosfatos de alta energía en el ATP por medio de la ATP sintasa. También está plenamente establecida la contribución de la mitocondria a muchas funciones importantes como la oxidación del piruvato y de los ácidos grasos, el metabolismo del nitrógeno y la biosíntesis del grupo hemo, entre otras [3]. Los complejos I y III de la cadena respiratoria de electrones, además de participar en el proceso de transferencia y en la generación del gradiente de protones, también generan especies reactivas de oxígeno (ERO). Estas incluyen radicales de oxígeno y la especie no radical peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que se han asociado con daño a componentes clave de la célula. Sin embargo, múltiples informes indican que las



ERO mitocondriales influyen en rutas de señalización homeostática que controlan la proliferación y la diferenciación celular, y contribuyen con rutas de señalización para el estrés adaptativo, como la de la hipoxia [4].

### **1.1.2. Mitocondria y apoptosis**

La apoptosis es un proceso mediante el cual las células activan un programa suicida intrínseco como respuesta a eventos tales como la diferenciación o la proliferación celular. Está asociada a cambios morfológicos y bioquímicos característicos: formación de protuberancias (en inglés, *blebbing*) en la membrana, encogimiento de la célula, condensación de la cromatina, rompimiento del ADN y fragmentación celular; dando lugar a los llamados cuerpos apoptóticos. En mamíferos, existen dos rutas principales que conducen a la activación de la apoptosis: una es la ruta extrínseca o muerte-receptor, que involucra receptores transmembrana en la membrana plasmática; la segunda, es la llamada ruta intrínseca o mitocondrial, que pone a la mitocondria en el centro de la cascada de señalización [5]. La mitocondria no es sólo el sitio donde interactúan las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas que determinan los destinos celulares, sino que también es el sitio de origen de las señales que inician la activación de la apoptosis, a través de varios mecanismos. Las proteínas miembros de la familia Bcl-2 regulan la liberación de proteínas del espacio intermembrana de la mitocondria al citosol, donde activan las caspasas, proteasas que desmantelan la célula y señalizan la eficiente fagocitosis de los cuerpos apoptóticos celulares (Figura 1). Por ejemplo, el citocromo *c* (cyt *c*) es un componente clave del apoptosoma para la activación de la caspasa-9 iniciadora, y las proteínas Smac y Omi, ambas se enlazan a los inhibidores de apoptosis (IAP) atenuando sus efectos inhibitorios sobre las caspasas. El cambio en la permeabilidad mitocondrial que permite la liberación de estas proteínas es mediado por las proteínas Bax y Bak, miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2. Los miembros antiapoptóticos Bcl-2 y Bcl-xl inhiben la acción de las primeras [6].



**Figura 1.** El papel de la mitocondria en la apoptosis en vertebrados (modificado de [6]). La acumulación de Bax y/o Bak en la membrana mitocondrial externa conduce a su permeabilización y a la posterior liberación de proteínas del espacio intermembrana al citoplasma. Bcl-2 ejerce un efecto inhibitorio de la apoptosis al unirse a Bax/Bak. Sin embargo, las proteínas de dominio BH3 (BH3-only, por ejemplo, Bid), se pueden unir a Bcl-2 atenuando su función inhibitoria, o bien, pueden activar directamente a Bax/Bak. De estas proteínas liberadas, la endonucleasa G (endoG) y el factor inductor de apoptosis (AIF) inducen apoptosis independiente de caspasas por translocación directa al núcleo donde fragmentan el ADN nuclear. Por otra parte, el citocromo (cyt) c se une a y promueve cambios conformacionales en el factor-1 activador de la apoptosis (Apaf-1) que permite su unión a la caspasa-9 (Casp-9) inactiva para formar el apoptosoma. Como parte del apoptosoma, Casp-9 se activa y, así, activa a las caspasas ejecutoras 3/7 (Casp-3/7) que inducen la activación de un gran número de otras proteasas y nucleasas que inician el desmantelamiento y la muerte celular. Adicionalmente, Smac/DIABLO y/o Omi/HtrA2 en el citoplasma pueden unirse a la proteína X inhibidora de la apoptosis (XIAP) conduciendo a su separación de Casp-9 y Casp-3/7, lo que facilita la activación de estas últimas.

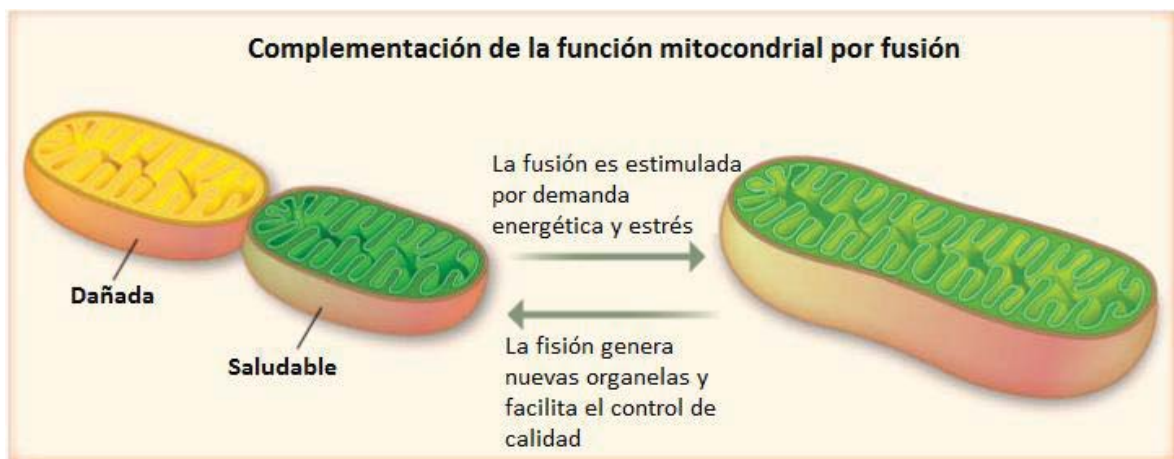
Inicialmente, el mecanismo de liberación del cyt c fue materia de discusión, dado que la morfología mitocondrial permanece intacta [7], [8]. Actualmente, se conoce que el poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial (TPM) y el gradiente

electroquímico también pueden tener un papel en la liberación de proteínas inductoras de apoptosis. El poro TPM consiste de un complejo multiproteína formado principalmente por el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), la adenina dinucleótido translocasa (ANT), el transportador mitocondrial de fosfatos (PiC) y la ciclofilina D. Este poro se forma en los sitios de contacto entre las membranas interna y externa mitocondrial, permitiendo el paso de moléculas menores que 1,500 Da. Esto lleva a que protones y otros iones como el  $\text{Ca}^{2+}$  se muevan libremente a través de la membrana y, en consecuencia, el potencial transmembrana caiga [9]. Un potencial efecto deletéreo de la generación de ERO y el estrés oxidante es la sensibilización de la mitocondria hacia la formación del poro TPM [10].

### **1.1.3. Dinámica mitocondrial**

En la década de 1980, estudios de microscopía en células vivas revelaron que las mitocondrias son organelos altamente dinámicos que pueden construir grandes redes intracelulares interconectadas. En muchos tipos de células eucariotas, las mitocondrias continuamente se mueven a lo largo de los carriles del citoesqueleto y frecuentemente se fusionan y se dividen [11]. La fusión mitocondrial es un proceso por el que se forman sincitios mitocondriales localizados y/o extendidos dentro de la célula, lográndose cierto tipo de comunicación entre los organelos. La fisión mitocondrial antagoniza la fusión, dando como resultado organelos aislados de menor tamaño [12]. Ambos procesos, conocidos en conjunto como dinámica mitocondrial, se dan por la acción de grandes GTPasas multidominio relacionadas a la dinamina, una familia de proteínas que se autoensamblan para remodelar diversos tipos de membranas celulares. En mamíferos, la fisión mitocondrial es mediada principalmente por la proteína-1 relacionada a la dinamina (Drp1), que forma estructuras helicoidales que envuelven a la mitocondria y la constriñen. La proteína fisión mitocondrial 1 (Fis1) se encuentra anclada en la membrana mitocondrial externa, del lado del citoplasma, y funciona como un receptor para el reclutamiento de Drp1 a la mitocondria. Por otra parte, en la fusión mitocondrial participan dos familias de proteínas tipo dinaminas: las mitofusinas 1 y 2 (Mfn1 y

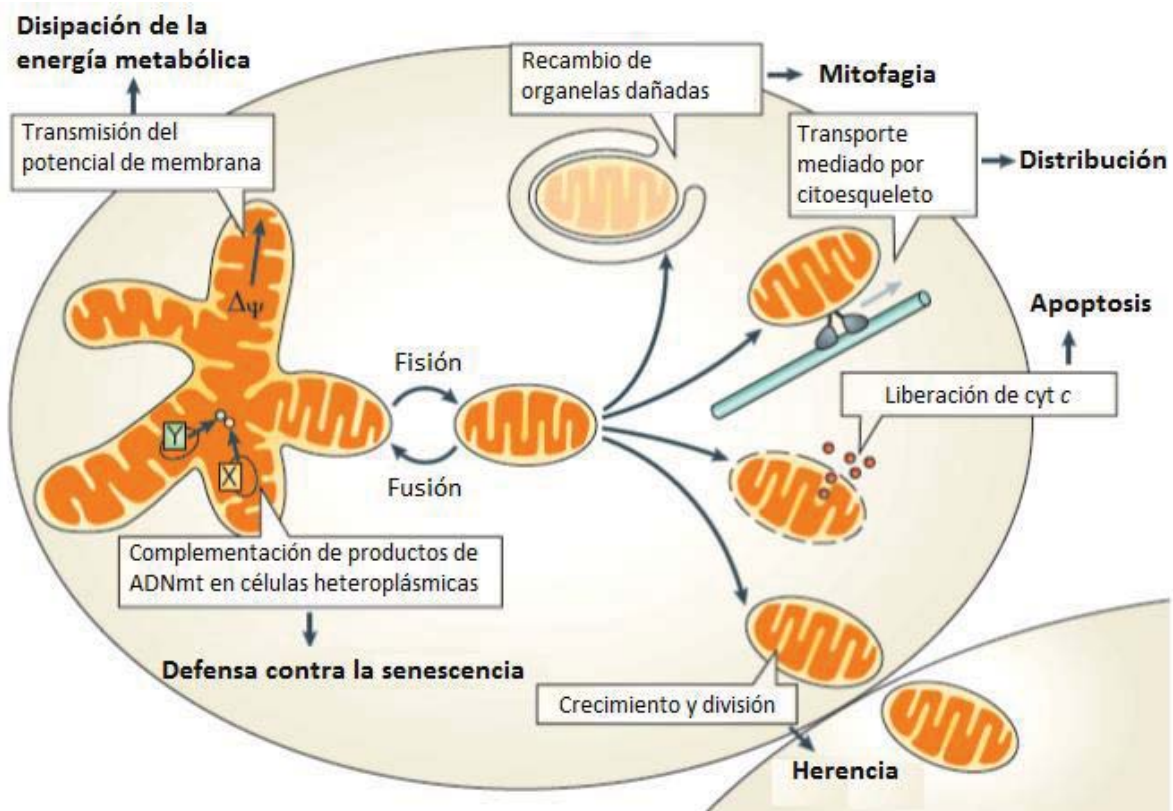
Mfn2), esenciales para la fusión de la membrana mitocondrial externa, y la proteína 1 de atrofia óptica (OPA1), que media la fusión de la membrana mitocondrial interna. Las proteínas que controlan la dinámica mitocondrial están altamente reguladas; por ejemplo, Drp1 existe como varias variantes de *splicing* y sufre diversas modificaciones post-traduccionales, de modo que se ajusta a diversos eventos celulares [4], [11]. En general, las actividades antagónicas y balanceadas de la fusión y fisión mitocondrial le permiten a la célula responder a las condiciones fisiológicas siempre cambiantes [11]. La fusión ayuda a mitigar el estrés metabólico o ambiental mediante la mezcla de los contenidos de mitocondrias parcialmente dañadas como una forma de complementación (Figura 2). La fisión es necesaria para crear nuevas mitocondrias en células en crecimiento y división, pero también contribuye al control de calidad permitiendo la segregación y remoción autofágica de mitocondrias dañadas (mitofagia).



**Figura 2.** Dinámica mitocondrial respondiendo al estrés celular (modificado de [13]). La fusión mitocondrial puede maximizar la capacidad oxidante de las mitocondrias en respuesta a una demanda energética o al estrés tóxico por debajo de un umbral crítico. Otro nivel de respuesta al estrés más severo involucra la eliminación completa de mitocondrias dañadas: las mitocondrias con proteínas o ácidos nucleicos dañados (verde-amarillo) pueden segregar este material para luego llevar a cabo una fisión asimétrica que da por resultado mitocondrias saludables (verde) y dañadas (amarilla): las mitocondrias dañadas luego son eliminadas por mitofagia.

La fisión también puede facilitar la apoptosis cuando hay altos niveles de estrés celular (Figura 3). Sin embargo, los mecanismos por los cuales la dinámica mitocondrial afecta la apoptosis no se han descrito completamente. Se sabe que,

durante la apoptosis, la mitocondria se fragmenta dramáticamente como consecuencia del reclutamiento aumentado de Drp1 del citoplasma a la mitocondria, ejerciendo un papel regulatorio positivo en la permeabilización de la membrana mitocondrial externa mediado por Bax/Bak. En contraste, la fusión mitocondrial protege las células de la muerte celular apoptótica, y la activación de la apoptosis coordinadamente inhibe la actividad de fusión [4], [13].



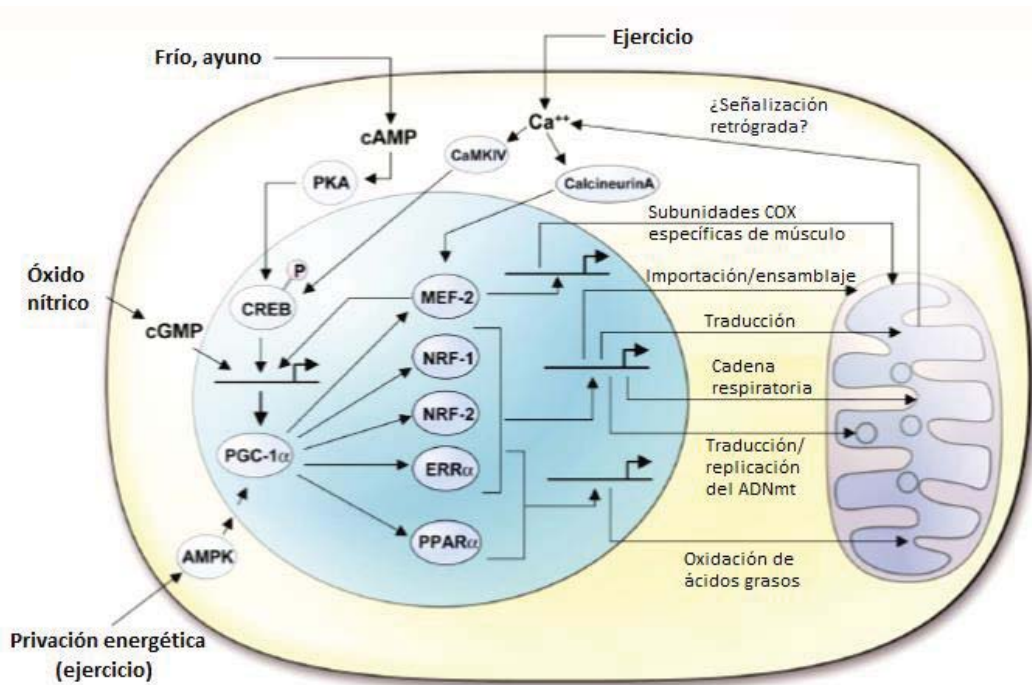
**Figura 3.** Funciones biológicas de la dinámica mitocondrial (modificado de [11]). Además de la respuesta al estrés que da como resultado mitocondrias con mayor capacidad oxidante o la eliminación de mitocondrias dañadas, la dinámica mitocondrial se asocia a otras funciones fundamentales: la fusión permite la complementación de material genético y proteico mitocondrial que va acumulando alteraciones por la senescencia celular; la fisión es un evento previo a la división celular para que las células hijas hereden contenidos mitocondriales similares; cuando las mitocondrias tienen que transportarse a puntos específicos de la célula, se dividen y se distribuyen a través del citoesqueleto; la fisión es necesaria para la apoptosis intrínseca (ver más detalles en la sección 1.1.3).

#### 1.1.4. Biogénesis mitocondrial

Hay una correlación directa entre la demanda energética de una célula y su contenido mitocondrial, que ha dirigido la atención hacia los mecanismos que controlan la biogénesis mitocondrial [2]. Las mitocondrias no se pueden generar *de novo*; en vez de esto, ellas proliferan por crecimiento y posterior fisión. Las mitocondrias tienen su propio genoma (el ADN mitocondrial, ADNmt) y maquinaria de traducción proteica; sin embargo, su capacidad codificante es de sólo 13 proteínas, subunidades esenciales de los complejos respiratorios. La mayoría de las proteínas respiratorias mitocondriales se derivan de genes nucleares [3], [11]. La biogénesis mitocondrial comprende la importación desde el citosol de proteínas codificadas en el núcleo, la incorporación de lípidos de membrana importados y sintetizados en la mitocondria, la amplificación del ADNmt y la traducción de proteínas codificadas en la mitocondria [11]. Así, el proceso de biogénesis mitocondrial es complicado por el hecho de que la expresión de estos dos grupos de genes tiene que ser exactamente coordinada, marcando una comunicación núcleo-mitocondria como parte central del problema [2].

Aunque las rutas que controlan la biogénesis mitocondrial no se han dilucidado completamente, en los últimos años se ha avanzado en la identificación de participantes clave. La expresión de proteínas mitocondriales codificadas en el genoma nuclear, participantes en la fosforilación oxidante, la biosíntesis del grupo hemo, la importación de proteínas mitocondriales y la transcripción y replicación del ADNmt, se regula por factores de transcripción y coactivadores transcripcionales. Los factores de transcripción de mayor prevalencia, que activan promotores de genes para la función mitocondrial, son los factores respiratorios nucleares 1 y 2 (NRF1 y NRF2) y el receptor relacionado al estrógeno (ERR $\alpha$ ), que trabajan concertadamente con los coactivadores transcripcionales de la familia del coactivador-1 del receptor-y activado por proliferadores de peroxisomas (PGC1), PGC1 $\alpha$ , PGC1 $\beta$  y el coactivador-1 relacionado a PGC1 (PRC) [14]. Los factores de transcripción tienen como blanco genes que especifican la cadena respiratoria, la

transcripción mitocondrial, la maquinaria de traducción y replicación mitocondrial, la importación de proteínas y el aparato de ensamblaje, entre otros (Figura 4).



**Figura 4.** Activación de la biogénesis y la función mitocondrial por el coactivador-1α del receptor-γ activado por proliferadores de peroxisomas (PGC1α, modificado de [3]). Varios estímulos pueden inducir la expresión de PGC1α o activarlo post-traduccionalmente. El aumento en el Ca<sup>2+</sup> citoplasmático resultante del ejercicio, activa a la proteína cinasa dependiente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina (CaMK) IV que, a su vez, fosforila y activa a la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB), un factor de transcripción que se une a la región promotora del gen codificante de PGC1α e induce su expresión. Es de esperar que los aumentos en AMPc dados por estímulos mediados por receptores β-adrenérgicos acoplados a proteínas G<sub>s</sub> (frío o ayuno) también conduzcan a la inducción de PGC1α. El AMPc activa a la proteína cinasa A (PKA) y esta fosforila a CREB. El Ca<sup>2+</sup> citoplasmático también puede activar a la calcineurina A e inducir a PGC1α a través del factor 2 potenciador de miocitos (MEF-2). La señalización dependiente del GMPc, que puede resultar del incremento farmacológico del óxido nítrico, también induce la expresión de PGC1α. Las disminuciones en el nivel de ATP durante el ejercicio producen incrementos en la relación AMP/ATP que aumentan la actividad de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK). AMPK fosforila a PGC1α conduciendo a una mayor expresión de PGC1α por unión a su propio promotor. Finalmente, PGC1α interactúa con MEF-2, los factores nucleares respiratorios 1 y 2 (NRF-1 y -2), el receptor-α relacionado con estrógenos (ERRα) y el receptor-α activado por proliferadores de peroxisomas (PPARα) para trans-activar la expresión de genes involucrados en los procesos mitocondriales indicados en la figura.

La transcripción del ADNmt requiere un pequeño número de proteínas codificadas en el núcleo: el factor A de transcripción mitocondrial (Tfam) para la activación, las isoformas del factor B de transcripción mitocondrial (TFB1M y TFB2M) necesarios para el reconocimiento del promotor, un factor de terminación (mTERF) y una ARN polimerasa mitocondrial (POLRMT) simple [3], [15]. Tfam, que estimula la transcripción del ADNmt en un transcrito poligénico procesado en 14 ARNt, 12 ARNm y dos ARNr, se activa por NRF1. Además de controlar a Tfam, NRF1 controla muchos genes involucrados en la función y biogénesis mitocondrial, sugiriéndose un papel integrador para este factor, no obstante, el programa biosintético mitocondrial en vertebrados parece involucrar la integración de múltiples rutas regulatorias transcripcionales que controlan la expresión de genes nucleares y mitocondriales en un modo tejido- y estímulo-específico [2].

NRF1, NRF2, ERR $\alpha$  y otros factores que controlan la expresión de genes respiratorios, se activan, directa o indirectamente, por coactivadores de la familia PGC1, cuya expresión diferencial se controla por un arreglo de señales ambientales que incluyen la temperatura, la privación de energía y la disponibilidad de nutrientes y factores de crecimiento (Figura 4). De los miembros de PGC1, PGC1 $\alpha$  juega un papel integrador en la biogénesis mitocondrial, dado sus efectos pleiotrópicos sobre procesos modificadores del estatus energético de la mitocondria, debido a una amplia variedad de patrones que interactúan [2], [3], [15].

Es preciso establecer diferencias entre la biogénesis mitocondrial y la dinámica mitocondrial. Por ejemplo, mientras la biogénesis incrementa la masa mitocondrial, la fisión incrementa el número real de mitocondrias [16]. Si bien, nada concluyente se ha dicho en cuanto a la relación existente entre biogénesis y dinámica mitocondrial, algunos autores han hecho aproximaciones en las que han encontrado enlaces entre el contenido mitocondrial y las morfologías fragmentada y elongada de la mitocondria en neuronas, sin que la biogénesis mitocondrial favorezca una u otra [17], [18].



### 1.1.5. El factor Nrf2 y la biogénesis mitocondrial

El factor 2 relacionado al factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) es un factor transcripcional que regula un conjunto amplio de respuestas adaptativas al estrés celular intrínseco y extrínseco. Es un factor tipo cremallera de leucina básica (bZIP) que reside en el citoplasma hasta que un incremento en el estrés oxidante induce su translocación al núcleo, donde heterodimeriza con otras proteínas bZIP de la familia sMaf, y se une a secuencias regulatorias en la región promotora de genes citoprotectores (elementos de respuesta antioxidante, ARE). En la inducción de esta respuesta protectora, participa, además de Nrf2 y las secuencias ARE, la proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch (Keap1), una proteína citoplasmática represora que se asocia a Nrf2, la retiene en el citoplasma y promueve su degradación proteosomal. Algunas moléculas pequeñas de origen endógeno o exógeno activan genes regulados por Nrf2 alterando la conformación de Keap1 por unión a varios residuos críticos de cisteína (sensores primarios de señales de estrés), con lo que se interrumpe la asociación entre Nrf2 y Keap1, se disminuye la frecuencia de proteólisis de Nrf2 y se incrementa su acumulación nuclear. La fosforilación de Nrf2 por una serie de cinasas también afecta su destino y distribución (Ver Figura 5, sección 1.2.1) [19], [20]. El factor Nrf2 influencia la sensibilidad a procesos fisiológicos y patológicos afectados por estrés oxidante y electrofílico, tal como los impuestos por inflamación y exposición a tóxicos ambientales [21]. Estos programas dinámicos adaptativos incluyen la inducción transcripcional de enzimas que catalizan oxidaciones y reducciones (citocromos P450), procesos de atrapamiento nucleofílico (glutatioión S-transferasas), conjugación de cofactores (UDP-glucoronosil transferasas) e inactivación de ERO (superóxido dismutasas) [19].

En 2008, Claude Piantadosi y colaboradores hicieron un hallazgo muy interesante. Este grupo demostró que, mediante la inducción de Nrf2 por el sistema hemo-oxigenasa-1 (HO-1)/monóxido de carbono (CO), se activa la biogénesis mitocondrial y se aumenta la densidad mitocondrial en células cardíacas en cultivo y en corazón de ratones, protegiéndolas de la muerte por estrés tóxico farmacológico. Por medio de un estudio *in silico*, se encontraron 13 motivos ARE en la región promotora del

gen codificante para NRF1, y un posterior análisis por inmunoprecipitación de la cromatina confirmó la unión de Nrf2 en algunas de estas secuencias. Además, hallaron que el proceso se modula por la ruta Akt/PKB [22]. Años más tarde, este mismo grupo logró rescatar ratones de sepsis letal por *Staphylococcus aureus* mediante el mismo mecanismo de activación de biogénesis mitocondrial inducida por el sistema HO-1/CO y mediada por Nrf2, encontrando que, además de aumentar la expresión y acumulación nuclear de NRF1, también aumentaron las de NRF2 y PGC1 $\alpha$  [23].

### **1.1.6. Mitocondrias y cáncer**

A comienzos del siglo XX, Otto Warburg (Premio Nobel de Fisiología por su descubrimiento de la naturaleza y modo de acción de las enzimas respiratorias en 1931) presentó evidencia de un aumento de la glicólisis en células de tumores sólidos y de leucemia en cultivo, en presencia de oxígeno. Las células cancerosas procesan la glucosa a través de la fermentación láctica, pasando por alto la entrada del piruvato en el ciclo del ácido cítrico. Warburg lanzó la hipótesis de que tal alteración metabólica se debía a una disrupción de las actividades mitocondriales y que tal evento podría considerarse “el origen de la célula cancerígena” [9]. Parece ser que el factor 1 inducible por hipoxia (HIF1) tiene alguna responsabilidad en la inversión de las rutas para el suministro energético, funcionando como una suerte de interruptor entre la glicólisis y la fosforilación oxidante. Este cambio hacia un mayor flujo metabólico glicolítico inducido por HIF1 se ha asociado con resistencia a apoptosis, angiogénesis y metástasis en diferentes tipos de células cancerosas [9], [24].

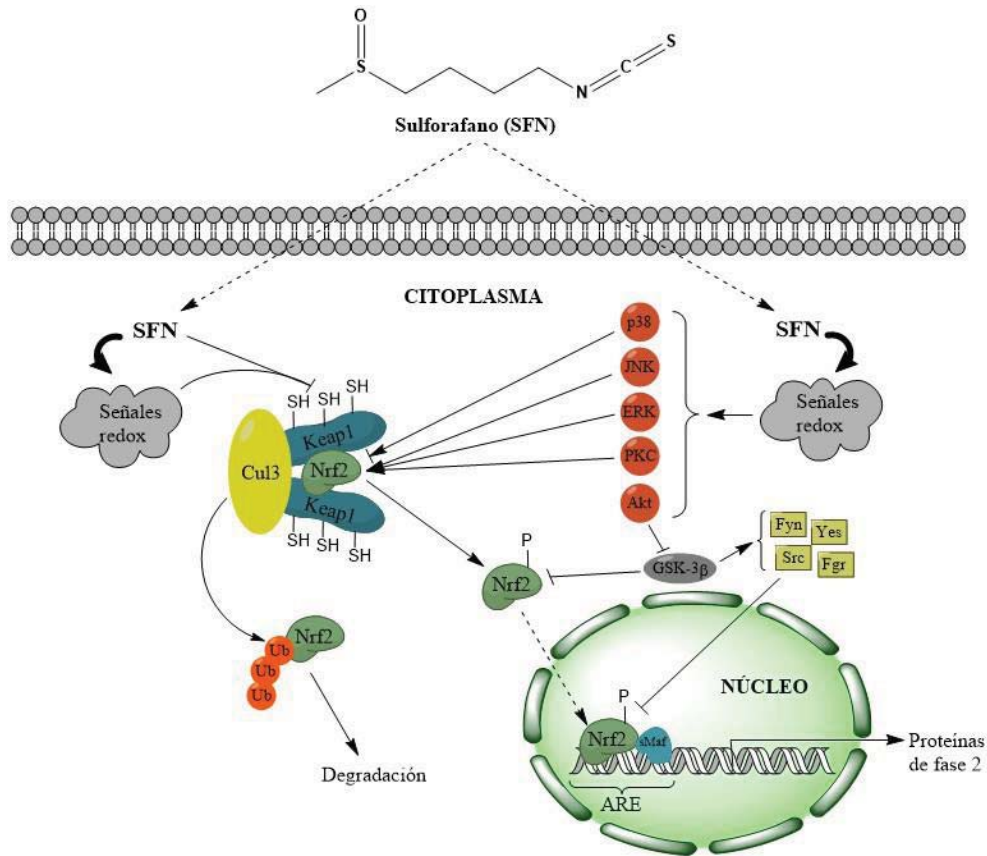
Las mitocondrias defectuosas contribuyen a la transformación celular y al cáncer. Estudios recientes revelaron que células cancerosas de varios orígenes tisulares exhiben frecuentes mutaciones en su ADNmt. Se han documentado deleciones en el marco de lectura de genes del ADNmt en carcinomas humanos renales, gástricos y de colon [16]. En acuerdo con el “Efecto Warburg”, también puede ser probable que mutaciones específicas en el ADNmt puedan causar un mal funcionamiento de la cadena respiratoria, forzando así a la célula a incrementar la glicólisis para

mantener su suplemento de ATP. Esta condición incrementa la actividad de cinasas proliferativas como Akt, probablemente por acumulación de NADH a una baja tasa de respiración mitocondrial, lo que suprime la fosfatasa que inactiva a Akt, el homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) [16]. Como un ejemplo, se pueden consultar las alteraciones en el ADNmt halladas en diferentes líneas celulares y tumores de pacientes, que se han relacionado con patogénesis, resistencia a apoptosis y promoción de la metástasis en el cáncer de mama [25]–[29].

## **1.2. SULFORAFANO (SFN)**

### **1.2.1. Generalidades y mecanismos citoprotectores**

El sulforafano (1-isotiocionato-(4R)-(metilsulfinil)butano, SFN, Figura 6) es un compuesto ampliamente estudiado desde comienzos de la década de 1990, dadas sus propiedades quimioterapéuticas que incluyen propiedades antiproliferativas y antiangiogénicas. Sin embargo, más allá de sus propiedades anticancerígenas, la investigación actual también se dirige fuertemente hacia sus efectos protectores contra importantes patologías como la hiperglicemia y el daño a tejidos asociado con el estrés oxidante. El SFN es un isotiocianato de ocurrencia natural en vegetales crucíferos (0.14 – 3.8 mg/g de peso seco en el brócoli), en los que se produce por la acción de la enzima mirosinasa sobre el glucosilato glucorafanina [30]. Sus propiedades se relacionan con su capacidad de inducir una respuesta de detoxificación de fase II, que puede ser, promoviendo directamente la disrupción de las interacciones Nrf2-proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch (Keap1) [31], [32] y/o a través de la activación de diferentes cinasas (Figura 2) [33]–[36]. Como resultado, el factor Nrf2 modula la expresión de enzimas que responden a ARE, como NAD(P)H:quinona oxidoreductasa (NQO1), HO-1 y  $\gamma$ -glutamilcisteina ligasa ( $\gamma$ GCL). Dicha inducción se ha observado en experimentos *in vivo* e *in vitro* después de tratamiento con SFN [30], [37].



**Figura 5.** Mecanismos de inducción propuestos para la translocación nuclear del factor-2 relacionado al factor-2 nuclear eritroide (Nrf2) inducida por el sulforafano (SFN, modificado de [20]). Una vez dentro de la célula, el SFN induce la disociación del complejo culina 3 (Cul3)-proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch (Keap1)-Nrf2, ya sea directamente por unión a residuos de cisteína de Keap1 o por la generación transitoria de especies reactivas (señales redox) que el SFN puede inducir cuando se conjuga al glutatión. Sin la disrupción de este complejo, Nrf2 sería ubiquitinado (Ub) por Cul3 y posteriormente degradado en el proteosoma. El SFN también puede activar diferentes cinasas (p38, JNK, ERK, PKC) que fosforilan a Nrf2 y alteran el complejo Cul3-Keap1-Nrf2. La cinasa Akt induce la translocación nuclear de un modo diferente, pues inhibe a la glutatión sintasa cinasa-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) que fosforila a Nrf2, inhibiendo su acumulación en el núcleo. GSK-3 $\beta$  también fosforila proteínas de la subfamilia Src (Src, Fyn, Yes y Fgr) que pueden inactivar a Nrf2 vía fosforilación. Por último, el Nrf2 activo se heterodimeriza en el núcleo con proteínas de la familia small Maf (sMaf) y se une al elemento de respuesta antioxidante (ARE), presente en los promotores de genes codificantes de proteínas citoprotectoras.

### 1.2.2. SFN y mitocondria. Inducción e inhibición de la apoptosis

Mediante un gran número de estudios, se ha documentado la habilidad del SFN para inducir apoptosis en células cancerosas mediante las rutas intrínseca y

extrínseca de apoptosis. Sin embargo, de manera aparentemente contradictoria, se ha observado que el SFN inhibe la apoptosis en modelos de citoprotección contra retos oxidantes tóxicos o isquémicos (revisado en [20]). Gran parte de estos efectos se han demostrado dependientes de la mitocondria (Ver Tablas 1 y 2). Llamen la atención los efectos específicos del tipo celular que el SFN ejerce sobre la mitocondria y la apoptosis. Por un lado, el SFN es responsable de la apoptosis intrínseca en múltiples líneas celulares cancerosas y modelos animales de tumores implantados, en un rango bastante amplio de dosis, a través de las características típicas de la apoptosis mediada por mitocondria: disrupción en el potencial de membrana mitocondrial (PMM), disminuciones en proteínas de la subfamilia Bcl-2, aumentos en Bax/Bak, liberación al citoplasma de factores proapoptóticos y activación de la caspasa-9 (ver Tabla 1). Incluso, se ha descrito la inhibición mediada por SFN de HIF1 y algunos de sus objetivos metabólicos río abajo en algunas células cancerosas [38]–[40].

Del otro lado, se encuentran los efectos citoprotectores del SFN en modelos tóxicos o isquémicos de tejidos no tumorales, en los que el compuesto inhibe la disfunción mitocondrial y la apoptosis, con una modulación evidentemente opuesta a la observada en los modelos de cáncer y, en algunos casos, con participación de Nrf2 y enzimas antioxidantes de fase II (ver Tabla 2).

### **1.2.3. El SFN induce la biogénesis mitocondrial.**

El trabajo de Piantadosi *et al.* [22] hacía bastante plausible la hipótesis de una inducción en la biogénesis mitocondrial mediada por SFN. Recientemente se informó que el SFN induce un aumento en la masa mitocondrial y en la expresión de coactivadores de la familia PGC1 en fibroblastos humanos normales y de atrofia muscular espinal [41]. Si bien, la evaluación de la biogénesis mitocondrial podría ser más rigurosa o requerir más evidencia [42], este trabajo puede significar un punto de partida para investigar el papel de la biogénesis mitocondrial en la citoprotección o en la inducción de apoptosis en células de cáncer. Los eventos de biogénesis mitocondrial inducidos por SFN no se vincularon a una señalización mediada por el factor Nrf2.

**Tabla 1.** Estudios sobre apoptosis dependiente de mitocondria inducida por SFN en líneas de cáncer

Línea celular / modelo	[SFN] $\mu$ M	Características	Referencia
Carcinoma humano de colon (HT29).	15	Incremento en la expresión de Bax, liberación citosólica de cyt c.	[43]
Células de cáncer humano de próstata (PC3, LNCaP).	20, 40	Disrupción de PMM, aumento en la relación Bak-Bax/Bcl-2, liberación de cyt c, generación de ERO, incremento en Apaf-1, disminución en proteínas de la familia IAP, activación de caspasa-9, inhibición de la actividad de complejos respiratorios.	[44]–[46]
Hepatoma humano (HepG2).	100	Aumento en la relación Bax/Bcl-2.	[47]
Células endoteliales de vena umbilical humana (modelo de angiogénesis).	40	Aumento en la relación Bax/Bcl-2, activación de caspasa-9.	[48]
Glioblastoma humano maligno (T98G, U87MG).	20, 40	Aumento en la relación Bax/Bcl-2, liberación de cyt c, AIF y Smac-DIABLO, disminución en IAPs, activación de caspasa-9.	[49]
Células de cáncer de mama humano (MDA-MB-468, MCF-7, T47D).	5, 25	Disminución en Bcl-2, liberación de cyt c, activación de caspasa-9.	[50]
Células de cáncer de ovario (MDAH 2774, SkOV-3).	10	Aumento en la relación Bak/Bcl-2, activación de caspasa-9.	[51]
Células primarias humanas de mieloma múltiple.	5-20	Disrupción en PMM, activación de caspasa-9.	[52]
Glioma maligno de cerebro humano (GBM 8401).	12.5	Disrupción en PMM, activación de caspasa-9.	[53]
Neuroblastoma humano (SH-SY5Y).	10-40	Disrupción en PMM, activación de caspasa-9.	[54]

cyt c: citocromo c; PMM: potencial de membrana mitocondrial; ERO: especies reactivas de oxígeno; IAP: inhibidores de la apoptosis; AIF: factor inductor de apoptosis.

**Tabla 2.** Estudios del efecto citoprotector del SFN que involucran protección mitocondrial

Línea celular / modelo	[SFN] / dosis	Características	Referencia
Protector contra isquemia-reperfusión en corazones Langerdorff de ratas.	500 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$	Activación de canales mitocondriales $K_{\text{ATP}}$ y preservación de Mn-SOD.	[55]
Protector en nefrotoxicidad inducida por cisplatino en células LLCPK1 y ratas.	5 $\mu\text{M}$ , 500 $\mu\text{g}/\text{Kg}$	Prevención en disrupción de PMM, preservación de capacidad respiratoria, inhibición de TPM, preservación actividad de enzimas antioxidantes.	[56], [57]
Inducción de poro TPM con terc-butil hidroperóxido en mitocondrias de cerebro de rata.	10 mg/Kg	Inhibición de apertura de poro TPM.	[58]
Protector en daño hepático inducido por cisplatino en ratas.	500 $\mu\text{g}/\text{Kg}$	Preservación de la capacidad respiratoria y enzimas antioxidantes.	[59]
Inducción de poro TPM con terc-butil hidroperóxido en mitocondrias de hígado de rata.	10 mg/Kg	Inhibición de apertura de poro TPM e incremento en GSH y enzimas antioxidantes mitocondriales.	[60]
Protección contra el daño renal inducido por obstrucción ureteral unilateral.	0.7 10 mmol/Kg	Prevención de la apoptosis renal mediada por aumentos en la relación Bax/Bcl-2, liberación de cyt c y activación de caspasas.	[61]
Protección contra disfunción mitocondrial ex vivo inducida por 4-HNE en mitocondria cortical de cerebro de ratón.	1 mg/Kg/día	Prevención de daños en el complejo I y del enlazamiento de 4-HNE a proteínas mitocondriales.	[62]
Protector contra la nefrotoxicidad inducida por gentamicina en células LLCPK1 y ratas.	1 mg/Kg/día	Prevención de la disrupción temprana del PMM y la apoptosis en cultivo, y prevención de la apoptosis renal vía activación de caspasa-9.	[63]

$K_{\text{ATP}}$ : canal mitocondrial de potasio sensible a ATP; Mn-SOD: superóxido dismutasa dependiente de manganeso (mitocondrial); PMM: potencial de membrana mitocondrial; TPM: transición de permeabilidad mitocondrial; GSH: glutatión reducido; cyt c: citocromo c; 4-HNE: 4-hidroxi-2-nonenal.

#### **1.2.4. ¿Otros activadores de Nrf2 inducen la biogénesis mitocondrial?**

Otros antioxidantes reconocidos como la curcumina, el ácido nordihidroguayarático (NDGA) y la S-alilcisteína (SAC) también inducen la translocación nuclear de Nrf2 [64]–[66]. Por la demostrada participación del factor Nrf2 en la biogénesis mitocondrial, estos antioxidantes se convertirían en firmes candidatos para su inducción farmacológica. En efecto, se ha informado que la curcumina previene la inflamación y la disfunción mitocondrial en ratones obesos con esteatosis hepática manteniendo normalizados los niveles de ADNmt y de los factores NRF1 y Tfam, que decrecen en los ratones con esteatosis hepática [67]. No se cuenta con ningún informe parecido para NDGA y SAC, aunque sí de su modulación de algunas propiedades mitocondriales [68], [69].

## **2. JUSTIFICACIÓN**

La biogénesis mitocondrial inducida por el SFN podría estar cumpliendo un papel central en los efectos aparentemente encontrados de citoprotección ante retos tóxicos en células no cancerosas y de inducción de apoptosis en células tumorales. La modulación de propiedades mitocondriales por el SFN podría incluir también efectos sobre la dinámica mitocondrial que expliquen ambos efectos y que aún no se han estudiado. Evaluar el papel de estos procesos en los efectos del SFN es de un gran interés clínico pues permitiría mejorar las terapias antineoplásicas con inductores farmacológicos de la biogénesis mitocondrial, que proporcionen sinergia en el tratamiento antineoplásico y protección contra los efectos colaterales de los agentes usados.

## **3. HIPÓTESIS**

Los efectos citoprotector y antiproliferativo del SFN se hallan mediados por la biogénesis mitocondrial que este induce a través de Nrf2. La biogénesis mitocondrial



estará ligada mecánicamente a los cambios en la dinámica mitocondrial propios para cada caso [20].

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

Evaluar si la biogénesis y la dinámica mitocondrial inducidas por SFN participan en los efectos citoprotectores y proapoptóticos mediados por el SFN.

### **4.2. Objetivos específicos**

Determinar si el SFN induce biogénesis mitocondrial y cambios en la dinámica mitocondrial en células de túbulo proximal de cerdo LLCPK1 y cáncer humano de próstata PC3.

Evaluar la participación de NRF1 en la disminución de la viabilidad en células PC3 tratadas con SFN.

Determinar si existe un efecto sinérgico en el cotratamiento SFN-cisplatino (CDDP) en células PC3, y si este depende de la biogénesis mitocondrial mediada por SFN.

Validar la participación de Nrf2 en la inducción de biogénesis mitocondrial con el antioxidante bifuncional curcumina en un modelo de nefrotoxicidad inducida por gentamicina.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Materiales**

Las células epiteliales renales de cerdo Lily Laboratory Culture Porcine Kidney (LLCPK1, cat. CL-101) y las células de cáncer de próstata humano (PC3, cat. CRL-1435) se adquirieron de American Type Culture Collection (Rockville, MD, EUA). El SFN (cat. S8044) se obtuvo de LKT Laboratories (St. Paul, MN, EUA). El medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), el medio Advanced Roswell

Park Memorial Institute (RPMI) 1640, el suero fetal bovino (SFB), la tripsina, el antibiótico (10,000 U/mL de penicilina y 10,000 µg/mL de estreptomina), así como otros reactivos y suplementos para cultivo de tejidos se obtuvieron de Gibco-Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA). El reactivo para extracción de proteínas de mamíferos (M-PER, Cat. 78501) se obtuvo de Thermo Scientific-Thermo Fisher Scientific (Eugene, OR, EUA). Las sondas MitoTracker Green FM (Cat. M7514) y yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1, Cat. T3168) y la Lipofectamine 2000 fueron adquiridos de Invitrogen-Thermo Fisher Scientific (Eugene, OR, EUA). Las membranas, reactivos y amortiguadores para Western blot fueron obtenidos de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EUA). El estuche para aislamiento de mitocondrias de células en cultivo (Cat. Ab110171) y los anticuerpos primarios contra la subunidad 1 de la NADH deshidrogenasa codificada en mitocondria (MT-ND1, ab74257) y PGC1 $\alpha$  (ab54481) se compraron a Abcam (Cambridge, MA, EUA). Los anticuerpos primarios contra Nrf2 (sc-722), NRF1 (sc-33771), Drp1 (sc-32898), fisión mitocondrial 1 (Fis1, sc-98900) y Bax (sc-493) se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, EUA). Los anticuerpos primarios contra TFAM (7495) y  $\beta$ -actina (12262) se compraron a Cell Signaling Technology (Danver, MA, EUA). El anticuerpo anti-canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC)/porina (V2139) se adquirió de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). El anticuerpo anti-HIF1 $\alpha$  (NB100-479) lo suministró Novus Biologicals (Littleton, CO, EUA). Los anticuerpos secundarios fluorescentes se obtuvieron de LI-COR (Lincoln, NE, EUA). El ARN pequeño de interferencia sustrato de Dicer (DsiRNA) contra NRF1 y controles se obtuvieron de Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, EUA). La curcumina (Cat. no. C1386), el dicloruro de cis-diaminoplatino II (CDDP, cat. P4394), el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), el glutaraldehído, el cacodilato de sodio, el tetróxido de osmio (OsO<sub>4</sub>), el paraformaldehído, la albúmina sérica bovina, el succinato de potasio, el glutamato de sodio, el malato de sodio, la adenosina difosfato (ADP), el N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfónico) (HEPES), la rotenona, el carbonilcianuro de m-clorofenilhidrazona (CCCP), la decilubiquinona, la nicotinamida adenina dinucleótido reducida (NADH), el cianuro de potasio (KCN), la

antimicina A, la sacarosa, el fenazinametosulfato (PMS), el citocromo *c* de corazón equino, el ácido ascórbico, la tetrametil *p*-fenilenediamina (TMPD), el cloruro tetrahidrato de manganeso (II), la safranina O, el arsenazo III, la ciclosporina A (CsA), el ácido 3-(*N*-morfolino)propano-sulfónico (MOPS) y el ácido etilenglicol-bis(2-aminoetileter)-*N,N,N',N'*-tetraacético (EGTA) se compraron a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). La gentamicina (Garamicina G.U. 160 mg/2 mL) se adquirió de Schering-Plough (Ciudad de México, México). El link universal biotinilado, la estreptavidina-HRP y la 3,3'-diaminobencidina (DAB) se adquirieron de Dako (Carpintería, CA, EUA). Todas las demás sustancias usadas fueron grado reactivo y también se obtuvieron comercialmente.

## **5.2. Cultivos celulares**

El cultivo de la línea celular epitelial de túbulos renales derivados de cerdos Hampshire LLCPK1, es un modelo que ha sido usado para evaluar el efecto protector del SFN en estudios de toxicidad por cisplatino y gentamicina [56], [57], [63]. Esta línea celular se cultiva en medio DMEM suplementado con SFB al 10% y penicilina-estreptomina al 1%, y condiciones permisivas para el crecimiento, que consisten de una atmósfera humificada con 95% aire – 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Las células se subcultivaron dos o tres veces por semana cuando alcanzaban aproximadamente el 80% de confluencia. Para esto, las células se despegaban de las cajas Petri incubándolas con tripsina por 5 minutos, se centrifugaban a 1,000 x g por 3 minutos y se resuspendían en DMEM suplementado con SFB al 10% y antibiótico al 1% [57]. Una fracción de células se subcultivaba para mantenerlas en crecimiento, mientras que la fracción restante se sembraba en placas o cajas Petri para experimentos.

Por otra parte, el SFN inhibe la progresión del ciclo celular e induce apoptosis mitocondrial en las células de cáncer de próstata PC3 e inhibe el crecimiento de tumores PC3 implantados ortotópicamente en ratones desnudos atímicos [44]–[46]. Esta línea se cultiva en medio Advanced RPMI 1640 suplementado con SFB al 3%, solución de aminoácidos no esenciales al 1%, piruvato al 1% y glutamina al 1%, y

en condiciones permisivas para el crecimiento [70]. Para el subcultivo se siguió un procedimiento similar que para las células LLCPK1.

### **5.3. Diseño experimental**

Para los estudios de reducción de MTT, proliferación celular mediante la incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) y viabilidad por cristal violeta, las células se sembraron en placas de 96 pozos (5000 células/pozo) y se incubaron por 24, 48, 72 y 96 horas con SFN a diferentes concentraciones. En los ensayos de más de 24 horas, el medio de cultivo era reemplazado por medio fresco cada 24 horas. Los ensayos comprendieron 3 experimentos independientes.

### **5.4. Reducción de MTT**

El ensayo MTT -un ensayo de actividad metabólica- mide la función mitocondrial y es usado frecuentemente para detectar pérdidas en la supervivencia/viabilidad celular debido a un fármaco o una toxina [71]. La sal de tetrazolio soluble MTT, se convierte a cristales insolubles de formazán por reducción [72]. Transcurridas las 24-96 horas del experimento, el medio de cultivo se retiró y las células se incubaron a 37°C en medio con MTT en una concentración de 0.125 mg/mL. Luego de una hora, el medio con MTT se retiró y los cristales de formazán depositados en la placa se disolvieron en 100 µL de solución HCl 0.04 N en isopropanol y se determinó la absorbancia a 570 nm de cada pozo en la placa. Los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad con respecto a las células no tratadas.

### **5.5. Proliferación celular**

Las determinaciones de proliferación celular cuantifican las células que están dividiéndose activamente en una muestra. Las células quiescentes no son detectadas en los ensayos de proliferación celular. El marcador de mayor prominencia para analizar es la medida de la síntesis de ADN. El método BrdU-ELISA -colorimétrico o quimioluminiscente- ofrece una alternativa viable y no radiactiva. Aquí, el precursor de ADN, BrdU, se adiciona a las células para entonces cuantificar su incorporación al ADN genómico durante la replicación [73], [74]. Al

final de cada tratamiento con SFN, para determinar la proliferación celular, se utilizó el estuche “Cell Proliferation ELISA, BrdU” (Roche, Mannheim, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cuantificación se realizó midiendo la absorbancia a 450 nm en un lector de placas [74].

### **5.6. Viabilidad (Cristal violeta)**

Se sigue el método de cristal violeta descrito por Rothmeier *et al.* [75] con algunas modificaciones menores. Al final de los tratamientos, se descartó el medio y las células se fijaron poniendo a cada pozo 100  $\mu$ L de solución paraformaldehído al 4% 30 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el paraformaldehído y se pusieron 100  $\mu$ L de solución de cristal violeta al 0.2% en metanol al 6% en cada pozo por 30 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el cristal violeta y se enjuagó cuidadosamente cada pozo con agua destilada hasta que esta no resultara coloreada por el cristal violeta remanente. Se descartó el agua y se dejó secar la placa al aire (puede dejarse toda la noche). Para extraer el cristal violeta enlazado al ADN se usaron 100  $\mu$ L/pozo de una mezcla al 0.5% de dodecilsulfato de sodio (SDS) en una solución de citrato de sodio 0.1 M en etanol al 50%, se agitó suavemente y se incubó una hora a 37°C. Finalmente, la placa se leyó a 570 nm.

### **5.7. Masa y dinámica mitocondrial**

Para determinar la masa mitocondrial relativa se sembraron 150,000 células/pozo en placas de 6 pozos. Finalizado el periodo de incubación con SFN, las células se tripsinizaron y se resuspendieron en medio con la sonda MitoTracker Green FM (50 nM) precalentado a 37°C. Se incubó a 37°C en atmósfera con 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub> por un periodo de 15 minutos. Luego, se centrifugó y se retiró el medio que contenía la sonda y se resuspendieron las células en 0.4 mL de amortiguador salino de fosfatos (PBS). Las células teñidas se analizaron en un citómetro de flujo BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) para determinar la intensidad de fluorescencia promedio por célula y así, la masa mitocondrial relativa [41]. La masa mitocondrial relativa fue expresada como intensidad de fluorescencia relativa (IFR), y se calculó dividiendo la intensidad de fluorescencia de cada determinación

entre la obtenida para el control (células sin tratamiento) en cada experimento y tiempo de tratamiento.

Para estudiar la dinámica mitocondrial, otro grupo de células se sembraron en cajas Petri de 100 mm. Después del tratamiento las células se despegaron, se centrifugaron y se lavaron con amortiguador de cacodilatos 0.15 M pH 7.2. Después de centrifugar, las células se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilatos por 3 horas a 4°C. Luego se lavaron y se resuspendieron en amortiguador de cacodilatos con lo que quedaron listas para procesar y analizar por microscopía electrónica convencional. Las imágenes se adquirieron con un microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai BioTwin (FEI Corporate, Hillsboro, OR, USA).

### **5.8. Caracterización de la apoptosis en células en cultivo**

El PMM puede determinarse mediante el uso del compuesto fluorescente lipofílico catiónico JC-1, el cual se retiene de manera selectiva en la membrana mitocondrial y en un grado dependiente del potencial. A potenciales de membrana altos JC-1 forma agregados que emiten una fluorescencia roja-naranja brillante a 590 nm de longitud de onda. Después de los tratamientos las células se despegan y se incuban en medio de cultivo con JC-1 2  $\mu$ M, 15 minutos a 37°C en la oscuridad. Luego las células se centrifugan, se resuspenden en PBS y se analizan por citometría de flujo [57], [76].

También se determinó la acumulación de Bax en el lisado total de células PC3 tratadas con SFN por 48 h y controles. La determinación se hizo mediante Western blot como se describe más adelante (sección 5.9).

### **5.9. Expresión y localización celular de factores, co-activadores y marcadores vinculados a la biogénesis y la dinámica mitocondrial**

El nivel de proteína para los factores y otros marcadores se obtuvieron de los lisados celulares y las fracciones citosólica y mitocondrial, al final de los tratamientos con SFN. Células y mitocondrias se lisaron con M-PER y los contenidos de proteína se

determinaron por un protocolo basado en el método de Bradford [77]. La expresión relativa para cada proteína de interés se obtuvo mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% y transferencia a membranas de nitrocelulosa para Western blot. Después de bloquear con amortiguador de bloqueo Odyssey® por una hora, las membranas se incubaron toda la noche con anticuerpos primarios contra NRF1, MT-ND1, Tfam (lisados totales), Drp1 o Fis1 (fracciones citoplasmática y mitocondrial) en amortiguador de bloqueo. Se usaron anticuerpos secundarios fluorescentes y las membranas se revelaron en el sistema de obtención de imágenes por infrarrojo Odyssey® CLx (LI-COR®, Lincoln, NE, EUA). Como controles de carga se usaron anticuerpos contra  $\beta$ -actina y VDAC. Los resultados se expresaron como nivel de proteína relativo al control; este se calculó obteniendo la relación entre los píxeles de la proteína de interés y los píxeles del control de carga, que luego se normalizó frente a la misma relación calculada para el control (células no tratadas), al tiempo de tratamiento correspondiente dentro de cada experimento.

La expresión y localización celular de los factores Nrf2 y HIF1  $\alpha$ , y el coactivador PGC-1 $\alpha$  se determinó mediante técnica inmunocitoquímica. Después de los tratamientos con SFN, las células se despegaron, se lavaron con PBS, se sembraron sobre portaobjetos y se fijaron con paraformaldehído al 4% por 20 minutos a 4°C. Después, se hizo recuperación antigénica con citrato de sodio 0.01 M pH 6.0 a 90°C durante 20 min, seguido de tres lavados con PBS pH 7.4 y dos lavados con una mezcla de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en metanol para eliminar la peroxidasa endógena. Después de lavarse con agua destilada y con PBS, las células se bloquearon con suero normal de cerdo al 2% en PBS durante 1 hora en cámara húmeda. Luego, las células se incubaron toda la noche con anticuerpo primario dirigido contra Nrf2, HIF1 $\alpha$  o PGC1 $\alpha$ . Se incubaron células en portaobjetos adicionales con anticuerpos anti-IgG del mismo isotipo de los anticuerpos primarios, como controles negativos. Al siguiente día, los portaobjetos se sometieron a cinco lavados de 8 minutos con PBS y luego se incubaron con link universal biotinilado por 30 min y estreptavidina conjugada a HRP por 30 min más. Después de tres lavados más con PBS, la inmunoprevalencia de cada marcador se reveló con DAB.

Las laminillas se contratiñeron, se deshidrataron y se montaron para su análisis en un microscopio Olympus BX40 (Olympus, Center Valley, PA, EUA).

#### **5.10. Abatimiento de la expresión de NRF1**

Una vez establecida la eventual inducción de la biogénesis mitocondrial por el SFN, se determinó si este proceso tiene alguna implicación en la muerte celular inducida por SFN en células PC3. Previo al tratamiento con SFN, las células se transfectaron con un DsiRNA (de mayor eficiencia que los siRNA convencionales [78]), dirigidos contra el ARNm codificante de NRF1, abatiendo su expresión y observando su efecto en la viabilidad celular.

#### **5.11. Cotratamiento SFN-CDDP en células tumorales**

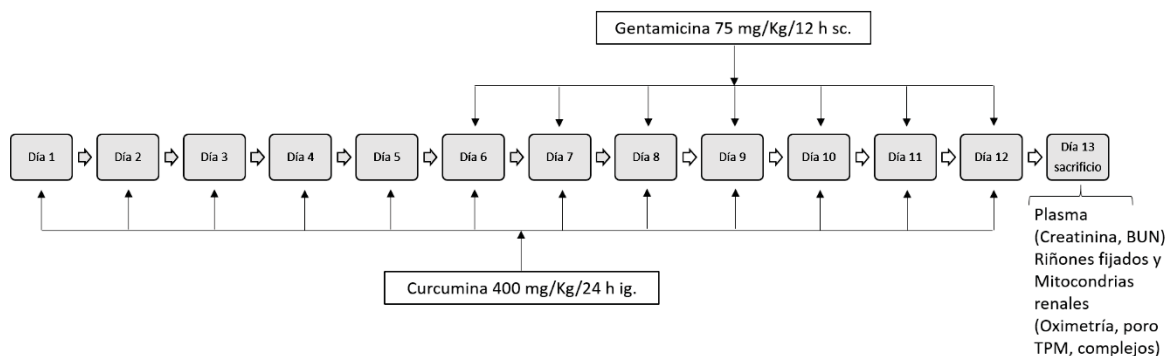
La línea celular PC3 es relativamente resistente al CDDP. En estudios previos, tratamientos por 24 h con CDDP 30  $\mu$ M no produjeron un aumento significativo en el número de células apoptóticas con respecto al control [70]. En este estudio, se establecieron relaciones dosis respuesta en tratamientos con CDDP 1-20  $\mu$ M basados en reducción de MTT como se describió anteriormente (sección 5.4). Con base en estos resultados, se realizaron ensayos con y sin la adición de SFN incluso en concentraciones subtóxicas. La quimiosensibilización de las células PC3 se estableció mediante medidas de viabilidad por cristal violeta.

#### **5.12. Validación de la participación de Nrf2 en la inducción farmacológica de la biogénesis mitocondrial**

Como una manera de establecer que la mediación del mecanismo de biogénesis mitocondrial en la citoprotección se da en moléculas inductoras de la translocación nuclear de Nrf2, se usó, además del SFN, el antioxidante curcumina (un activador de Nrf2) [79]. Se trataron ratas Wistar macho de 200-220 g con gentamicina (75 mg/kg/12 h) vía subcutánea durante 7 días para inducir daño renal y disfunción mitocondrial en corteza renal. Cinco días previos al inicio de la exposición a gentamicina y durante los 7 días de exposición, las ratas se trataron con curcumina (400 mg/kg/día) vía intragástrica. Concluidos los 12 días totales del tratamiento, las



ratas se sacrificaron y se obtuvieron los riñones. Algunos riñones se usaron para aislar mitocondrias de la corteza y evaluar la función mitocondrial. Otros riñones se perfundieron con PBS pH 7.4 y paraformaldehido al 4% en PBS para posterior análisis por microscopía electrónica (Figura 6).



**Figura 6.** Esquema de tratamiento para la inducción de daño mitocondrial renal por gentamicina y uso de la curcumina como nefroprotector en ratas Wistar. BUN: nitrógeno ureico en sangre, TPM: transición de la permeabilidad mitocondrial.

El aislamiento de mitocondrias y los estudios en mitocondria aislada se realizaron de acuerdo a la descripción dada por García-Niño *et al.* [80]. La corteza renal se lavó en amortiguador de aislamiento antes de homogenizarse. Las mitocondrias se obtuvieron por centrifugación diferencial y se midió el contenido de proteína en cada preparación mediante la técnica Biuret [81]. Se midió el consumo de oxígeno usando un electrodo de oxígeno tipo Clark (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH, EUA), en el estado 4, en presencia de succinato más rotenona o glutamato de sodio más malato de sodio, y en el estado 3, adicionando ADP en las condiciones anteriores. El índice de control respiratorio (CR) se calculó como la relación de las tasas de respiración entre el estado 3 y el estado 4. También se obtuvo la respiración desacoplada cuando se adicionó CCCP. La eficiencia de fosforilación (relación ADP/O) se calculó considerando la cantidad adicionada de ADP y el

oxígeno consumido durante el estado 3. Por otra parte, se evaluó la susceptibilidad de la mitocondria a la sobrecarga de calcio relacionada con el poro TPM inducible por  $\text{Ca}^{2+}$ . Esto se hizo evaluando la disipación del PMM en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  100  $\mu\text{M}$  mediante la medición de los cambios en la absorbancia de safranina O a 525-575 nm, y determinando la capacidad de retención de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante los cambios en la absorbancia del arsenazo III a 675-685 nm después de la adición de  $\text{Ca}^{2+}$ ; estos ensayos se realizaron en presencia o ausencia de ciclosporina A (CsA) como inhibidor de la formación del poro TPM.

La actividad de los complejos respiratorios I, II, III y IV y de la enzima mitocondrial aconitasa se determinó como lo describieron Molina-Jijón *et al.* [82]. La actividad del complejo I se determinó midiendo la disminución en la absorbancia a 340 nm debido a la oxidación de NADH a  $\text{NAD}^+$  en 1.7 mL de una mezcla de reacción que contenía decilubiquinona 60  $\mu\text{M}$ , 0.1  $\mu\text{g}$  de antimicina A, KCN 1 mM, NADH 100  $\mu\text{M}$  y 0.5 mg de proteína mitocondrial. La actividad del complejo II se determinó polarográficamente registrando el consumo de oxígeno; se usó metosulfato como aceptor artificial de electrones y succinato como donador en una reacción que se lleva a cabo en 1.7 mL de medio suplementado además con rotenona 2  $\mu\text{M}$ , 0.1  $\mu\text{g}$  de antimicina A, KCN 1 mM, CCCP 1  $\mu\text{M}$  y 0.5 mg de proteína mitocondrial. Para el complejo III se usó citocromo *c* como aceptor de electrones y decilubiquinol como donador. Se midió el incremento en la absorbancia a 550 nm resultante de la reducción del citocromo *c* en 2 mL de un medio de reacción que contenía  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  25 mM, EDTA 1 mM, KCN 1 mM, citocromo *c* 20  $\mu\text{M}$ , rotenona 2  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{g}$  de proteína mitocondrial. La reacción se inició con decilubiquinol 25  $\mu\text{M}$ . El complejo respiratorio IV también se determinó polarográficamente. Se usó TMPD como un mediador artificial de electrones, que los transfiere del ascorbato al citocromo *c* unido a la membrana. Se agregaron 50  $\mu\text{g}$  de proteína mitocondrial a 1.7 mL de medio de reacción que contenía ácido ascórbico 5 mM, rotenona 2  $\mu\text{M}$ , CCCP 1  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{g}$  de antimicina A, citocromo *c* 25  $\mu\text{M}$  y TMPD 2.5 mM. Por último, la determinación de la actividad de la aconitasa se basó en la medición de la formación de cis-aconitato, un producto intermediario entre L-citrato e isocitrato, a 240 nm. La reacción se llevó a cabo en un medio que contenía  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  25 mM + Tween al

0.05%, citrato de sodio 1 mM y  $\text{MnCl}_2$  0.6 mM. La reacción se inició con la adición de 50  $\mu\text{g}$  de proteína mitocondrial.

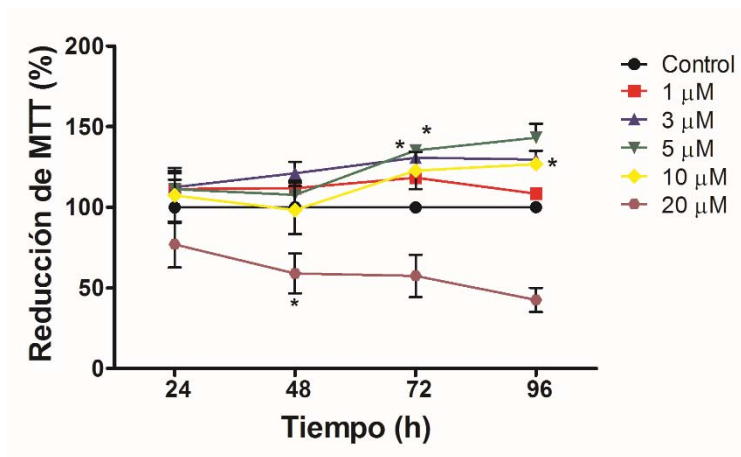
### **5.13. Análisis estadístico**

Todos los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  error estándar de la media (EEM) de las observaciones. Los valores se procesan mediante pruebas  $t$  pareadas o análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido por pruebas de comparaciones múltiples según Dunnett o Bonferroni, de acuerdo al tipo de ensayo practicado. Se consideran diferencias significativas los valores  $p \leq 0.05$ .

## **6. RESULTADOS**

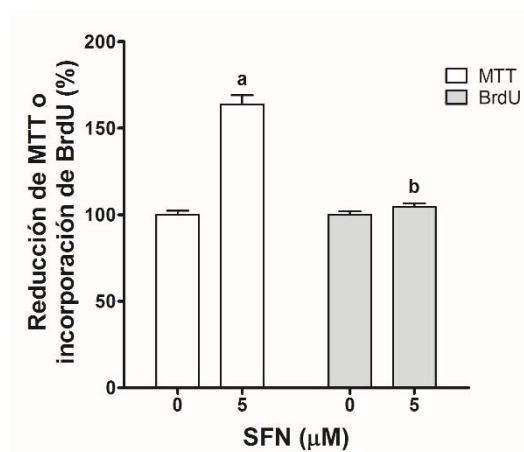
### **6.1. El SFN indujo activación mitocondrial en células LLCPK1**

El ensayo MTT se usa comúnmente en la determinación de la viabilidad celular en pruebas de citotoxicidad. Se basa en la reducción del MTT a formazán, reacción catalizada principalmente por deshidrogenasas de la mitocondria. La cantidad de formazán formado depende del número de células viables presentes, pero también del nivel de actividad metabólica mitocondrial. Si se usa junto a un método basado en la medición del nivel de síntesis de ADN o en la tinción de núcleos, es posible distinguir entre activación mitocondrial y proliferación celular [83]. Previamente, se demostró que el SFN incrementa la reducción de MTT en células LLCPK1 incubadas a la concentración de 5.0  $\mu\text{M}$  durante 96 h [63]. En la Figura 7 se presenta un curso temporal a las 24, 48, 72 y 96 h y se incluyen otras concentraciones. Se obtuvieron aumentos del 30% y 35% con respecto a las células control (100%,  $p < 0.05$ ) desde las 72 horas a las concentraciones de 3 y 5  $\mu\text{M}$ , respectivamente. A las 96 h, el aumento en reducción de MTT fue del 43% con respecto al control a la concentración de 5  $\mu\text{M}$ . Obsérvese, que el tratamiento con SFN 20  $\mu\text{M}$  indujo una importante caída en la reducción de MTT, significativa desde las 48 h.



**Figura 7.** Efecto del SFN a diferentes concentraciones sobre la reducción de MTT en células LLCPK1 con respecto al tiempo.  $n = 3$ . Promedios de los valores normalizados con respecto al control (100%)  $\pm$  EEM en las ordenadas. ANOVA de una vía y prueba de comparación múltiple de Dunnett.  $^*p < 0.05$  vs. control al tiempo correspondiente.

Para establecer que el aumento observado en la reducción de MTT en células LLCPK1 tratadas con SFN 5  $\mu$ M se debía más a una promoción de la actividad mitocondrial que a un incremento en la proliferación celular, se llevó a cabo un ensayo en el que se comparó la reducción de MTT y la incorporación de BrdU (como medida de proliferación celular) a las 72 h de tratamiento.

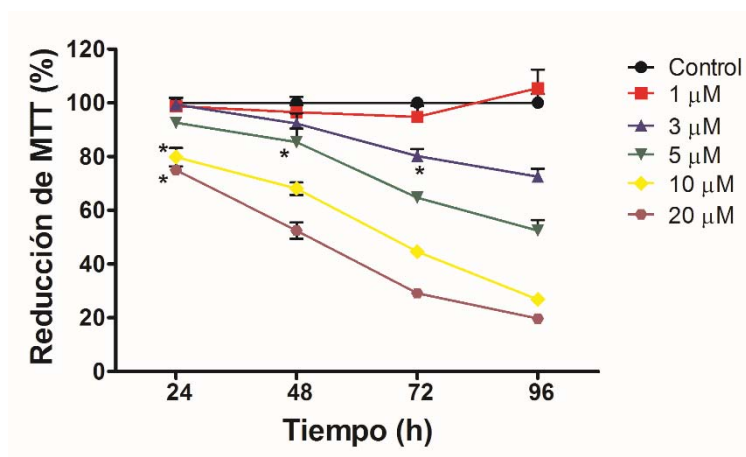


**Figura 8.** Efecto del SFN sobre la reducción de MTT y la incorporación de BrdU en células LLCPK1 a 72 h de tratamiento. Las células se incubaron con SFN (5  $\mu$ M). Dos experimentos independientes. Promedio de los valores normalizados ante el control (100%)  $\pm$  EEM en las ordenadas. ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni.  $^ap < 0.05$  vs. control respectivo (0),  $^bp < 0.05$  vs. MTT (SFN 5  $\mu$ M).

Como se observa en la Figura 8, la reducción de MTT fue 63% mayor en las células tratadas que en las no tratadas, mientras que con el método basado en la incorporación de BrdU, no se observaron cambios significativos. Este resultado indica que el aumento en la reducción de MTT que se observa en las células LLCPK1 se debe a una activación metabólica mitocondrial inducida por SFN, más que un aumento en el número de células.

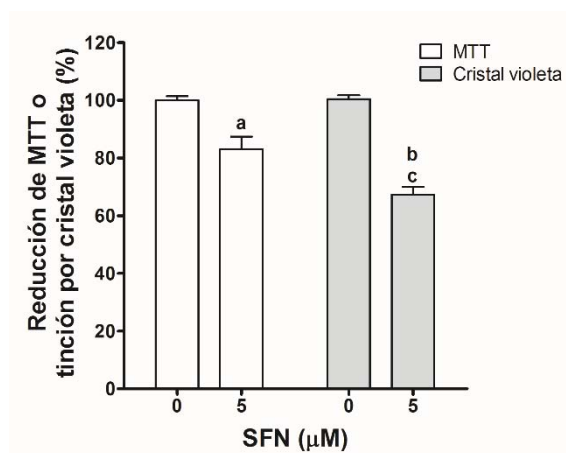
## 6.2. El SFN indujo una disminución en la viabilidad de células PC3 acompañada por activación mitocondrial

En células PC3 también se ensayó el efecto del SFN sobre la reducción de MTT (Figura 9). Sólo a las concentraciones de 10 y 20  $\mu\text{M}$  se observaron disminuciones en la reducción de MTT a las 24 h. La concentración de 5  $\mu\text{M}$ , que presentó el mayor aumento en el perfil de reducción de MTT en las células LLCPK1 (Figura 7), produjo una disminución significativa desde las primeras 48 h. A las 72 h, esta caída en la reducción de MTT llegó a un 65% de la presentada por las células sin tratamiento (100%) y a las 96 h, fue de aproximadamente la mitad.



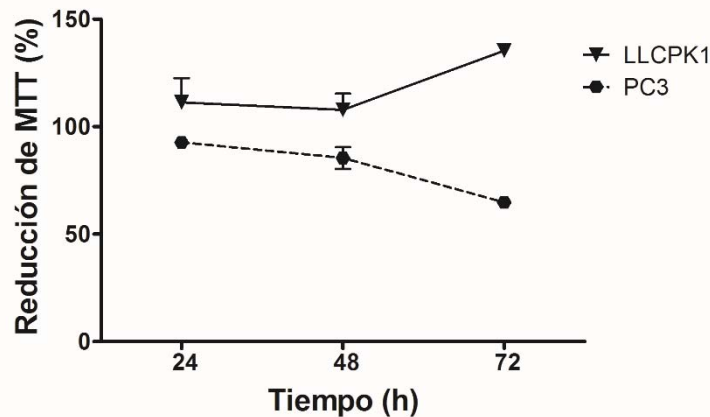
**Figura 9.** Efecto del SFN a diferentes concentraciones sobre la reducción de MTT en células PC3 con respecto al tiempo.  $n = 3$ . Promedio de los valores normalizados con respecto al control (100%)  $\pm$  EEM en las ordenadas. ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. \* $p < 0.05$  vs. control al tiempo correspondiente.

Como para las células LLCPK1, en la línea PC3 también se comparó la reducción de MTT con un método no basado en la actividad metabólica. La tinción por cristal violeta es un ensayo simple con el que se obtiene información cuantitativa sobre la densidad relativa de células adheridas en una placa multipozos. La cantidad de colorante que tiñe el ADN en una monocapa y la intensidad del color producido es proporcional al número de células [83]. En la Figura 10 se observa que a las 72 h de tratamiento con SFN, la reducción de MTT en las células PC3 tratadas con SFN fue de un 83% con respecto a las no tratadas (100%,  $p < 0.05$ ). En las células de los mismos grupos, la disminución porcentual en la tinción por cristal violeta fue de 67% en las células incubadas con SFN comparadas con el control (100%,  $p < 0.05$ ). Los resultados también fueron significativamente diferentes cuando se compararon entre las células tratadas con SFN evaluadas por los dos métodos, indicando que, si bien hay una disminución en la viabilidad celular inducida por SFN, esta se da acompañada de activación mitocondrial.



**Figura 10.** Efecto del SFN sobre la reducción de MTT y la viabilidad por cristal violeta en células PC3 a 72 h de tratamiento. Las células se incubaron con SFN (5 μM). Dos experimentos independientes. Promedio ± EEM en las ordenadas. ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs control MTT (0), <sup>b</sup> $p < 0.05$  vs. control cristal violeta (0), <sup>c</sup> $p < 0.05$  vs. MTT (SFN 5 μM).

Una comparación de los cursos temporales de reducción de MTT para células LLCPK1 y PC3 tratadas con SFN 5 μM se observa en la Figura 11, con comportamientos llamativamente opuestos sobre todo a las 72 horas de tratamiento.

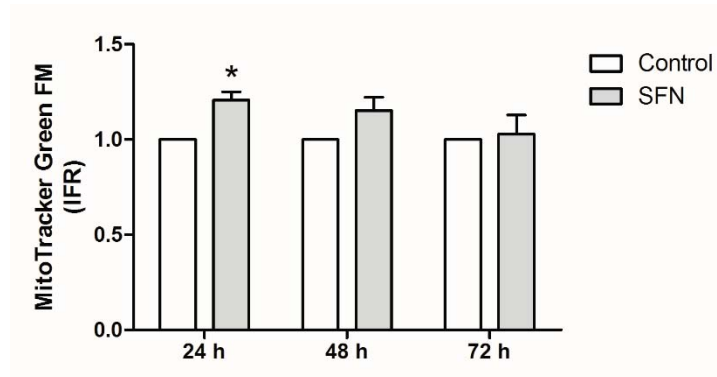


**Figura 11.** Comparación entre los efectos en la reducción de MTT del SFN 5  $\mu$ M con respecto al tiempo, en células LLCPK1 y PC3.  $n = 3$ . Promedio  $\pm$  EEM en las ordenadas.

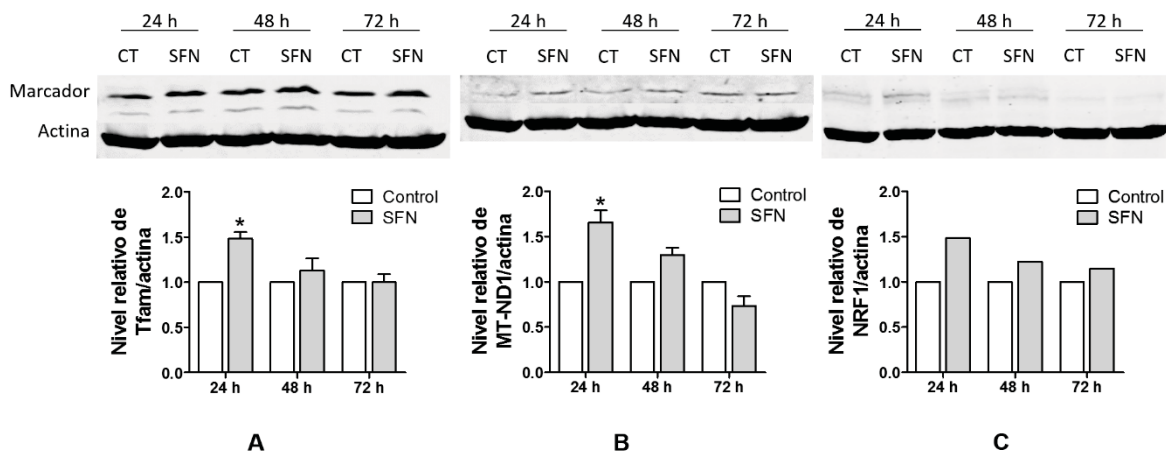
### **6.3. El SFN indujo un aumento en masa mitocondrial relativa y en proteínas marcadoras de la biogénesis mitocondrial en células LLCPK1 a las 24 h de tratamiento**

Para conocer los eventos fisiológicos celulares inducidos por el SFN que estaban llevando tanto las células LLCPK1 como las PC3 a una activación de su metabolismo mitocondrial, se exploraron características propias de la biogénesis mitocondrial. Uno de los primeros marcadores explorados fue la masa mitocondrial. En experimentos por citometría de flujo usando como marcador mitocondrial la sonda MitoTracker Green FM se observó un 20% de aumento en masa mitocondrial relativa en las células tratadas con SFN durante 24 h comparadas a las células sin tratamiento ( $p < 0.05$ ). Para las 48 y 72 h de tratamiento, se observa en la masa mitocondrial relativa una tendencia a normalizarse hasta el valor control (Figuras 12 y anexa 1). Las proteínas marcadoras de la biogénesis mitocondrial Tfam, MT-ND1 y NRF1 se evaluaron por Western blot en extractos totales de células LLCPK1 tratadas y controles. De modo similar que para la masa mitocondrial relativa (Figura 12), sólo en las primeras 24 h de tratamiento se observaron aumentos significativos en los niveles de estas proteínas, con una tendencia a los valores control a las 48 y 72 h. En las células incubadas con SFN 5  $\mu$ M por 24 h, Tfam presentó un incremento del 48% del nivel de proteína hallada en las células no tratadas ( $p < 0.05$ , Figura

13A). En MT-ND1 y NRF1, los incrementos fueron del 65% ( $p < 0.05$ ) y el 48%, respectivamente (Figura 13B y 13C). El SFN induce biogénesis mitocondrial en las células LLCPK1 sólo a las 24 h.



**Figura 12.** Masa mitocondrial relativa en células LLCPK1 tratadas con SFN y sin tratamiento, con respecto al tiempo. Las células se trataron con SFN (5  $\mu$ M). Al final del tratamiento las células se incubaron con la sonda MitoTracker Green FM y se determinó la intensidad de fluorescencia relativa (IFR) por citometría de flujo. Los datos son promedios de los valores normalizados al valor control de cada experimento  $\pm$  EEM; prueba t pareada con respecto al valor control a cada tiempo (1); \* $p < 0.05$  vs. Control;  $n = 6$ .

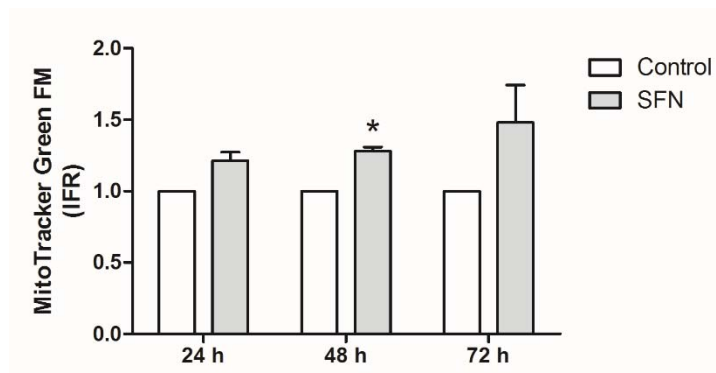


**Figura 13.** Marcadores de biogénesis mitocondrial en células LLCPK1 tratadas con SFN y sin tratamiento, con respecto al tiempo. Western blot y densitometrías para **A**, el factor A de transcripción mitocondrial (Tfam); **B**, la subunidad 1 de la NADH deshidrogenasa codificada en mitocondria (MT-ND1) y **C**, el factor nuclear respiratorio 1 (NRF1). Las células se trataron con SFN (5  $\mu$ M). Los datos son promedios de los valores normalizados al valor control de cada experimento y tiempo  $\pm$  EEM; prueba t pareada con respecto a los valores control de cada tiempo (1); \* $p < 0.05$  vs. Control;  $n = 3$  ( $n = 1$ , para NRF1).



#### 6.4.El SFN indujo aumento en masa mitocondrial relativa y proteínas marcadoras de biogénesis mitocondrial en células PC3 desde las 48 h de tratamiento

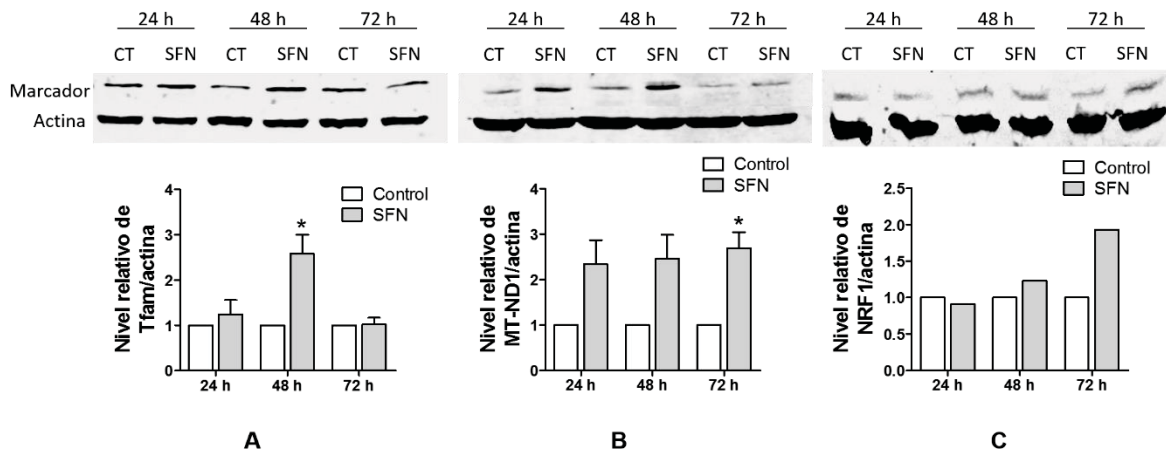
El tratamiento con SFN 5  $\mu$ M en células PC3 tratadas por 24, 48 y 72 h indujo un aumento significativo en la masa mitocondrial relativa a las 48 h, cuando fue un 28% mayor en las células tratadas que en las no tratadas ( $p < 0.05$ , Figuras 14 y anexa 2). Si bien, se observa una pendiente positiva en el curso temporal de masa mitocondrial relativa en las células tratadas, a las 72 h la alta dispersión en los valores impidió que se alcanzara significancia estadística. No obstante, todos los datos puntuales en este grupo experimental resultaron por encima de los valores control.



**Figura 14.** Masa mitocondrial relativa en células PC3 tratadas con SFN y sin tratamiento, con respecto al tiempo. Las células se trataron con SFN (5  $\mu$ M). Al final del tratamiento las células se incubaron con la sonda MitoTracker Green FM y se determinó la intensidad de fluorescencia relativa (IFR) por citometría de flujo. Los datos son promedios de los valores normalizados al valor control de cada experimento  $\pm$  EEM; prueba t pareada con respecto a los valores control a cada tiempo (1); \* $p < 0.05$  vs. Control;  $n = 3$ .

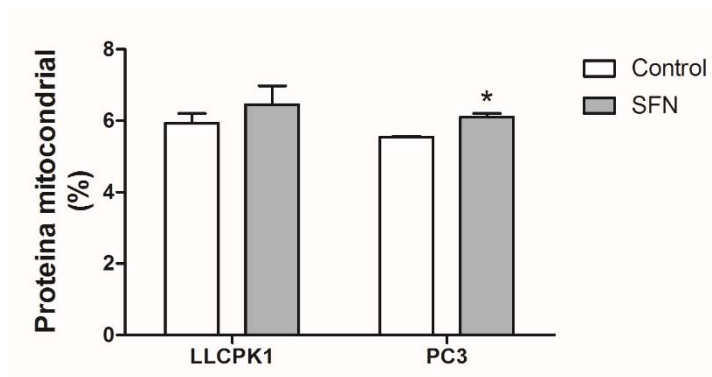
Como se observó en las células LLCPK1, el tratamiento con SFN indujo un aumento en los niveles de las proteínas Tfam, MT-ND1 y NRF1 en las células PC3, pero las tendencias no fueron tan regulares como para las células LLCPK1 (Figura 13). Por el tratamiento con SFN a las 48 h, el nivel de Tfam se incrementó 2.5 veces en relación al nivel en células sin tratar ( $p < 0.05$ , Figura 15A). Sin embargo, este nivel cayó a valores similares al control a las 72 h. A diferencia, los niveles promedio de

MT-ND1 fueron entre 2 y 3 veces el nivel de las células control a todos los tiempos de estudio, aunque la diferencia sólo es significativa a las 72 h debido a la alta dispersión ( $p < 0.05$ , los valores crudos siempre fueron mayores que los de los respectivos controles, Figura 15B). Por su parte, el nivel de NRF1 en células tratadas fue el doble que en células no tratadas a las 72 h (Figura 15C). También es difícil establecer una similitud entre estas tendencias y las observadas en masa mitocondrial relativa (Figura 14).



**Figura 15.** Marcadores de biogénesis mitocondrial en células PC3 tratadas con SFN y sin tratamiento, con respecto al tiempo. Western blot y densitometrías para **A**, el factor A de transcripción mitocondrial (Tfam); **B**, la subunidad 1 de la NADH deshidrogenasa codificada en mitocondria (MT-ND1) y **C**, el factor nuclear respiratorio 1 (NRF1). Las células se trataron con SFN (5  $\mu$ M). Los datos son promedios de los valores normalizados al valor control de cada experimento y tiempo  $\pm$  EEM; prueba t pareada con respecto a los valores control de cada tiempo (1); \* $p < 0.05$  vs. Control;  $n = 3$  ( $n = 1$ , para NRF1).

La cuantificación de proteína durante la obtención de los lisados totales y mitocondriales para estudios por Western blot se aprovecharon para calcular el porcentaje de proteína mitocondrial en cada tipo celular y tratamiento a las 48 h (Figura 16). Los resultados correlacionaron con los obtenidos con MitoTracker Green FM a las 48 h: mientras en las células LLCPK1 se observaron contenidos similares de proteína, en las células PC3 se observó un aumento significativo del 10% en las células tratadas con respecto al control ( $p < 0.05$ ).

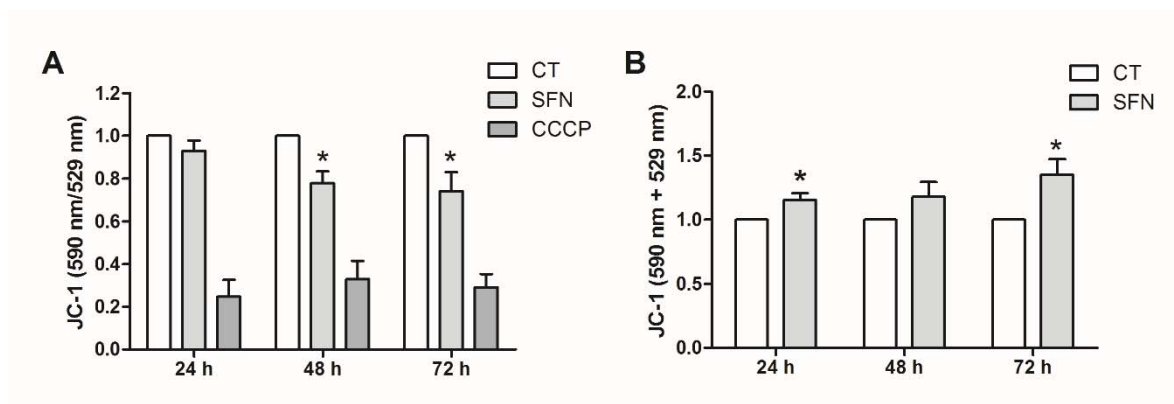


**Figura 16.** Porcentajes de proteína mitocondrial con respecto a la proteína celular total en células LLCPK1 y PC3 tratadas con SFN (5  $\mu$ M) por 48 h. La proteína fue determinada mediante un protocolo tipo Bradford. Los datos son promedios  $\pm$  EEM; prueba t pareada con respecto a los valores control; \* $p < 0.05$  vs. Control;  $n = 3$ .

### 6.5. El SFN induce la disrupción del PMM en células PC3

El compuesto JC-1 es una sonda de emisión de fluorescencia policromática: emite fluorescencia verde en un estado monomérico y fluorescencia roja en un estado agregado. Esta sonda se agrega en la matriz mitocondrial cuando el PMM es mayor que  $-140$  mV. Se obtiene la relación entre la fluorescencia roja (590 nm) y la fluorescencia verde (529 nm) para normalizar las señales y evitar influencias del tamaño, forma y densidad mitocondrial [84]. Se observó una tendencia a la despolarización de la membrana mitocondrial en células PC3 tratadas con SFN con respecto a las células sin tratar, siendo significativa desde las 48 h de tratamiento. La relación 590 nm/529 nm fue un 23% y un 26% menor en las células tratadas que en los respectivos controles, a las 48 y 72 h, respectivamente (Figuras 17A y anexa 3). Dado que las intensidades de fluorescencia a 590 y 529 nm pueden generarse por la totalidad de las mitocondrias en la célula, con distintos niveles de polarización de su membrana interna, se ensayó usar la sumatoria de las fluorescencias promedio (590 nm + 529 nm) como una aproximación a la masa mitocondrial relativa. Si bien, no hay soporte bibliográfico de este cálculo, podría constituirse en un método alternativo de determinación de masa mitocondrial, previa validación analítica. La Figura 17B deja ver una tendencia creciente con el tiempo, similar a la observada con MitoTracker Green FM (Figura 14), pero sólo con significancia a las

24 y 72 horas ( $p < 0.05$ ). Se concluye que el SFN induce disipación del PMM paralelo al aumento en la masa mitocondrial.

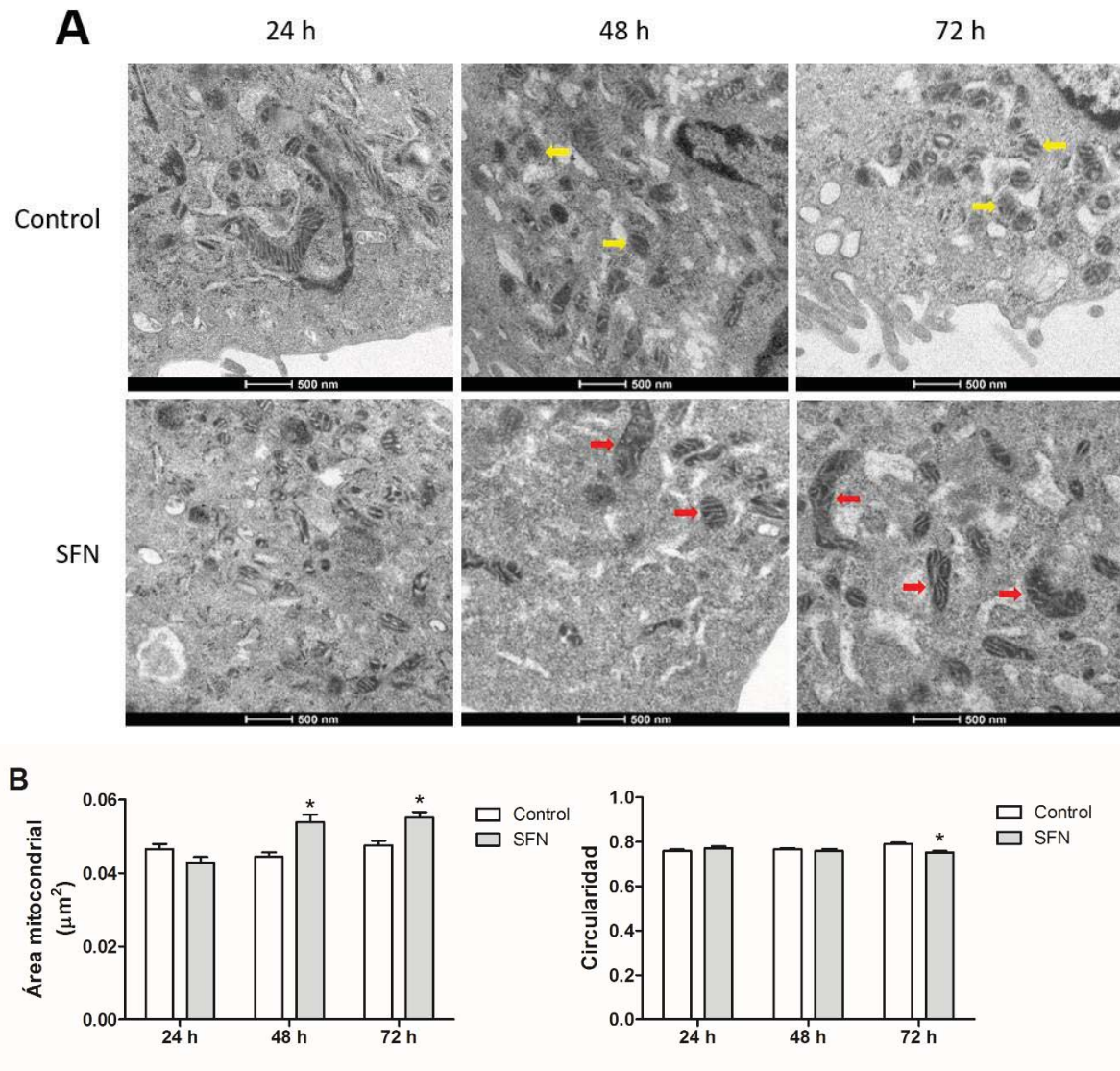


**Figura 17.** Efecto del SFN sobre el potencial de membrana mitocondrial y la masa mitocondrial relativa en células PC3 a diferentes tiempos, usando la sonda JC-1. Después de los tratamientos con SFN (5  $\mu$ M), las células se incubaron en JC-1 y se analizaron por citometría de flujo. **A**, cuantificación considerando la relación 590 nm/529 nm que indica el grado de polarización de la membrana mitocondrial interna. **B**, cuantificación considerando la sumatoria de fluorescencias a 590 y 529 nm que indicaría masa mitocondrial relativa (método no validado). Los datos son promedios  $\pm$  EEM de los valores normalizados al valor control de cada experimento; Prueba t pareada con respecto a los valores control a cada tiempo (1); \* $p < 0.05$  vs. Control; n = 5. CCCP, carbonilcianuro de m-clorofenilhidrazona.

## 6.6. El SFN indujo fusión mitocondrial en células LLCPK1

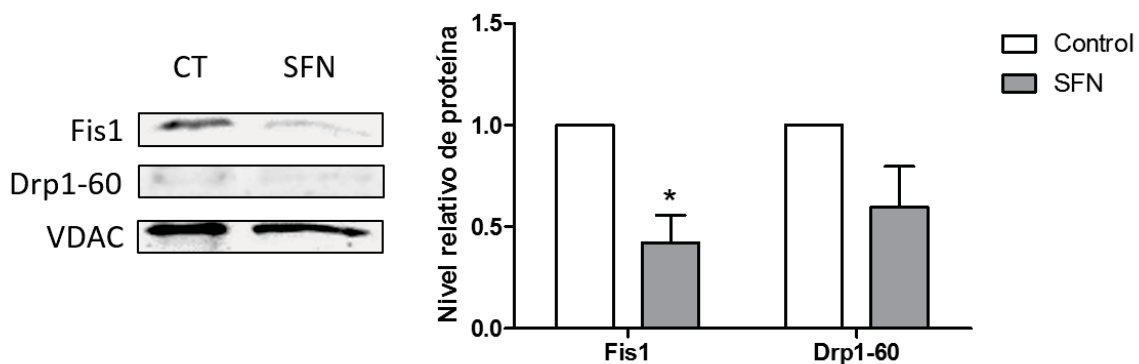
En la Figura 18A se observan imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión para células LLCPK1, controles y tratadas con SFN 5  $\mu$ M por 24, 48 y 72 h. Desde las 48 h son evidentes mitocondrias de mayor tamaño y elongación (flechas rojas) en las células tratadas con SFN, cuando se comparan con las mitocondrias más pequeñas y circulares de las células no tratadas (flechas amarillas). A cada mitocondria en cada una de las fotografías obtenidas, se le calculó su área y circularidad mediante el software para el análisis de imágenes ImageJ 1.50g (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). En efecto, los resultados revelaron un aumento del 23% en el área por mitocondria de las células tratadas por 48 h con respecto al control, y del 17% a las 72 h ( $p < 0.05$ , Figura 18B). La circularidad disminuyó significativamente en las células tratadas, de 0.79 a 0.75 (la circularidad es un parámetro adimensional que tiene valores entre 0 y 1, donde

1 indica una forma circular perfecta), sólo a las 72 h (Figura 18B). Estos resultados sugieren que el SFN está induciendo fusión mitocondrial en las células LLCPK1.



**Figura 18.** Efecto del SFN sobre la morfología mitocondrial en células LLCPK1 a diferentes tiempos. Las células se trataron con SFN (5  $\mu\text{M}$ ). **A**, Imágenes representativas obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión. Las flechas amarillas indican mitocondrias más pequeñas y circulares; las flechas rojas indican mitocondrias más grandes y alargadas **B**, Cuantificación de área y circularidad por mitocondria. Los valores en B son promedios  $\pm$  EEM; 400 – 736 mitocondrias por grupo. Prueba t no pareada con corrección de Welch respecto al control a cada tiempo; \* $p < 0.05$  vs. Control.

Se exploró parte de la maquinaria que regula la dinámica mitocondrial para encontrar relaciones con la fusión mitocondrial inducida por el SFN en la línea celular LLCPK1. En las células tratadas se presentó una disminución de más de la mitad del nivel presentado en el control para la proteína Fis1 ( $p < 0.05$ ), así como una tendencia a la disminución del nivel de la isoforma corta de 60 kDa de Drp1 (Drp1-60, Figura 19). Estas últimas hacen parte de la maquinaria celular de fisión, de modo que la fusión mitocondrial observada podría ser el resultado de la inhibición en la fisión.

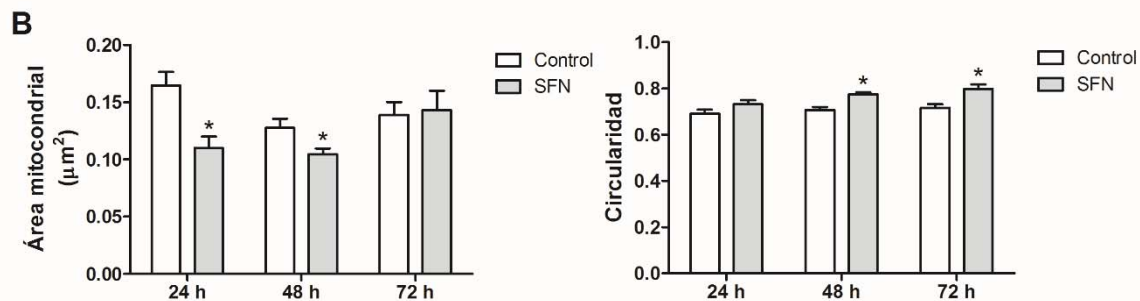
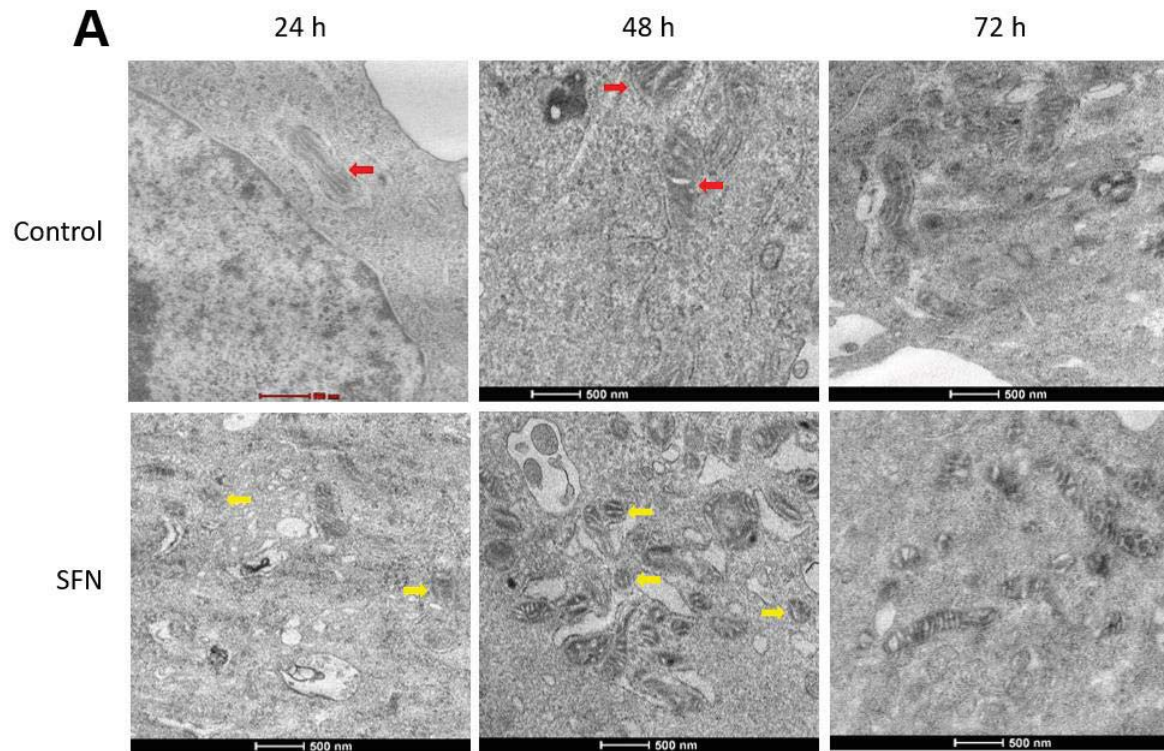


**Figura 19.** Marcadores de fisión mitocondrial en células LLCPK1 tratadas con SFN y sin tratamiento durante 48 h. Western blots y niveles mitocondriales de la proteína fisión mitocondrial 1 (Fis1) y la isoforma de 60 kDa de la proteína 1 relacionada a la dinamina (Drp1). Las células se trataron con SFN 5  $\mu$ M. Los datos son promedios de los valores normalizados al valor control de cada experimento  $\pm$  EEM; Prueba t pareada con respecto a los valores control (1); \* $p < 0.05$  vs. Control; n = 3.

### 6.7. El SFN indujo división mitocondrial en células PC3

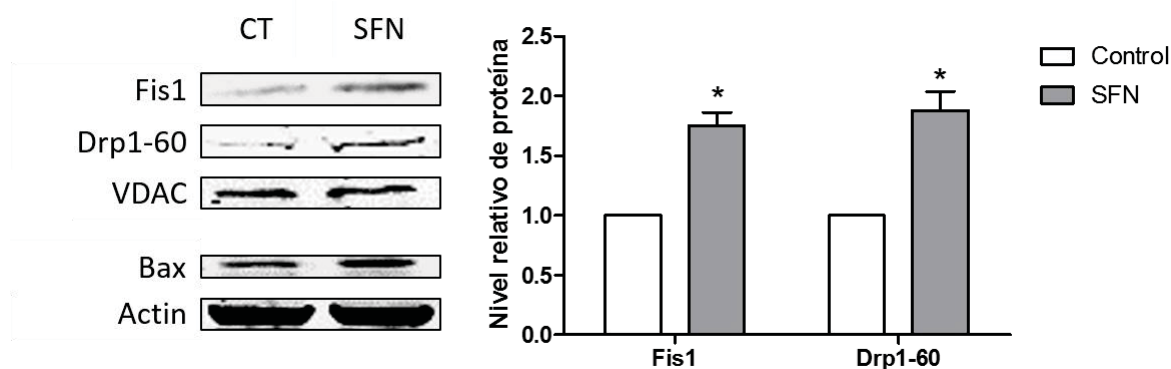
Una muestra más de la respuesta específica celular al SFN es la inducción de división mitocondrial en la línea de cáncer de próstata PC3. Desde las 24 horas, puede observarse el cambio en la morfología mitocondrial, de mitocondrias escasas, pero hiperfusionadas en las células no tratadas (flechas rojas en la Figura 20A), a unas numerosas mitocondrias más pequeñas y circulares en las células incubadas con SFN (flechas amarillas en la Figura 20A). Las mitocondrias en las células tratadas tuvieron un área promedio 32% y 23% menor que sus controles a las 24 y

48 h, respectivamente ( $p < 0.05$ ). Por otra parte, la circularidad aumentó por el tratamiento con SFN a las 48 y 72 h, en 8% y 11%, respectivamente ( $p < 0.05$ ).



**Figura 20.** Efecto del SFN sobre la morfología mitocondrial en células PC3 a diferentes tiempos. Las células se trataron con SFN (5 µM). **A**, Imágenes representativas obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión. Las flechas amarillas indican mitocondrias más pequeñas y circulares; las flechas rojas indican mitocondrias más grandes y alargadas. **B**, Cuantificación de área y circularidad por mitocondria. Los valores en B son promedios ± EEM; 48 – 330 mitocondrias por grupo. Prueba t no pareada con corrección de Welch respecto al control a cada tiempo; \* $p < 0.05$  vs. Control.

La participación de Drp1 y Fis1 se hizo evidente en la división mitocondrial inducida por el SFN en la línea celular PC3. El nivel mitocondrial de Fis1 en las células tratadas fue 75% mayor que el nivel hallado en las células control, mientras que el de la isoforma Drp1-60 fue 88% mayor ( $p < 0.05$ , Figura 21). Se sabe que Drp1 es importante para la oligomerización de Bax que permite la permeabilización de la mitocondria, la liberación de cyt c y la apoptosis por vía intrínseca [85]. En la Figura 21 también se puede observar el Western blot correspondiente a Bax. La acumulación de Bax fue 44% mayor en las células tratadas con SFN por 48 h que en las células control.



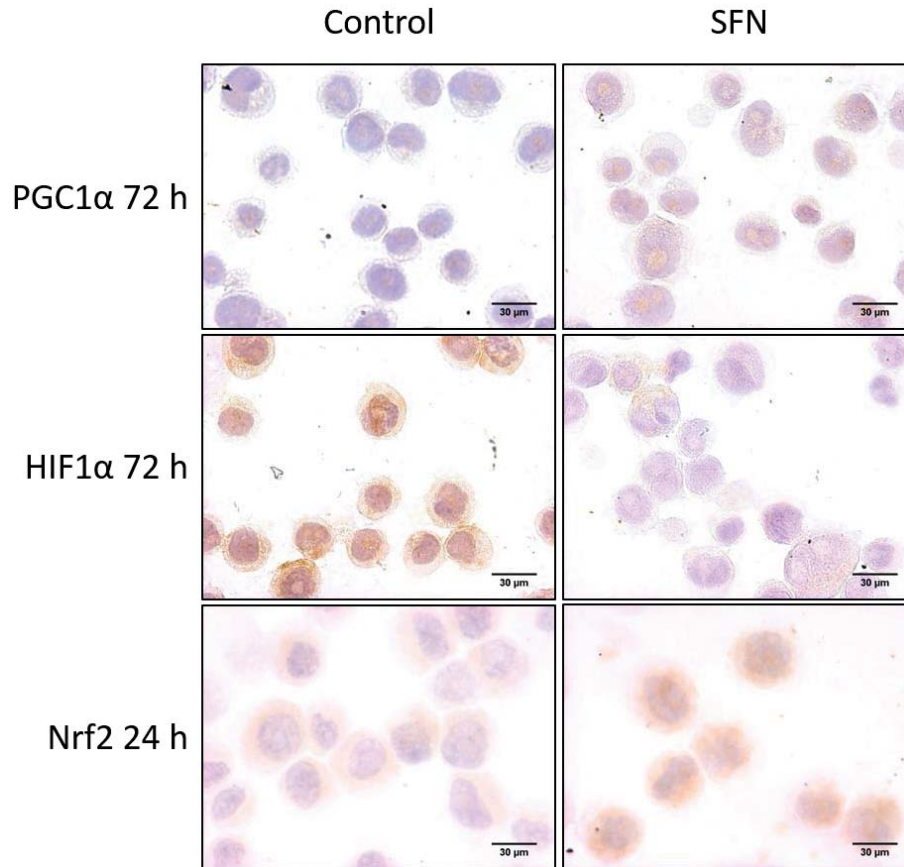
**Figura 21.** Marcadores de fisión mitocondrial en células PC3 tratadas con SFN y sin tratamiento durante 48 h. Western blots y niveles mitocondriales de la proteína fisión mitocondrial 1 (Fis1) y la isoforma de 60 kDa de la proteína 1 relacionada a la dinamina (Drp1). Además, se presenta un inmunoblot para Bax en lisados totales a 48 de tratamiento. Las células se trataron con SFN 5  $\mu$ M. Los datos son promedios de los valores normalizados al valor control de cada experimento  $\pm$  EEM; Prueba t pareada con respecto a los valores control (1); \* $p < 0.05$  vs. Control; n = 3.

### 6.8. El SFN indujo un aumento en la expresión y/o translocación nuclear de Nrf2 y PGC1 $\alpha$ e inhibición del factor HIF1 $\alpha$ en células PC3

La inmunocitoquímica de células PC3 tratadas con SFN 5  $\mu$ M permite observar una mayor expresión y localización nuclear del co-activador PGC1 $\alpha$  a las 72 h con respecto a células sin tratamiento (el color marrón en la Figura 22 indica la expresión e inmunolocalización). De manera interesante, a este mismo tiempo de exposición es notable la inhibición en la expresión y/o acumulación nuclear del factor HIF1 $\alpha$  debido al tratamiento de la línea tumoral con SFN. El papel del factor nuclear Nrf2 en estos eventos podría ser importante considerando los resultados de la



inmunocitoquímica practicada a esta misma línea. En la Figura 22 también puede verse el notable aumento en la expresión/translocación nuclear del factor en la línea tumoral PC3 a las 24 h de tratamiento.

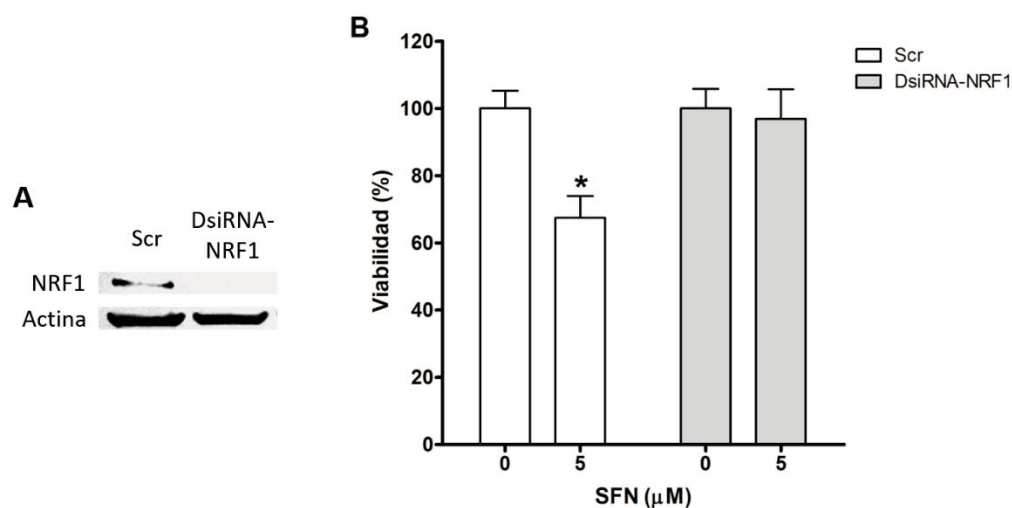


**Figura 22.** Efecto del SFN sobre la expresión y localización del co-activador-1 $\alpha$  del receptor- $\gamma$  activado por proliferadores de peroxisomas (PGC1 $\alpha$ ), el factor-1 $\alpha$  inducible por hipoxia (HIF1 $\alpha$ ) y el factor-2 relacionado al factor-2 nuclear eritroide (Nrf2) en células PC3. Análisis por inmunocitoquímica después que las células se trataron con SFN (5  $\mu$ M) durante los tiempos indicados. La inmunoprevalencia de las proteínas de interés está indicada por el color marrón en las imágenes. 3 experimentos.

### 6.9. NRF1 cumple un papel en el efecto del SFN sobre células PC3

El SFN indujo un aumento en el nivel de NRF1 en la línea celular PC3 (Figura 15) que, presumiblemente, se debe a la acumulación nuclear de Nrf2 a las 24 h (Figura 22). Entonces, el silenciamiento de NRF1 podría alterar el efecto del SFN sobre la viabilidad de las células PC3. Cuando las células se transfectaron con un ARN

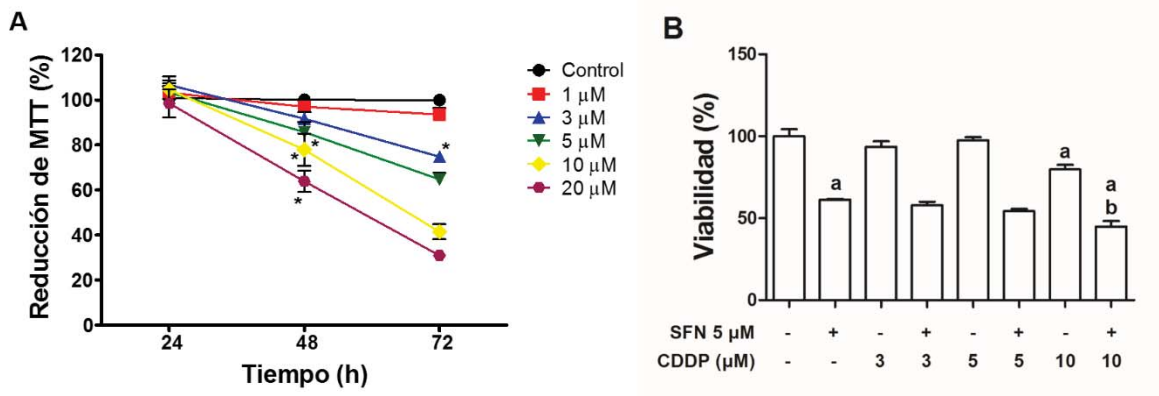
control negativo (secuencia *scrambled*), la viabilidad se redujo significativamente en las células tratadas con SFN (<60%) con respecto a las no tratadas (Figura 23B). Al abatir la expresión de NRF1, esta caída en la viabilidad celular no fue significativa. Se sugiere que NRF1 podría participar en los mecanismos de muerte que llevan a la disminución en la viabilidad.



**Figura 23.** Papel del factor nuclear respiratorio 1 (NRF1) en la disminución de la viabilidad inducida por SFN en células PC3. **A**, Silenciamiento confirmado por Western blot 72 h después de la transfección. **B**, Efecto del silenciamiento de NRF1 en la caída en la viabilidad de células PC3 tratadas con SFN 5 μM por 72 h. Dos experimentos. Promedios ± EEM en las ordenadas; ANOVA de una vía seguido de comparaciones múltiples de Bonferroni; \* $p < 0.05$  vs. Control correspondiente (0).

### 6.10. El cotratamiento SFN-CDDP tuvo un efecto aditivo en células PC3

Para explorar un posible efecto sinérgico entre el SFN y el antineoplásico de uso común CDDP, primero se construyó una curva dosis-respuesta para células PC3 tratadas con CDDP a 24, 48 y 72 horas (Figura 25A), de manera similar a como se hizo con SFN (Figura 9). Ninguna de las concentraciones usadas indujo una disminución en la reducción de MTT las primeras 24 h del tratamiento. A las 48 h, las concentraciones de 5, 10 y 20 μM causaron disminuciones en un 86%, 78% y 64%, respectivamente. Estos resultados fueron útiles para la implementación del siguiente experimento, consistente en la preincubación de células PC3 con SFN y posterior coincubación con SFN y concentraciones subtóxicas de CDDP.

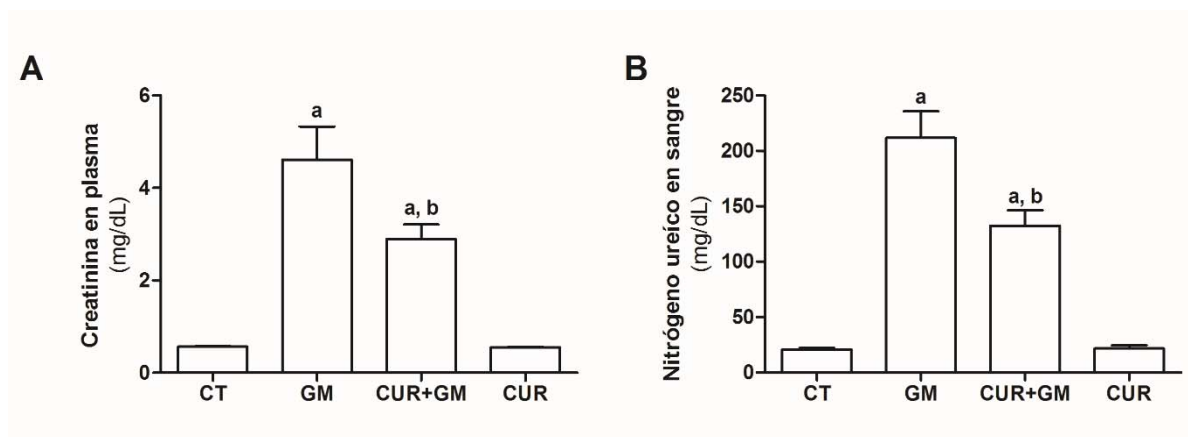


**Figura 24.** Evaluación del cotratamiento SFN-cisplatino (CDDP) en células PC3. **A**, Efecto del CDDP sobre la reducción de MTT en células PC3 a diferentes tiempos y concentraciones.  $n = 3$ . Promedio de los valores normalizados con respecto a las células sin tratamiento (100%)  $\pm$  EEM en las ordenadas. ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Dunnett.  $*P < 0.05$  vs control. **B**, Efecto de la preincubación con SFN y coincubación SFN-CDDP sobre la viabilidad de células PC3. Un experimento. Promedio de los valores normalizados con respecto a las células sin tratamiento (100%)  $\pm$  EEM en las ordenadas. ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni.  $^a p < 0.05$  vs. control,  $^b p < 0.05$  vs. SFN.

Las células PC3 se preincubaron 24 h con SFN 5  $\mu$ M y luego se coincubaron con SFN 5  $\mu$ M y CDDP 3, 5 y 10  $\mu$ M durante 24 h. Mediante detección basada en cristal violeta no parece haber un efecto sinérgico entre SFN y CDDP, pero si es apreciable uno aditivo cuando se incubaba con CDDP 10  $\mu$ M (Figura 25B). El tratamiento con SFN 5  $\mu$ M durante 48 h redujo la viabilidad en un 39%. Las concentraciones 3 y 5  $\mu$ M de CDDP no tuvieron ningún efecto sobre la viabilidad comparadas con las células no tratadas. Tampoco estas concentraciones de CDDP en el cotratamiento produjeron diferencias con respecto a las células tratadas sólo con SFN. Sólo el CDDP 10  $\mu$ M indujo una disminución del 20% en la viabilidad medida por el método de cristal violeta. Una reducción del 56% en la viabilidad en el cotratamiento SFN 5  $\mu$ M – CDDP 10  $\mu$ M permite pensar más en un efecto aditivo que en uno sinérgico. Esto es igualmente importante pues permite asegurar que el SFN no afecta la capacidad antineoplásica del CDDP.

### 6.11. La curcumina, un estabilizador de Nrf2, atenúa el daño mitocondrial renal inducido por gentamicina, al parecer, por un mecanismo asociado a la biogénesis mitocondrial

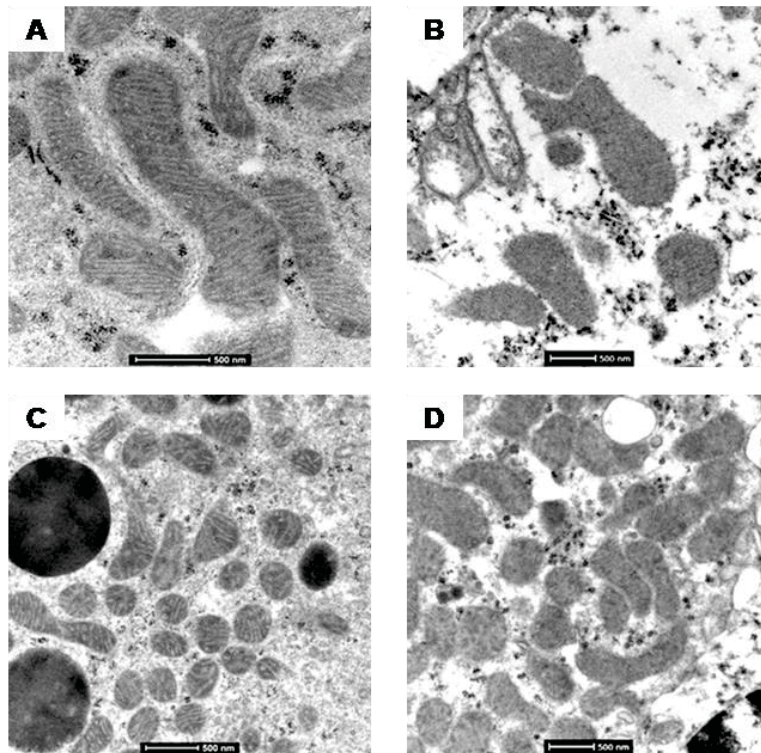
Con el objetivo de validar que el eje Nrf2-biogénesis mitocondrial cumple un papel en la citoprotección inducida por antioxidantes indirectos o bifuncionales, se evaluó el efecto del antioxidante bifuncional curcumina en la disfunción mitocondrial asociada a la nefrotoxicidad por gentamicina, buscando evidencias del papel de Nrf2 y la biogénesis mitocondrial. En principio, el tratamiento con curcumina atenuó el daño renal en ratas tratadas con gentamicina (grupo GM), a juzgar por los valores de creatinina plasmática y BUN (Figura 25). La creatinina y el BUN en las ratas del grupo GM alcanzaron valores de 8 y 10 veces los de las ratas del grupo control (CT), respectivamente. El pretratamiento y cotratamiento con curcumina atenuó este efecto; se alcanzaron valores en creatinina y BUN 38% más bajos que los propios para el grupo GM ( $p < 0.05$ ). En el grupo tratado sólo con curcumina (CUR), los valores de creatinina y BUN fueron similares a los del grupo control.



**Figura 25.** Efecto del tratamiento con curcumina sobre la función renal de ratas tratadas con gentamicina. **A**, Creatinina plasmática. **B**, Nitrógeno ureico en sangre. CT, control; GM, gentamicina; CUR, curcumina. Los datos son promedios  $\pm$  EEM,  $n=6$ . ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs. CT; <sup>b</sup> $p < 0.05$  vs. GM.

En acuerdo con la nefroprotección observada, un análisis de la ultraestructura mitocondrial por microscopía electrónica de transmisión (Figura 26) enseña que las mitocondrias de corteza renal de ratas tratadas con gentamicina (Figura 26B)

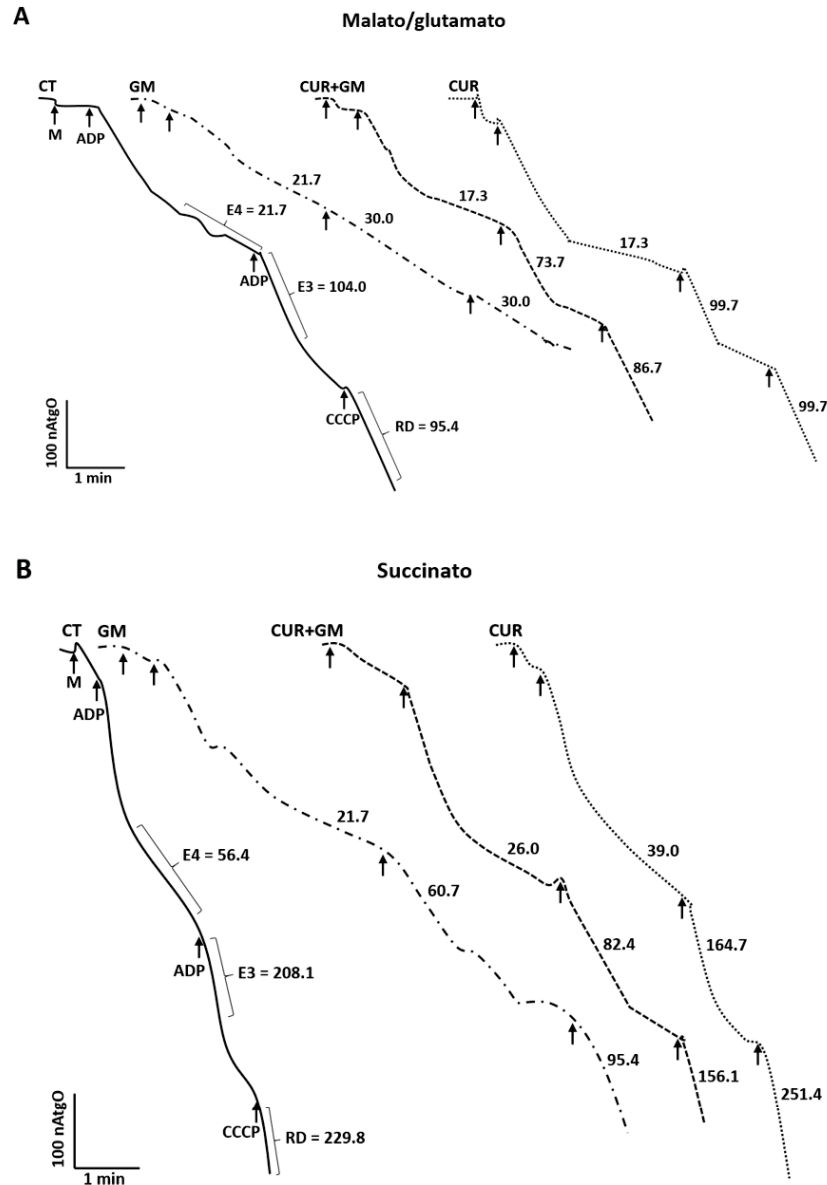
presentan una importante pérdida en la conformación normal de las crestas, cuando se comparan con el grupo CT (Figura 26A). Por el contrario, las mitocondrias en la corteza renal de ratas cotratadas con curcumina y gentamicina (grupo CUR+GM, Figura 26C) preservaron la ultraestructura de sus crestas. La ultraestructura mitocondrial en los riñones de ratas tratadas sólo con curcumina (Figura 26D) fue similar a la del grupo CT.



**Figura 26.** Imágenes representativas de la ultraestructura mitocondrial de túbulos proximales contorneados en ratas tratadas con curcumina (CUR) y gentamicina (GM). Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión. **A**, Control. **B**, GM. **C**, CUR+GM. **D**, CUR.

En la Figura 27 se presentan trazos representativos de los estudios de consumo de oxígeno en mitocondrias de corteza renal de los diferentes grupos, usando como sustrato respiratorio malato/glutamato, que alimenta el complejo respiratorio I (Figura 27A), o succinato, que alimenta el complejo II (Figura 27B). La disfunción se hizo evidente en las mitocondrias del grupo GM por las menores pendientes de sus trazos cuando se adicionan ADP (estado 3 o fosforilante) o el protonóforo desacoplador de la fosforilación oxidante, CCCP (respiración desacoplada). Sólo el

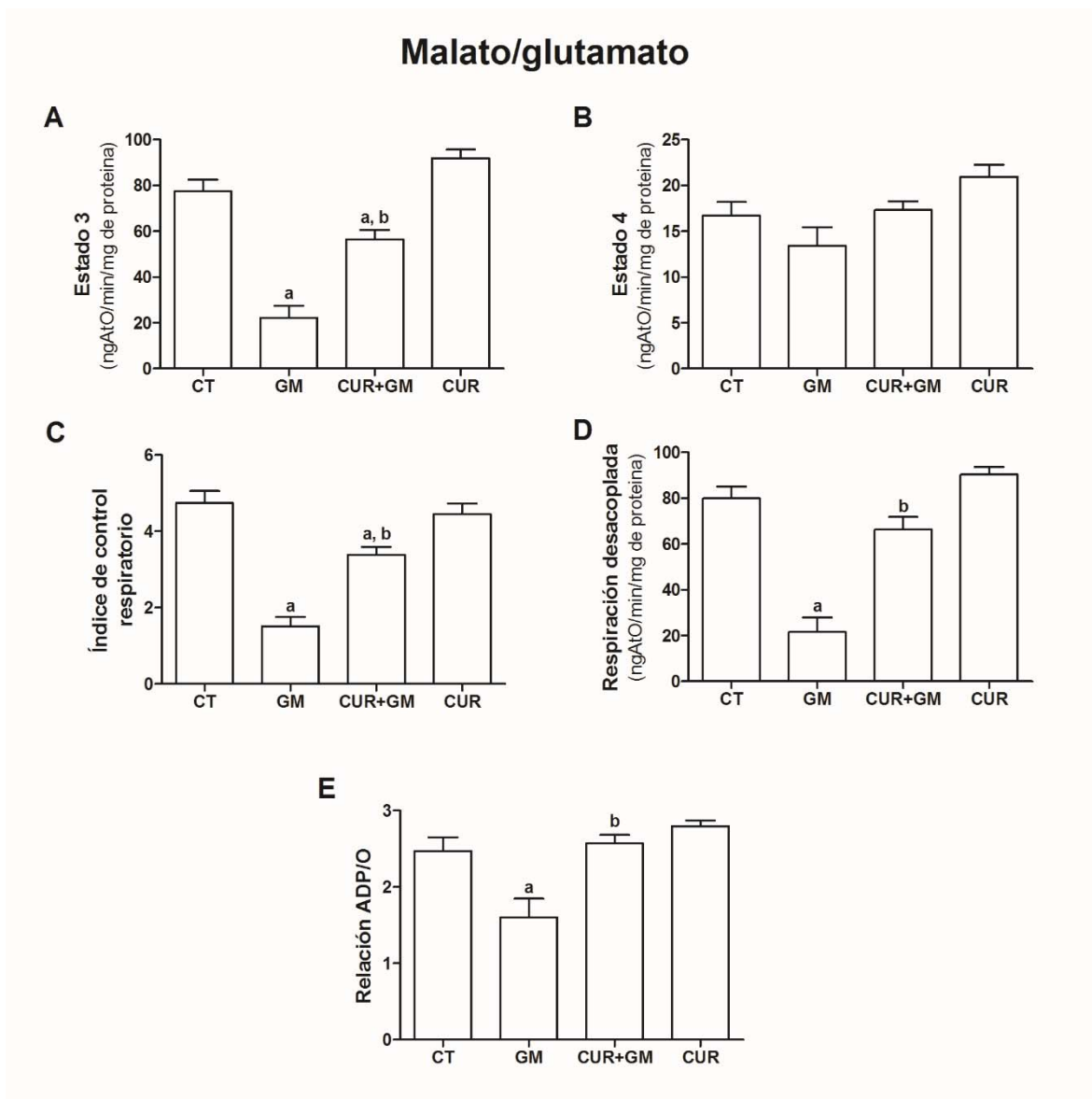
estado 4 (cuando ADP y ATP se equilibran y la respiración disminuye a niveles basales) fue similar en los grupos CT y GM con malato/glutamato. Los trazos en los grupos CUR+GM y CUR tienden a equipararse a los de las mitocondrias CT.



**Figura 27.** Efecto de la curcumina sobre los perfiles de consumo de oxígeno en mitocondrias renales de ratas expuestas a gentamicina. Trazos representativos para los diferentes grupos, usando malato/glutamato (A) o succinato (B) como sustratos respiratorios. M, mitocondria; ADP, adenosina trifosfato; CCCP, carbonilcianuro de m-clorofenilhidrazona; E3, Estado 3; E4, Estado 4; RD, respiración desacoplada; CT, control; GM, gentamicina; CUR, curcumina. Las unidades de E3, E4 y RD son ngAtO/min/mg de proteína.

En efecto, usando malato/glutamato, el estado 3 fue 72% más lento en las mitocondrias del grupo GM que en las del grupo CT ( $p < 0.05$ , Figura 28A) y tuvo una recuperación parcial en el grupo CUR+GM, siendo 2.5 veces más rápida que en el grupo GM ( $p < 0.05$ ). El estado 4 no presentó cambios significativos (Figura 28B). El índice CR (estado 3/estado 4) en las mitocondrias del grupo GM fue aproximadamente un tercio del control, pero también se recuperó parcialmente en el grupo CUR+GM a un 72% del calculado para el grupo CT ( $p < 0.05$ , Figura 28C). La respiración desacoplada tuvo un patrón similar al presentado en la evaluación del estado 3, excepto por una mejor recuperación en el grupo CUR+GM, que resultó en un valor similar al del control (Figura 28D). La eficiencia de fosforilación también resultó alterada por el tratamiento por gentamicina, a juzgar por la disminución en la relación ADP/O, que decreció de 2.5 en las mitocondrias control a 1.6 en las del grupo GM ( $p < 0.05$ , Figura 28E). El tratamiento con curcumina evitó esta alteración. En el grupo CUR, todos los parámetros descritos tuvieron un comportamiento similar al control.

Usando el succinato como sustrato respiratorio, el tratamiento con gentamicina también indujo alteraciones en la bioenergética mitocondrial, excepto en la relación ADP/O (Figura 29E). En el grupo GM, el estado 3 (Figura 29A) fue un 33% del observado en el control, y el estado 4 (Figura 29B) fue un 50%, con recuperaciones parciales del 60% y el 71%, respectivamente, en el grupo CUR+GM con respecto al CT. Aun así, el índice CR disminuyó significativamente de 3.6 en el control a 2.4 en las mitocondrias GM ( $p < 0.05$ , Figura 29C). El tratamiento con curcumina mantuvo el índice CR similar al control en el grupo CUR+GM. La respiración estimulada por CCCP en las mitocondrias del grupo GM fue aproximadamente la mitad de la observada en las mitocondrias control, pero el tratamiento con curcumina también atenuó esta alteración al mantener la respiración desacoplada en un 78% de la observada en el control ( $p < 0.05$ , Figura 29D). Como para cuando se energizó el complejo I, con succinato todos los parámetros bioenergéticos en el grupo CUR tuvieron valores similares a los del grupo CT.

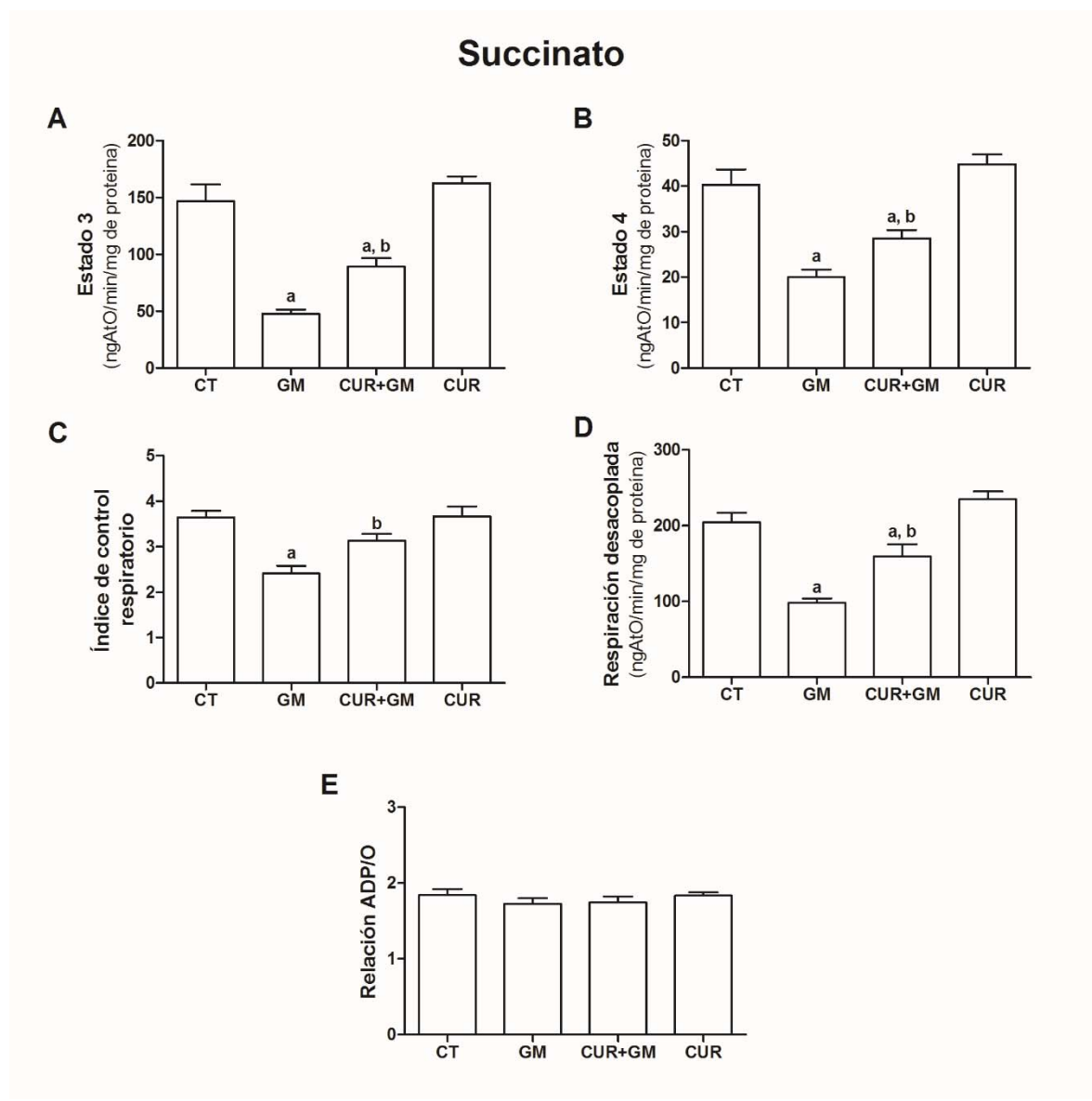


**Figura 28.** Efecto de la curcumina sobre las alteraciones en el consumo de oxígeno inducidas por gentamicina en mitocondrias renales de rata, usando malato-glutamato como sustrato. **A**, Estado 3. **B**, Estado 4. **C**, Índice de control respiratorio. **D**, Respiración desacoplada. **E**, Relación ADP/O. CT, control; GM, gentamicina; CUR, curcumina. Promedio  $\pm$  EEM en las ordenadas. ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs. CT; <sup>b</sup> $p < 0.05$  vs. GM.

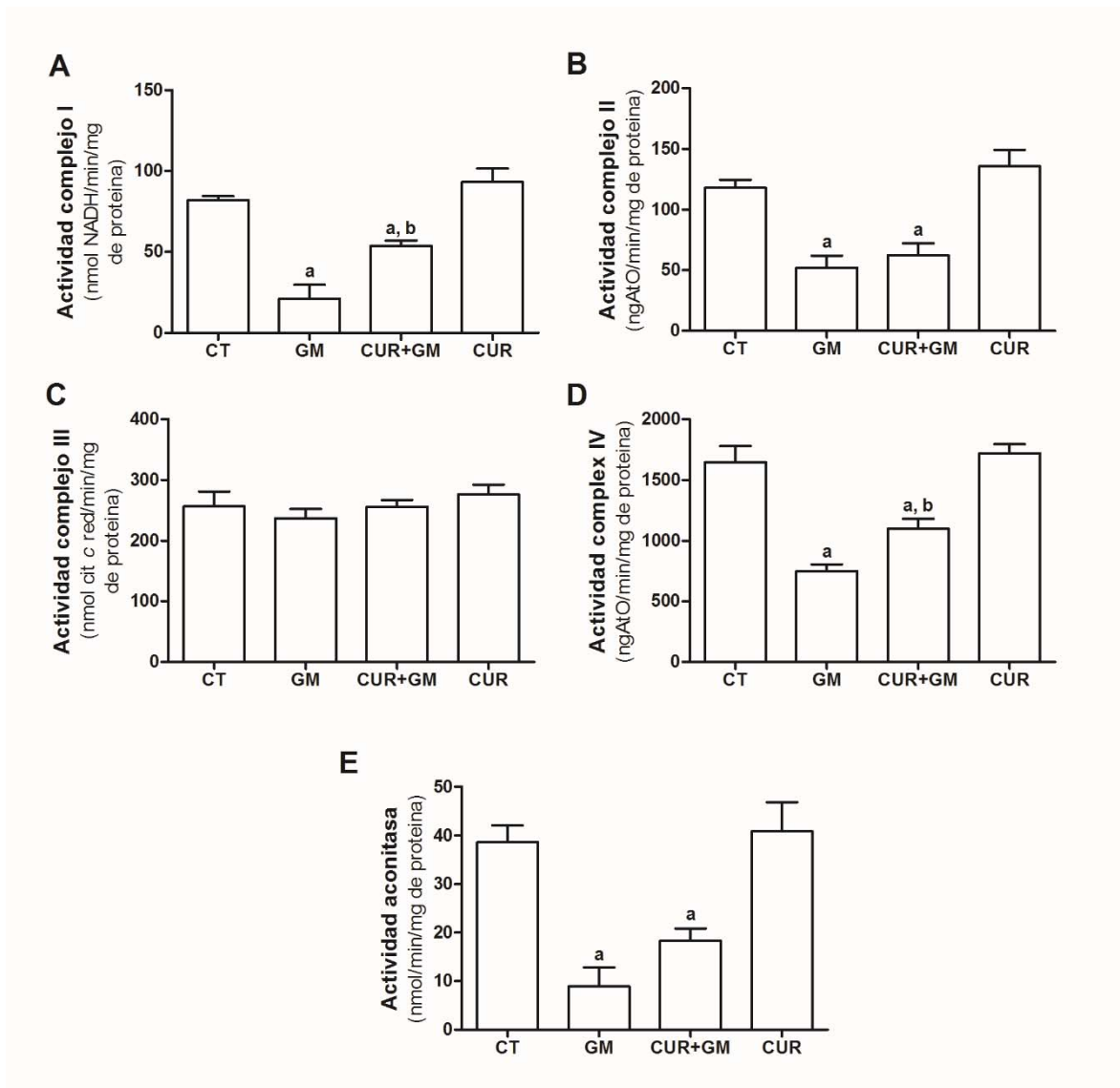
En la Figura 30, se presentan los resultados de las actividades de los complejos respiratorios mitocondriales I-IV y de la enzima aconitasa, como marcadores de estrés oxidante mitocondrial. Se encontró que el tratamiento con gentamicina indujo pérdidas del 74%, 56%, 55% y 76% con respecto al control, en las actividades de los complejos I, II y IV y de la aconitasa, respectivamente ( $p < 0.05$ , Figuras 30A,



30B, 30D y 30E). La gentamicina no tuvo ningún efecto sobre la actividad del complejo III (Figura 31C). El tratamiento con curcumina sólo fue capaz de atenuar la caída en las actividades de los complejos I y IV, con valores cercanos al 66% de la actividad de los controles. Los complejos mitocondriales y la aconitasa de mitocondrias del grupo CUR no presentaron actividades diferentes a las del control.



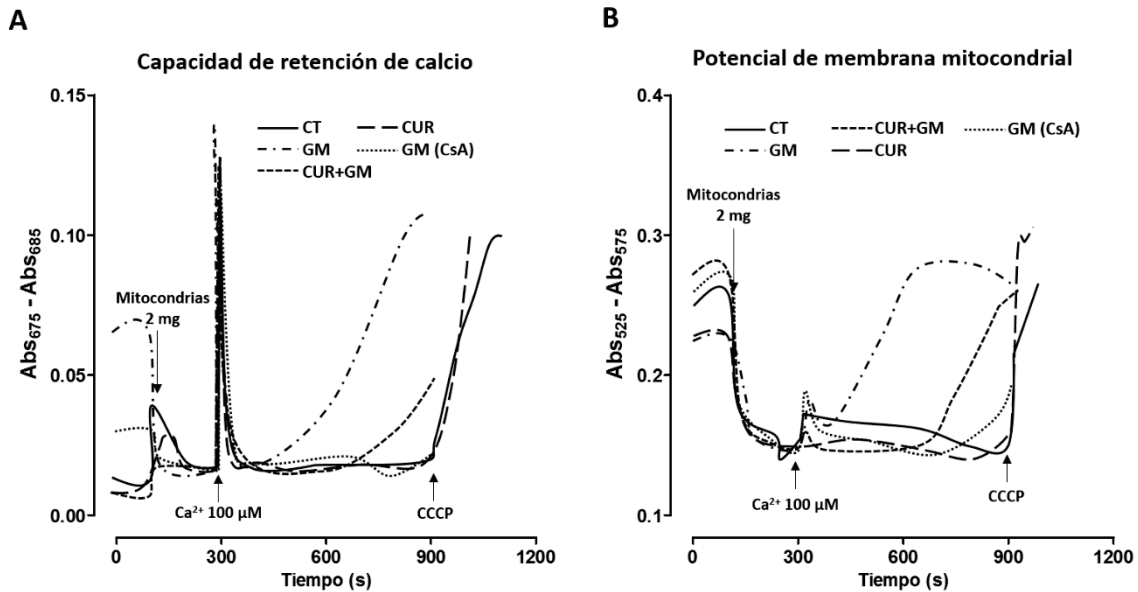
**Figura 29.** Efecto de la curcumina sobre las alteraciones en el consumo de oxígeno inducidas por gentamicina en mitocondrias renales de rata, usando succinato como sustrato. **A**, Estado 3. **B**, Estado 4. **C**, Índice de control respiratorio. **D**, Respiración desacoplada. **E**, Relación ADP/O. CT, control; GM, gentamicina; CUR, curcumina. Promedio  $\pm$  EEM en las ordenadas. ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs. CT; <sup>b</sup> $p < 0.05$  vs. GM.



**Figura 30.** Efecto de la curcumina sobre las alteraciones en las actividades de complejos respiratorios mitocondriales y aconitasa inducidas por gentamicina en riñón de rata. **A**, Complejo I. **B**, Complejo II. **C**, Complejo III. **D**, Complejo IV. **E**, Aconitasa. CT, control; GM, gentamicina; CUR, curcumina. Promedio  $\pm$  EEM en las ordenadas. ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs. CT; <sup>b</sup> $p < 0.05$  vs. GM.

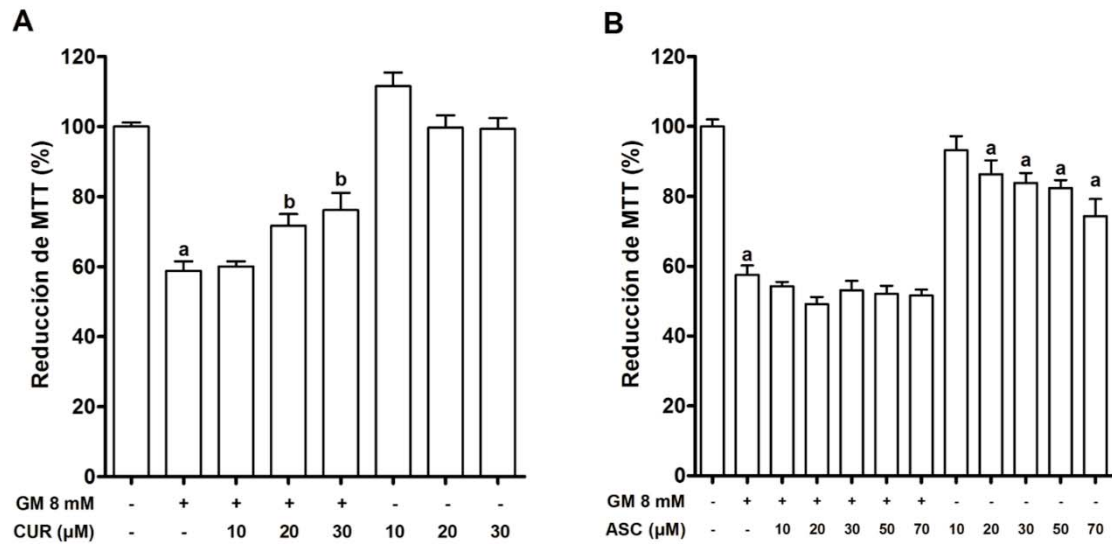
Las mitocondrias de corteza renal de ratas del grupo GM presentaron una mayor sensibilidad a la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ . La baja capacidad de retención de calcio (Figura 31A) y la temprana disipación del PMM (Figura 31B) con la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  100  $\mu\text{M}$  en el grupo GM pusieron de manifiesto la participación de un mecanismo de formación de poro TPM, considerando que estos efectos se inhibieron con la

adición al medio de CsA. Las mitocondrias de riñón de ratas del grupo CUR+GM presentaron una sensibilidad menor al  $\text{Ca}^{2+}$  mientras que las mitocondrias de los grupos CT y CUR presentaron una sensibilidad nula, sin alteraciones durante los 10 minutos de exposición al  $\text{Ca}^{2+}$ .



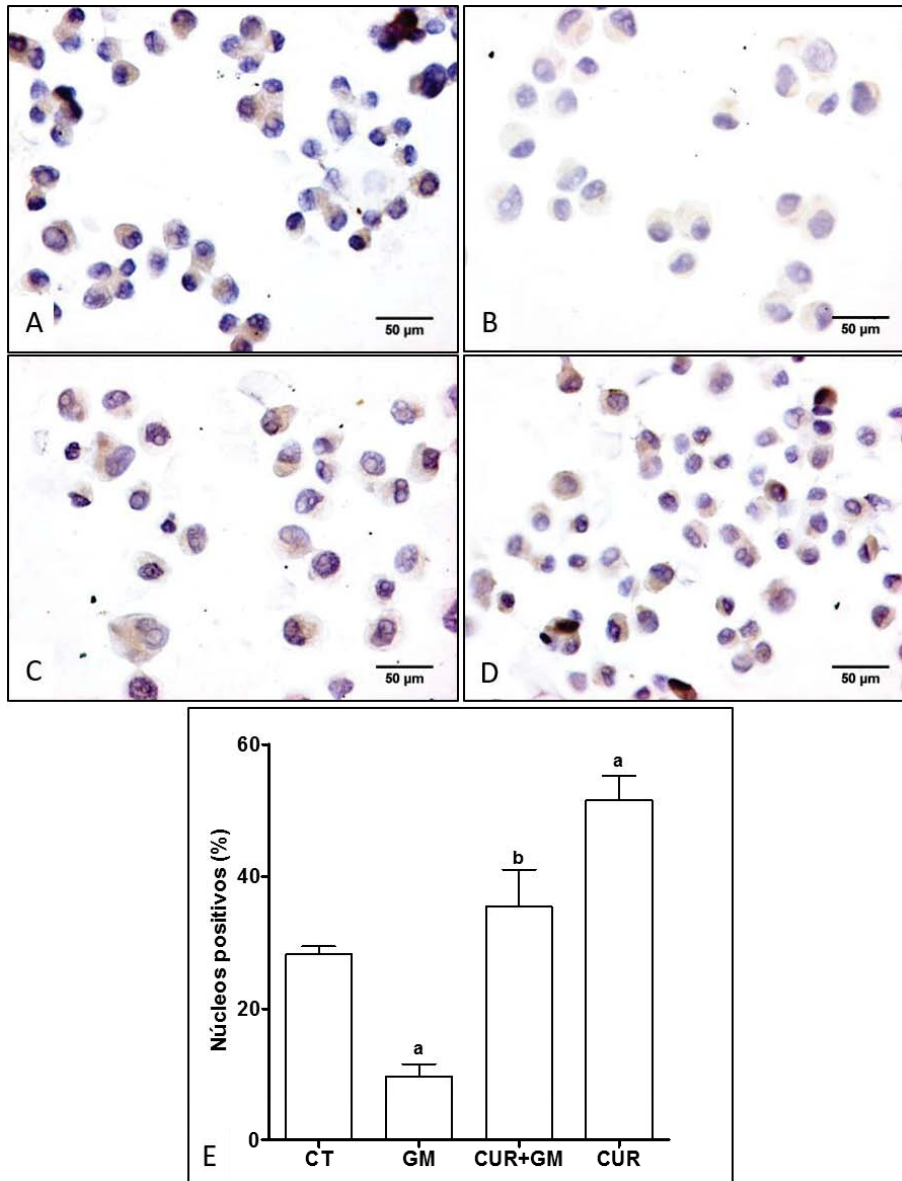
**Figura 31.** Efecto de la curcumina sobre la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial de corteza renal de ratas expuestas a gentamicina. **A**, Potencial de membrana mitocondrial. **B**, Capacidad de retención de  $\text{Ca}^{2+}$ . CT, control; CUR, curcumina; GM, gentamicina; CCCP, carbonilcianuro de m-clorofenilhidrazona; CsA, ciclosporina A. Los trazos son representativos de 4 experimentos independientes.

Para explorar un posible mecanismo de protección, se trasladó el modelo de nefrotoxicidad por gentamicina a la línea celular LLCPK1. La curcumina (20 y 30  $\mu\text{M}$ ) atenuó la caída de un 59% en la viabilidad celular con respecto a las células no tratadas ( $p < 0.05$ ), que se dio en las células incubadas con gentamicina 8 mM (Figura 32A). Buscando hacer una comparación con un antioxidante directo no inductor de la translocación nuclear de Nrf2 y posiblemente no inductor de biogénesis mitocondrial, se evaluó el mismo efecto sobre la viabilidad, pero usando ácido ascórbico (Figura 32B). El ascorbato no tuvo el mismo efecto que la curcumina, por lo menos en el rango de concentración de 10 a 70  $\mu\text{M}$ .

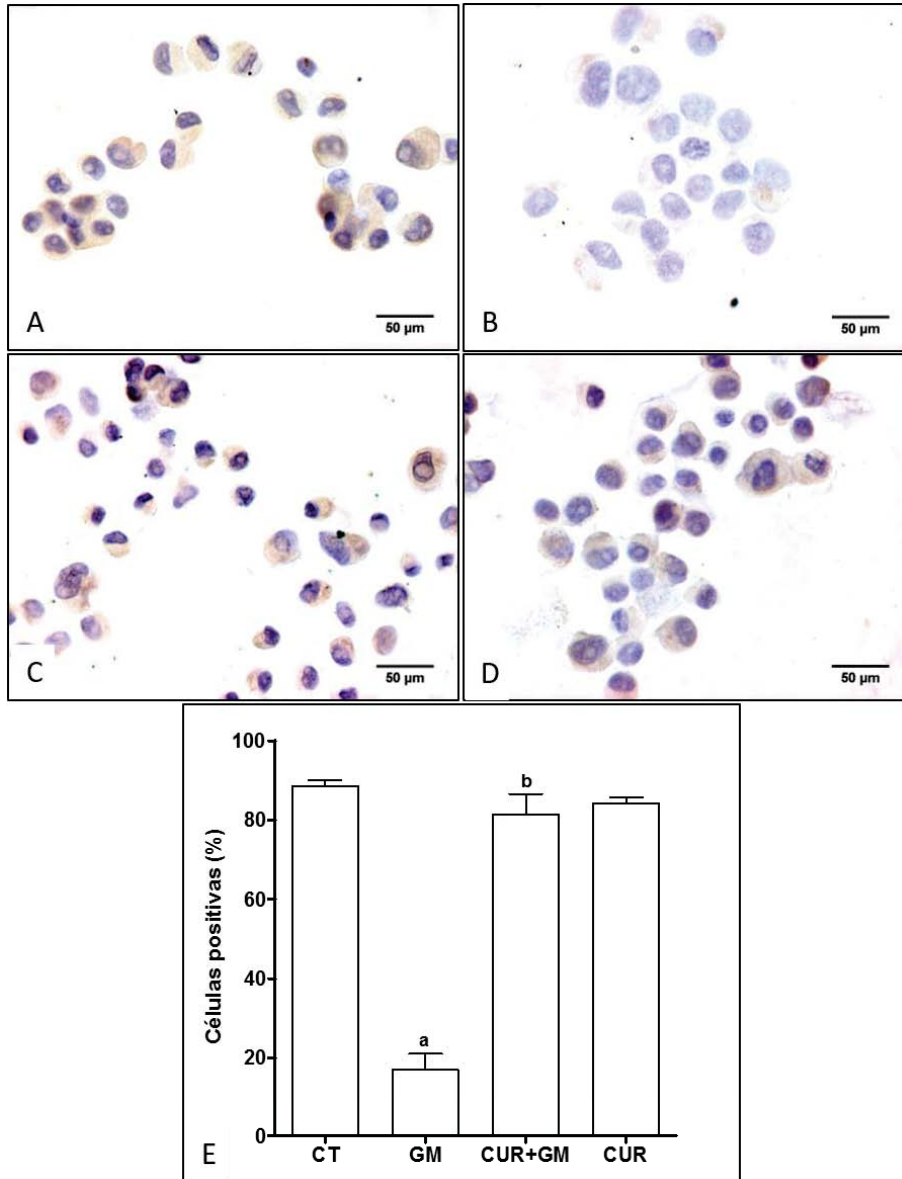


**Figura 32.** Efecto de la curcumina (**A**) y el ascorbato (**B**) sobre la viabilidad de células LLCPK1 tratadas con gentamicina, CUR, curcumina; ASC, ascorbato; GM, gentamicina.  $n = 3$ . Promedio  $\pm$  EEM en las ordenadas. <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs. Control; <sup>b</sup> $p < 0.05$  vs. GM.

Usando curcumina 30  $\mu\text{M}$  se exploró la participación de Nrf2 y del coactivador de la biogénesis mitocondrial, PGC1 $\alpha$ , en el efecto citoprotector. En la Figura 33 se observa que el tratamiento con curcumina evita la disminución en los niveles de Nrf2 nuclear de un 28% en células control a un 10% en las células tratadas con gentamicina. Es notable que sólo el tratamiento con curcumina indujo un aumento en la translocación nuclear de Nrf2 que alcanzó el 52% de las células ( $p < 0.05$  vs. Control). Del mismo modo, las células tratadas con curcumina evitaron la menor expresión de PGC1 $\alpha$  que llegó a un 17% de las células, con respecto al 88% que lo expresaron en el control ( $p < 0.05$ , Figura 34).



**Figura 33.** Expresión e inmunolocalización del factor-2 relacionado al factor-2 nuclear eritroide (Nrf2) en células LLCPK1 tratadas con curcumina (CUR) y gentamicina (GM). (A) Control (CT), (B) GM, (C) CUR+GM, (D) CUR, (E) Cuantificación de núcleos positivos a Nrf2.  $n = 3$ . Promedio  $\pm$  EEM en las ordenadas. <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs. CT; <sup>b</sup> $p < 0.05$  vs. GM. La inmunoprevalencia de Nrf2 está indicada por el color marrón en las micrografías.



**Figura 34.** Expresión e inmunolocalización del co-activador-1 $\alpha$  del receptor- $\gamma$  activado por proliferadores de peroxisomas (PGC1 $\alpha$ ) en células LLCPK1 tratadas con curcumina (CUR) y gentamicina (GM). (A) Control (CT), (B) GM, (C) CUR+GM, (D) CUR, (E) Cuantificación de células positivas a PGC1 $\alpha$ .  $n = 3$ . Promedio  $\pm$  EEM en las ordenadas. <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs. CT; <sup>b</sup> $p < 0.05$  vs. GM. La inmunoprevalencia de PGC1 $\alpha$  está indicada por el color marrón en las micrografías.

## 7. DISCUSIÓN

Uno de los resultados que primeramente llamó la atención fue el efecto deletéreo que ejerce el SFN sobre células LLCPK1 a la concentración de 20  $\mu$ M (Figura 7),

evidenciándose el carácter hormético del SFN. La hormesis se refiere a la respuesta dependiente de la dosis (o de la concentración) que pueden inducir algunas moléculas; se caracteriza por una estimulación de rutas de señalización que favorecen la supervivencia celular a dosis bajas y un efecto inhibitorio o tóxico a dosis altas [86]. Esto hace reflexionar sobre el uso de concentraciones de SFN iguales o superiores a 20  $\mu\text{M}$  en estudios que evalúan el efecto antiproliferativo o inductor de muerte celular en líneas tumorales. Los modelos de estudio con agentes quimioterapéuticos (principalmente antioxidantes, cuyo uso en la terapia antitumoral es muy discutido [87]) no deberían ser tan reduccionistas y deberían considerar los posibles efectos adversos que tendría usar una dosis por encima de cierto valor sobre tejidos normales que no son blancos de la terapia antineoplásica. Se han encontrado modelos de este tipo en el que se usan concentraciones de SFN en el rango de 20 a 100  $\mu\text{M}$  [20]. Estas concentraciones podrían inducir muerte prácticamente en cualquier tipo celular. En el presente estudio, se determinó que el SFN a una misma concentración (5  $\mu\text{M}$ ) induce respuestas diferentes que dependieron del tipo celular (Figura 11). Además, esta concentración tiene mayor importancia desde el punto de vista de la biodisponibilidad y la farmacodinámica del SFN en estudios clínicos. En estos estudios se encontraron concentraciones plasmáticas de SFN entre 2.9 y 7.8  $\mu\text{M}$  después de 1.5 – 3 h de consumo de brotes o preparaciones de brócoli enriquecidas con isotiocianatos [20].

El nivel de formazán producido por la reducción de MTT en un pozo de microplaca es directamente proporcional al número de células viables [88]. Sin embargo, esta reducción ocurre en células metabólicamente activas, y los cambios en la actividad metabólica pueden resultar en cambios significativos en la reducción de MTT, aun si el número de células viables no cambia. Esto significa que el ensayo de MTT permite distinguir entre activación y proliferación celular [83]. Como la conversión de MTT en formazán la cataliza principalmente la deshidrogenasa mitocondrial, podemos decir que esta activación metabólica es mitocondrial. El perfil de reducción de MTT en las células LLCPK1 presentó una pendiente positiva con respecto al tiempo, a la concentración 5  $\mu\text{M}$  de SFN (Figura 7), con significancia a las 72 h. La ausencia de proliferación celular por el tratamiento a este tiempo (Figura 8) permite

afirmar que el SFN induce activación mitocondrial en la línea celular LLCPK1. Un análisis similar puede hacerse con la línea celular PC3, en la que la viabilidad medida por ensayo MTT también fue significativamente mayor que la medida por la tinción nuclear del cristal violeta, en SFN 5  $\mu\text{M}$  a las 72 h. Pero a diferencia de las células LLCPK1, esta activación mitocondrial en las PC3 fue concomitante con una pérdida en la viabilidad (Figura 10). La diferencia entre fenotipos redox y metabólicos entre las células LLCPK1 y PC3 podrían explicar las diferentes respuestas a una misma dosis y tiempo de exposición del SFN. Muchos trabajos en cáncer deberían direccionarse en caracterizar tales fenotipos metabólicos, sobre todo si se están usando antioxidantes que pueden inducir tales respuestas específicas.

De la discusión anterior surge una cuestión: los resultados de masa mitocondrial relativa y proteínas marcadoras de biogénesis mitocondrial en células LLCPK1 tratadas con SFN (Figuras 12 y 13) indican que el SFN induce biogénesis mitocondrial sólo a las 24 h de tratamiento, pero no explican la activación metabólica mitocondrial observada a las 72 h. La fluorescencia relativa de la sonda MitoTracker Green FM y los niveles de las proteínas TFAM, MT-ND1 y NRF1 tuvieron niveles similares a los del control a las 48 y 72 h. Entonces ¿Qué mecanismo diferente de la biogénesis mitocondrial mantiene metabólicamente activa a la mitocondria de células LLCPK1 tratadas con SFN? La respuesta se obtuvo del estudio de la dinámica mitocondrial. De los resultados en las Figuras 18 y 19 se concluye que el SFN indujo fusión mitocondrial en las células LLCPK1 a las 48 y 72 h, mediante la disminución en los niveles de las proteínas Fis1 y Drp1, pertenecientes a la maquinaria de fisión mitocondrial. La fusión mitocondrial es un evento que puede darse en respuesta al estrés tóxico, siempre que esté por debajo de un umbral crítico. Al complementar sus componentes una mitocondria con otra, el resultado es un aumento en la capacidad oxidante (o actividad metabólica) de la mitocondria resultante [13]. El SFN puede inducir este estrés moderado: la conjugación inicial del SFN al glutatión (GSH) intracelular conduce a una disminución en los niveles de GSH reducido y, por tanto, a un estrés oxidante transitorio que puede inducir la estabilización y translocación nuclear de Nrf2 [20]. Adicionalmente, este estrés



transitorio y moderado podría inducir la fusión mitocondrial. Resultaría interesante investigar el grado de participación de esta hiperfusión inducida por el SFN en los efectos de citoprotección descritos con mantenimiento de funciones mitocondriales e inhibición de la apoptosis intrínseca [20].

En la línea tumoral PC3, la disminución en la viabilidad celular acompañada de activación mitocondrial correlaciona mejor con el aumento en componentes mitocondriales observado en las células tratadas con SFN desde las 48 h (Figuras 14 y 15). También a las 48 h, empezó la disipación del PMM (Figura 17) y se observó acumulación de Bax (Figura 21); ambos son marcadores de la apoptosis por vía mitocondrial [6]. El factor NRF1 juega un papel fundamental en estos efectos inducidos por el SFN, dado el aumento en su nivel (Figura 15) paralelo a la disminución en la viabilidad celular (Figura 9) y la prevención de esta última cuando se silencia NRF1 (Figura 23). Por el momento, sólo se puede asegurar que la muerte de células PC3 inducida por el SFN depende en gran medida de la biogénesis mitocondrial regulada por NRF1. Sin embargo, aún hay cosas por explorar en este punto. Ya se habían asociado antes, la proliferación mitocondrial, la despolarización de la membrana mitocondrial y la apoptosis en un estudio en células de carcinoma de colon humano tratadas con un inhibidor de tirosinas cinasas. En ese estudio, así como en este, se observó un aumento en la fluorescencia relativa verde de JC-1 y disminución de la relación 590 nm/529 nm por el tratamiento [89]. Lo anterior refuerza la idea de validar un método para la estimación de la masa mitocondrial relativa usando la sumatoria de las fluorescencias a 590 y 529 nm de JC-1.

La asociación entre apoptosis intrínseca y fisión mitocondrial se discutió en la sección 1.1.3. El SFN indujo fragmentación en la mitocondria de las células PC3 a partir de las 24 h (Figura 20). Aun a las 48 h, se observaron mitocondrias de menor área y mayor circularidad debido a la acumulación de Fis1 y Drp1-60 en la fracción mitocondrial de células PC3 tratadas con SFN (Figura 21). El *splicing* alternativo de Drp1 da lugar a varias isoformas, siendo la de mayor importancia para la fisión, la más corta, de 60 kDa [90]. En este estudio, sólo se observó esta variante de *splicing* en la fracción mitocondrial. Variantes más pesadas se observaron en fracción

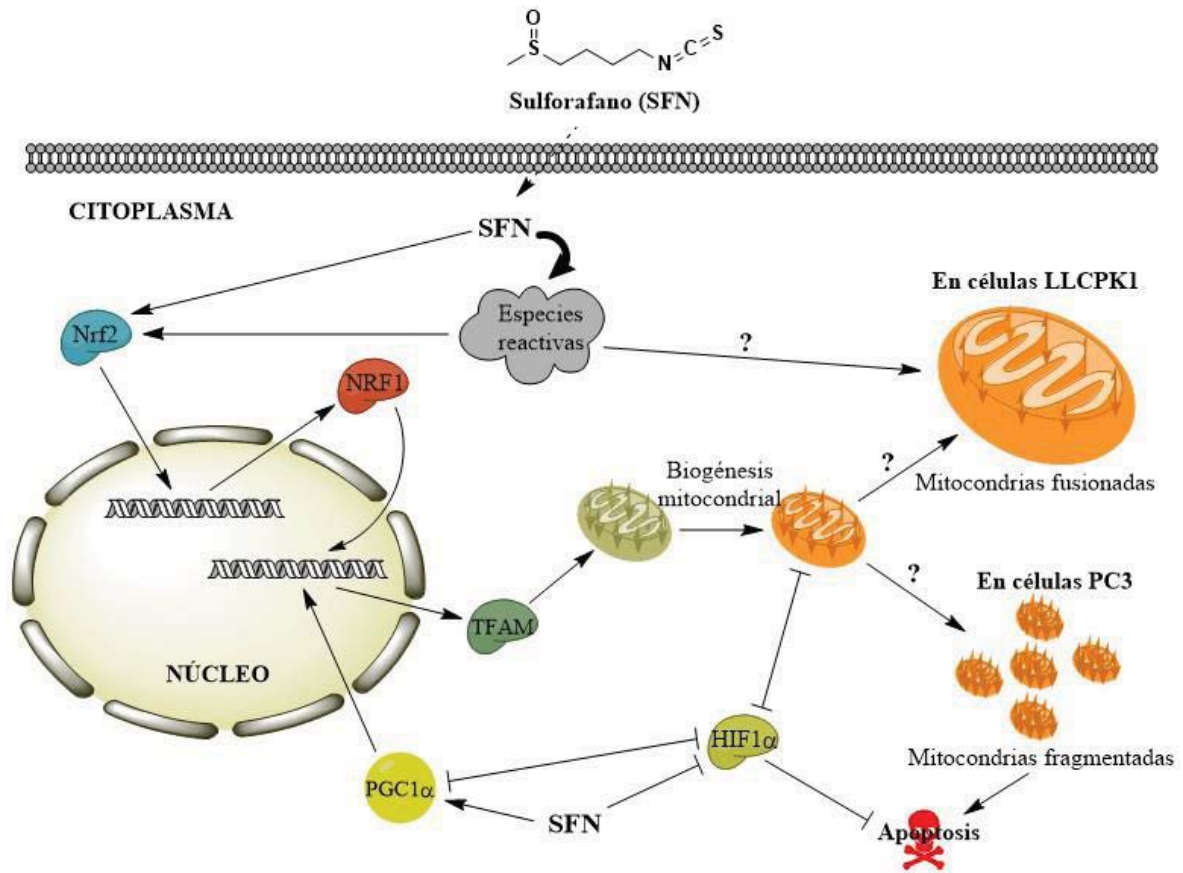
citoplasmática sin cambios entre los tratamientos (Figura anexa 4). El incremento en Drp1-60 también se informó antes, relacionada a la fisión previa a la apoptosis intrínseca en células de colangiocarcinoma tratadas con una combinación de CDDP y el inhibidor de Bcl-2, ABT737 [91]. Por otra parte, Fis1 es una proteína anclada a la membrana mitocondrial externa que recluta a Drp1 durante la fisión, y se ha demostrado que su sobrerregulación independiente de Drp1 es crucial para la ejecución de la fisión previa a la apoptosis [92], [93]. La hiperfusión mitocondrial o los defectos en la maquinaria de fisión están asociados con resistencia a la apoptosis en células cancerosas [94], [95]. Para un ejemplo sobresimplificado obtenido en el presente estudio, compárese el área mitocondrial promedio entre los grupos control de células LLCPK1 y PC3 (Figuras 18B y 20B, respectivamente). Unas mitocondrias relativamente más fragmentadas en la línea celular LLCPK1 indicarían células bajo control de su función mitocondrial y, así, de su ciclo celular. Las mitocondrias en las células PC3, más fusionadas, se relacionarían con la resistencia a la apoptosis descrita en esta línea celular [70], [96]. Antes del presente trabajo, no se había descrito un efecto de modulación de proteínas de la dinámica mitocondrial por el SFN. Derivados de este estudio, no se tienen elementos para proponer un mecanismo de regulación.

El factor HIF1 $\alpha$  está asociado a resistencia a la apoptosis, angiogénesis y metástasis, y es responsable de la inversión metabólica de ciertos tipos de cáncer hacia una alta dependencia glicolítica y baja tasa de actividad mitocondrial [20]. En efecto, HIF1 $\alpha$  inhibe la biogénesis mitocondrial mediante la promoción de la degradación de c-Myc [97], un factor transcripcional que sobrerregula aproximadamente 200 genes con función mitocondrial codificados en el núcleo [98]. También se conoce que HIF1 $\alpha$  induce mitofagia, lo que puede proteger a la célula cancerosa [95]. Por otro lado, PGC1 $\alpha$  y blancos río abajo como la sirtuina 3 pueden bloquear la estabilización de HIF1 $\alpha$  y evitar su efecto inhibitorio sobre la biogénesis mitocondrial [99]. El análisis de HIF1 $\alpha$  y PGC1 $\alpha$  en células PC3 (Figura 22) hace pensar en una inversión del metabolismo celular inducido por SFN, probablemente por inducción de PGC1 $\alpha$  o inhibición de HIF1 $\alpha$  o ambos. La sobrerregulación de PGC1 $\alpha$  inducida por el SFN ya se ha informado, aunque sólo en modelos de

citoprotección, no en células tumorales [100], [101]. También se tienen informes de la subregulación de HIF1 $\alpha$  por el SFN en algunas líneas tumorales [38]–[40]. Se concluye que los efectos inducidos por el SFN sobre PGC1 $\alpha$  y HIF1 $\alpha$  pueden hacer más competentes a las células PC3 para llevar a cabo apoptosis intrínseca, activando funciones mitocondriales que se encontraban inhibidas por el metabolismo glicolítico exacerbado.

La temprana activación de la translocación nuclear de Nrf2 en células PC3 (Figura 22) sugiere su participación en la inducción de la biogénesis mitocondrial y la muerte celular. El eje Nrf2-NRF1, que inicia el programa de biogénesis mitocondrial [22], podría ser el mecanismo que sensibiliza las células PC3 a la muerte apoptótica. Esta observación representa un punto a favor del factor Nrf2 en su discutida participación en el tratamiento antineoplásico, por lo menos para este tipo tumoral. Hay investigaciones que evidencian un crecimiento tumoral favorecido por Nrf2 e informes diferentes que lo asocian con sensibilización a la apoptosis [93], [102]. Hay mucha información que estudiar y evidencia que obtener en esa materia.

Con la evidencia acumulada y la discusión hecha a este punto, por primera vez se propone un modelo (Figura 35) que busca explicar la modulación diferencial que el SFN hace de la biogénesis y la dinámica mitocondrial en células LLCPK1 y PC3, llevándolas a dos destinos distintos: la citoprotección y la apoptosis mitocondrial, respectivamente. No se tiene claro como el SFN regula las proteínas miembros de la maquinaria de la dinámica mitocondrial ni como se conectan la biogénesis y dinámica mitocondrial. Estos temas se constituyen en perspectivas de investigación.



**Figura 35.** Modelo propuesto para la modulación diferencial de la biogénesis y la dinámica mitocondrial en células LLCPK1 y PC3. Una vez dentro de la célula, el sulforafano (SFN) induce la translocación nuclear del factor 2 relacionado al factor nuclear eritroide 2 (Nrf2), ya sea directamente o por la generación transitoria y moderada de especies reactivas que puede hacer. Nrf2 induce transcripcionalmente al factor nuclear respiratorio 1 (NRF1) y este, a su vez, induce proteínas que participan en el proceso de biogénesis mitocondrial, por ejemplo, el factor A de transcripción mitocondrial (Tfam). El estrés transitorio que el SFN induce en las células LLCPK1 podría ser responsable de la fusión mitocondrial, aunque debe establecerse si la biogénesis cumple algún papel obligatoriamente en esto. Asimismo, la biogénesis mitocondrial inducida por el SFN en células PC3 podría estar asociada a la fragmentación mitocondrial que eventualmente lleva a la apoptosis intrínseca. El conocido efecto activador del SFN sobre el coactivador-1α del receptor-γ activado por proliferadores de peroxisomas (PGC1α) y el efecto inhibitorio sobre el factor 1 inducible por hipoxia (HIF1α) también aportarían al efecto global sobre las células PC3, llevando la célula a un metabolismo más dependiente de la mitocondria y menos de la glicólisis y haciéndola más sensible a la apoptosis por vía mitocondrial.

Posterior a la divulgación del efecto citoprotector de SFN contra toxicidad tubular y la insuficiencia renal aguda inducida por CDDP en ratas [56], [57], la cuestión que se planteó fue saber si el SFN bloquearía la actividad antineoplásica del CDDP o si tendría un efecto favorable. El efecto aditivo observado en el cotratamiento de células PC3 (Figura 24) resuelve esta duda. Si bien, se esperaba un efecto sinérgico, el efecto aditivo hallado es de enorme importancia pues responde ante los diferentes informes que señalan que los antioxidantes y/o Nrf2 pueden proteger las células tumorales de agentes quimioterapéuticos y así facilitar la progresión del cáncer [87].

La curcumina es un antioxidante bifuncional, esto es, tiene capacidad atrapadora de ERO e induce una respuesta antioxidante enzimática mediada por la activación de la ruta Nrf2-ARE [79]; por tanto, se espera que la curcumina induzca biogénesis mitocondrial. El papel citoprotector de la curcumina se vinculó con la preservación de los niveles de marcadores de la biogénesis mitocondrial que decrecieron en ratones obesos con esteatosis hepática; sin embargo, este efecto no se asoció a Nrf2 [67]. Una manera de ampliar la evidencia de la participación de Nrf2 en respuestas celulares que involucran la inducción de la biogénesis mitocondrial es usar la curcumina en un modelo de citoprotección contra un agente tóxico dirigido contra la mitocondria. La gentamicina es un antibiótico nefrotóxico que induce la muerte de túbulo proximales, en parte, por la disfunción mitocondrial que ejerce [103]. El efecto protector de la curcumina contra la insuficiencia renal aguda inducida por la gentamicina fue informado previamente [104], aunque no un papel en el mantenimiento de la función mitocondrial. En el presente estudio, la curcumina atenuó el daño renal (Figura 25) y la muerte tubular (Figura 32A) inducidos por la gentamicina. La nefroprotección en ratas se asoció con la preservación de la ultraestructura mitocondrial y la arquitectura de las crestas mitocondriales, que se vio comprometida por el tratamiento con gentamicina (Figura 26). La capacidad de consumo de oxígeno en las mitocondrias de la corteza renal, zona principalmente afectada en el daño por gentamicina, también resultó afectada, principalmente en condiciones de síntesis de ATP (Figuras 28A y 29A); esta capacidad se mantuvo parcialmente en las ratas que se cotrataron con curcumina y gentamicina. Como lo

muestran los índices CR, el principal parámetro funcional en mitocondria aislada [105], la capacidad respiratoria general se preservó o mejoró gracias al tratamiento con curcumina (Figuras 28C y 29C). El estrés oxidante, evidente por la disminución en la actividad de la aconitasa ([106] , Figura 30E), pudo ser el mecanismo que afectó la actividad de los complejos respiratorios I, II y IV, causando la pérdida en la capacidad respiratoria mitocondrial en las ratas tratadas con gentamicina. La alteración en el estado 3, el índice CR y la respiración desacoplada (Figuras 28D y 29D) con los dos sustratos respiratorios favorecen esta idea, pues estos parámetros dependen mucho de la oxidación de los sustratos que se da al nivel de los complejos I y II [105]. La curcumina atenuó la caída en la actividad de los complejos I y IV, pero no en la del complejo II ni en la de la aconitasa, lo cual indica que la protección podría darse por un mecanismo adicional al de la capacidad antioxidante de la curcumina. La formación del poro TPM en las mitocondrias de ratas tratadas con gentamicina también señala la importancia del estrés oxidante en la inducción del daño, ya que las ERO sensibilizan la mitocondria a la formación del poro [10]. La curcumina inhibió la formación del poro, punto a favor de su capacidad antioxidante. Pero, el mecanismo de protección adicional parece ser la preservación en la biogénesis mitocondrial mediada por la activación de Nrf2, que se sugiere por los estudios *in vitro* realizados en las células LLCPK1 (Figuras 33 y 34). El tratamiento con ascorbato, un antioxidante directo que no induce la activación de Nrf2, no fue suficiente para proteger las células LLCPK1 de la muerte por gentamicina (Figura 32B), aunque se ha descrito que sí protege los riñones de ratas expuestas a gentamicina [107]. La biogénesis mitocondrial ayuda a mantener los niveles de proteínas mitocondriales, incluyendo proteínas de la cadena respiratoria y enzimas antioxidantes, lo que hace preguntarse por qué la actividad de la aconitasa y el complejo IV no se preservaron en el tratamiento con curcumina. Es complicado dirigir esta cuestión con el conjunto de evidencias obtenido en este trabajo, pero sin duda, la capacidad bifuncional de la curcumina fue crucial para ejercer su efecto protector mitocondrial en este modelo.

## 8. CONCLUSIONES

El alcance de este estudio permite concluir lo siguiente:

- El SFN, a una misma concentración y tiempo de exposición, induce respuestas específicas en una línea celular no tumoral y en una línea celular tumoral. Estas respuestas específicas son, citoprotección en células LLCPK1 y muerte por apoptosis intrínseca en células PC3. Ambas respuestas se dan a través de la activación del metabolismo mitocondrial que, en células LLCPK1 es resultado de la fusión mitocondrial, mientras que en células PC3 es resultado de la biogénesis mitocondrial. El SFN podría estar induciendo una inversión metabólica en las células PC3 que activaría la mitocondria. Dentro de las funciones mitocondriales activadas en la línea celular PC3, está la fisión mitocondrial, un evento previo a la apoptosis intrínseca. El papel del eje Nrf2-NRF1 es crucial para la muerte celular en esta línea tumoral. Por primera vez, se presentan evidencias de la modulación de la dinámica y la biogénesis mitocondrial inducidas por el SFN, como mecanismos de citoprotección y muerte celular.
- El SFN y, por tanto, Nrf2, no ejercen un efecto citoprotector sobre células PC3 tratadas con CDDP. Esto lo confirma el efecto aditivo observado en el cotratamiento SFN-CDDP.
- El factor Nrf2, cuya acumulación nuclear es inducida por la curcumina, podría iniciar un programa de biogénesis mitocondrial que preserva las funciones mitocondriales en el daño renal inducido por gentamicina en ratas.

## 9. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar esta línea de investigación, desarrollando los siguientes modelos y experimentos:

- El silenciamiento de NRF1 en un modelo de citoprotección contra CDDP en células LLCPK1. Estudiar la dinámica mitocondrial como mecanismo de citoprotección e intentar ligarla a la biogénesis mitocondrial.
- El establecimiento de un modelo de implante xenográfico de tumor de próstata (células PC3) en ratones inmunodeficientes con tratamiento con SFN y CDDP. Evaluar la función renal y la progresión tumoral, y explorar mecanismos que involucren modulación de la función mitocondrial.

De manera general y como conclusiones adicionales de este trabajo, en modelos de estudio de actividad antitumoral de antioxidantes, se recomienda introducir controles de las contrapartes no tumorales de líneas tumorales. Esto con el objetivo de evaluar que las concentraciones del agente usado no induzcan niveles de muerte similares en ambas líneas. Además, se recomienda hacer caracterizaciones redox y metabólicas en ambas líneas.

## 10. REFERENCIAS

- [1] Lane N, Martin W. (2010). The energetics of genome complexity. *Nature* 467(7318):929–34.
- [2] Ryan MT, Hoogenraad NJ. (2007). Mitochondrial-nuclear communications. *Annu Rev Biochem* 76:701–22.
- [3] Scarpulla RC. (2008). Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev* 88(2):611–38.
- [4] Nunnari J, Suomalainen A. (2012). Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* 148(6):1145–59.
- [5] Estaquier J, Vallette F, Vayssiere J, Mignotte B. (2012). The mitochondrial pathways of apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 942:157–83.
- [6] Wang C, Youle RJ. (2009). The role of mitochondria in apoptosis. *Annu Rev Genet* 43:95–118.



- [7] Kerr JF, Wyllie AH, Currie R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26(4):239–57.
- [8] Saraste A, Pulkki K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 45(3):528–37.
- [9] Scatena R. (2012). Mitochondria and cancer: a growing role in apoptosis, cancer cell metabolism and dedifferentiation. *Adv Exp Med Biol* 942:287–308.
- [10] Orrenius S. (2007). Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug Metab Rev* 39(2–3):443–55.
- [11] Westermann B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(12):872–84.
- [12] Hoppins S, Lackner L, Nunnari J. (2007). The Machines that Divide and Fuse Mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76:751-80.
- [13] Youle RJ, van der Bliek AM. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* 337(6098):1062–65.
- [14] Diaz F, Moraes CT. (2008). Mitochondrial biogenesis and turnover. *Cell Calcium* 44(1):24–35.
- [15] Scarpulla RC. (2008). Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator. *Ann N Y Acad Sci* 1147:321–34.
- [16] Antico Arciuch VG, Elguero ME, Poderoso JJ, Carreras MC. (2012). Mitochondrial regulation of cell cycle and proliferation. *Antioxid Redox Signal* 16(10):1150–80.
- [17] Li H, Chen Y, Jones AF, Sanger RH, Collis LP, Flannery R, McNay EC, Yu T, Schwarzenbacher R, Bossy B, Bossy-Wetzel E, Bennett MVL, Pypaert M, Hickman JA, Smith PJS, Hardwick JM, Jonas EA. (2008). Bcl-xL induces

Drp1-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(6):2169–74.

- [18] Berman SB, Chen YB, Qi B, McCaffery JM, Rucker EB, Goebbels S, Nave KA, Arnold BA, Jonas EA, Pineda FJ, Hardwick JM. (2009). Bcl-x L increases mitochondrial fission, fusion, and biomass in neurons. *J Cell Biol* 184(5):707–19.
- [19] Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:89–116.
- [20] Negrette-Guzmán M, Huerta-Yeppez S, Tapia E, Pedraza-Chaverri J. (2013). Modulation of mitochondrial functions by the indirect antioxidant sulforaphane: A seemingly contradictory dual role and an integrative hypothesis. *Free Radic Biol Med* 65:1078–89.
- [21] Wakabayashi N, Slocum SL, Skoko JJ, Shin S, Kensler TW. (2010). When NRF2 talks, who's listening?. *Antioxid Redox Signal* 13(11):1649–63.
- [22] Piantadosi CA, Carraway MS, Babiker A, Suliman HB. (2008). Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1. *Circ Res* 103(11):1232–40.
- [23] MacGarvey NC, Suliman HB, Bartz RR, Fu P, Withers CM, Welty-Wolf KE, Piantadosi CA. (2012). Activation of mitochondrial biogenesis by heme oxygenase-1-mediated NF-E2-related factor-2 induction rescues mice from lethal *Staphylococcus aureus* sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 185(8):851–61.
- [24] Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S. (2010). The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells. *Mol Aspects Med* 31(1):60–74.
- [25] Radpour R, Fan AX, Kohler C, Holzgreve W, Zhong XY. (2009). Current

- understanding of mitochondrial DNA in breast cancer. *Breast J* 5(5):505–9.
- [26] Tseng LM, Yin PH, Yang CW, Tsai YF, Hsu CY, Chi CW. (2011). Somatic mutations of the mitochondrial genome in human breast cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 50(10):800-11.
- [27] Imanishi H, Hattori K, Wada R, Ishikawa K, Fukuda S, Takenaga K, Nakada K, Hayashi JI. (2011). Mitochondrial DNA mutations regulate metastasis of human breast cancer cells. *PLoS One* 6(8):e2340.
- [28] Kulawiec M, Owens KM, Singh KK. (2009). Cancer cell mitochondria confer apoptosis resistance and promote metastasis. *Cancer Biol Ther* 8(14):1378-85.
- [29] Ye C, Shu XO, Pierce L, Wen W, Courtney R, Gao YT, Zheng W, Cai Q. (2011). Mutations in the mitochondrial DNA D-loop region and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 119(2):431–6.
- [30] Guerrero-Beltrán CE, Calderón-Oliver M, Pedraza-Chaverri J, Chirino YI. (2012). Protective effect of sulforaphane against oxidative stress: recent advances. *Exp Toxicol Pathol* 64(5):503–8.
- [31] Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, Katoh 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(18):11908–13.
- [32] Hong F, Freeman ML, Liebler DC. (2005). Identification of sensor cysteines in human Keap1 modified by the cancer chemopreventive agent sulforaphane. *Chem Res Toxicol* 18(12):1917–26.
- [33] Yu R, Lei W, Mandlekar S, Weber MJ, Der CJ, Wu J, Kong AN. (1999). Role of a mitogen-activated protein kinase pathway in the induction of phase II detoxifying enzymes by chemicals. *J Biol Chem* 274(39):27545–52.

- [34] Huang HC, Nguyen T, Pickett CB. (2000). Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(23):12475–80.
- [35] Jakubíková J, Sedlák J, Mithen R, Bao Y. (2005). Role of PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways in sulforaphane- and erucin-induced phase II enzymes and MRP2 transcription, G2/M arrest and cell death in Caco-2 cells. *Biochem Pharmacol* 69(11):1543–52.
- [36] Salazar M, Rojo AI, Velasco D, de Sagarra RM, Cuadrado A. (2006). Glycogen synthase kinase-3beta inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem* 281(21):14841–51.
- [37] Muthusamy VR, Kannan S, Sadhaasivam K, Gounder SS, Davidson CJ, Boehme C, Hoidal JR, Wang L, Rajasekaran NS. (2012). Acute exercise stress activates Nrf2/ARE signaling and promotes antioxidant mechanisms in the myocardium. *Free Radic Biol Med* 52(2):366–76.
- [38] Bertl E, Bartsch H, Gerhäuser C. (2006). Inhibition of angiogenesis and endothelial cell functions are novel sulforaphane-mediated mechanisms in chemoprevention. *Mol Cancer Ther* 5(3):575–85.
- [39] Yao H, Wang H, Zhang Z, Jiang BH, Luo J, Shi X. (2008). Sulforaphane inhibited expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in human tongue squamous cancer cells and prostate cancer cells. *Int J Cancer* 123(6):1255-61.
- [40] Jeon YK, Yoo DR, Jang YH, Jang SY, Nam MJ. (2011). Sulforaphane induces apoptosis in human hepatic cancer cells through inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase4, mediated by hypoxia inducible factor-1-dependent pathway. *Biochim Biophys Acta* 1814(10):1340–48.
- [41] Brose RD, Shin G, McGuinness MC, Schneidereith T, Purvis S, Dong GX, Keefer J, Spencer F, Smith KD. (2012). Activation of the stress proteome as a

- mechanism for small molecule therapeutics. *Hum Mol Genet* 21(19):4237–52.
- [42] Miller BF, Hamilton KL. (2012). A perspective on the determination of mitochondrial biogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302(5):E496–9.
- [43] Gamet-Payrastre L, Li P, Lumeau S, Cassar G, Dupont MA, Chevolleau S, Gasc N, Tulliez J, Tercé F. (2000). Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells. *Cancer Res* 60(5):1426–33.
- [44] Choi S, Lew KL, Xiao H, Herman-Antosiewicz A, Xiao D, Brown CK, Singh SV. (2007). D,L-Sulforaphane-induced cell death in human prostate cancer cells is regulated by inhibitor of apoptosis family proteins and Apaf-1. *Carcinogenesis* 28(1):151–62.
- [45] Shankar S, Ganapathy S, Srivastava RK. (2008). Sulforaphane enhances the therapeutic potential of TRAIL in prostate cancer orthotopic model through regulation of apoptosis, metastasis, and angiogenesis. *Clin Cancer Res* 14(21):6855–66.
- [46] Xiao D, Powolny AA, Antosiewicz J, Hahm ER, Bommarreddy A, Zeng Y, Desai D, Amin S, Herman-Antosiewicz A, Singh SV. (2009). Cellular responses to cancer chemopreventive agent D,L-sulforaphane in human prostate cancer cells are initiated by mitochondrial reactive oxygen species. *Pharm Res* 26(7):1729–38.
- [47] Yeh CT, Yen GC. (2005). Effect of sulforaphane on metallothionein expression and induction of apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Carcinogenesis* 26(12):2138–48.
- [48] Asakage M, Tsuno NH, Kitayama J, Tsuchiya T, Yoneyama S, Yamada J, Okaji Y, Kaisaki S, Osada T, Takahashi K, Nagawa H. (2006). Sulforaphane induces inhibition of human umbilical vein endothelial cells proliferation by apoptosis. *Angiogenesis* 9(2):83–91.

- [49] Karmakar S, Weinberg MS, Banik NL, Patel SJ, Ray SK. (2006). Activation of multiple molecular mechanisms for apoptosis in human malignant glioblastoma T98G and U87MG cells treated with sulforaphane. *Neuroscience* 141(3):1265–80.
- [50] Pledgie-Tracy A, Sobolewski MD, Davidson NE. (2007). Sulforaphane induces cell type-specific apoptosis in human breast cancer cell lines. *Mol Cancer Ther* 6(3):1013–21.
- [51] Bryant CS, Kumar S, Chamala S, Shah J, Pal J, Haider M, Seward S, Qazi AM, Morris R, Semaan A, Shamma MA, Steffes C, Potti RB, Prasad M, Weaver DW, Batchu RB. (2010). Sulforaphane induces cell cycle arrest by protecting RB-E2F-1 complex in epithelial ovarian cancer cells. *Mol Cancer* 9:47.
- [52] Jakubikova J, Cervi D, Ooi M, Kim K, Nahar S, Klippel S, Cholujova S, Leiba M, Daley JF, Delmore J, Negri J, Blotta S, McMillin DW, Hideshima T, Richardson PG, Sedlak J, Anderson KC, Mitsiades CS. (2011). Anti-tumor activity and signaling events triggered by the isothiocyanates, sulforaphane and phenethyl isothiocyanate, in multiple myeloma. *Haematologica* 96(8):1170–9.
- [53] Huang TY, Chang WC, Wang MY, Yang YR, Hsu YC. (2012). Effect of sulforaphane on growth inhibition in human brain malignant glioma GBM 8401 cells by means of mitochondrial- and MEK/ERK-mediated apoptosis pathway. *Cell Biochem Biophys* 63(3):247–59.
- [54] Hsu YC, Chang SJ, Wang MY, Chen YL, Huang TY. (2013). Growth inhibition and apoptosis of neuroblastoma cells through ROS-independent MEK/ERK activation by sulforaphane. *Cell Biochem Biophys Biophys* 66(3):765–74.
- [55] Piao CS, Gao S, Lee GH, Kim DS, Park BH, Chae SW, Chae HJ, Kim SH. (2010). Sulforaphane protects ischemic injury of hearts through antioxidant pathway and mitochondrial K(ATP) channels. *Pharmacol Res* 61(4):342–8.

- [56] Guerrero-Beltrán CE, Calderón-Oliver M, Tapia E, Medina-Campos ON, Sánchez-González DJ, Martínez-Martínez CM, Ortiz-Vega KM, Franco M, Pedraza-Chaverri J. (2010). Sulforaphane protects against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Toxicol Lett* 192(3):278–85.
- [57] Guerrero-Beltrán CE, Calderón-Oliver M, Martínez-Abundis E, Tapia E, Zarco-Márquez G, Zazueta C, Pedraza-Chaverri J. (2010). Protective effect of sulforaphane against cisplatin-induced mitochondrial alterations and impairment in the activity of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 and  $\gamma$  glutamyl cysteine ligase: studies in mitochondria isolated from rat kidney and in LLC-PK1 cells. *Toxicol Lett* 199(1):80–92.
- [58] Greco T, Fiskum G. (2010). Brain mitochondria from rats treated with sulforaphane are resistant to redox-regulated permeability transition. *J Bioenerg Biomembr* 42(6):491–7.
- [59] Gaona-Gaona L, Molina-Jijón E, Tapia E, Zazueta C, Hernández-Pando R, Calderón-Oliver M, Zarco-Márquez G, Pinzón E, Pedraza-Chaverri J. (2011). Protective effect of sulforaphane pretreatment against cisplatin-induced liver and mitochondrial oxidant damage in rats. *Toxicology* 286(1–3):20–7.
- [60] Greco T, Shafer J, Fiskum G. (2011). Sulforaphane inhibits mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 51(12):2164–71.
- [61] Chung SD, Lai TY, Chien CT, Yu HJ. (2012). Activating Nrf-2 signaling depresses unilateral ureteral obstruction-evoked mitochondrial stress-related autophagy, apoptosis and pyroptosis in kidney. *PLoS One* 7(10):e47299.
- [62] Miller DM, Singh IN, Wang JA, Hall ED. (2013). Administration of the Nrf2-ARE activators sulforaphane and carnosic acid attenuates 4-hydroxy-2-nonenal-induced mitochondrial dysfunction ex vivo. *Free Radic Biol Med* 57:1–9.
- [63] Negrette-Guzmán M, Huerta-Yepez S, Medina-Campos ON, Zatarain-Barrón

- ZL, Hernández-Pando R, Torres I, Tapia E, Pedraza-Chaverri J. (2013). Sulforaphane attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity: role of mitochondrial protection. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013:135314.
- [64] Trujillo J, Chirino YI, Molina-Jijón E, Andérica-Romero AC, Tapia E, Pedraza-Chaverri J. (2013). Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings. *Redox Biol* 1(1):448–56.
- [65] Zúñiga-Toalá A, Zatarain-Barrón ZL, Hernández-Pando R, Negrette-Guzmán M, Huerta-Yepe S, Torres I, Pinzón E, Tapia E, Pedraza-Chaverri J. (2013). Nordihydroguaiaretic acid induces Nrf2 nuclear translocation in vivo and attenuates renal damage and apoptosis in the ischemia and reperfusion model. *Phytomedicine* 20(10):775–9.
- [66] Kalayarasan S, Sriram N, Sureshkumar A, Sudhandiran G. (2008). Chromium (VI)-induced oxidative stress and apoptosis is reduced by garlic and its derivative S-allylcysteine through the activation of Nrf2 in the hepatocytes of Wistar rats. *J Appl Toxicol* 28(7):908–19.
- [67] Kuo JJ, Chang HH, Tsai TH, Lee TY. (2012). Positive effect of curcumin on inflammation and mitochondrial dysfunction in obese mice with liver steatosis. *Int J Mol Med* 30(3):673–9.
- [68] Atif F, Yousuf S, Agrawal SK. (2009). S-allyl L-cysteine diminishes cerebral ischemia-induced mitochondrial dysfunctions in hippocampus. *Brain Res* 1265:128–37.
- [69] Lee J, Kosaras B, Del Signore SJ, Cormier K, McKee A, Ratan RR, Kowall NW, Ryu H. (2011). Modulation of lipid peroxidation and mitochondrial function improves neuropathology in Huntington's disease mice. *Acta Neuropathol* 121(4):487–98.
- [70] Huerta-Yepe S, Baritaki S, Baay-Guzman G, Hernandez-Luna MA, Hernandez-Cueto A, Vega MI, Bonavida B. (2013). Contribution of either YY1 or BclXL-induced inhibition by the NO-donor DETANONOate in the reversal of



drug resistance, both in vitro and in vivo. YY1 and BclXL are overexpressed in prostate cancer. *Nitric Oxide* 29:17–24.

- [71] Sumantran VN. (2011). Cellular chemosensitivity assays: an overview. *Methods Mol Biol* 731:219–36.
- [72] Stoddart MJ. (2011). Cell Viability Assays: Introduction. *Methods Mol Biol* 740:1–6.
- [73] Methods. (2003). Cell Proliferation and Viability Measurement. *Biochemica* 3:1–3.
- [74] Hawker JR. (2003). Chemiluminescence-based BrdU ELISA to measure DNA synthesis. *J Immunol Methods* 274(1–2):77–82.
- [75] Rothmeier AS, Ischenko I, Joore J, Garczarczyk D, Fürst R, Bruns CJ, Vollmar AM, Zahler S. (2009). Investigation of the marine compound spongistatin 1 links the inhibition of PKCalpha translocation to nonmitotic effects of tubulin antagonism in angiogenesis. *FASEB J* 23(4):1127–37.
- [76] de Arriba G, de Hornedo JP, Rubio SR, Fernández MC, Martínez SB, Camarero MM, Cid TP. (2009). Vitamin E protects against the mitochondrial damage caused by cyclosporin A in LLC-PK1 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 239(3):241–50.
- [77] Ernst O, Zor T. (2010). Linearization of the bradford protein assay. *J Vis Exp* 38:1–6.
- [78] Kim DH, Behlke MA, Rose SD, Chang MS, Choi S, Rossi JJ. (2005). Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotechnol* 23(2):222–6.
- [79] Dinkova-Kostova AT, Talalay P. (2008). Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol Nutr Food Res* 52(1):S128–38.

- [80] García-Niño WR, Tapia E, Zazueta C, Zatarain-Barrón ZL, Hernández-Pando R, Vega-García CC, Pedraza-Chaverri J. (2013). Curcumin pretreatment prevents potassium dichromate-induced hepatotoxicity, oxidative stress, decreased respiratory complex I activity, and membrane permeability transition pore opening. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013:424692.
- [81] Eckfeldt JH, Kershaw MJ, Dahl II. (1984). Direct analysis for urinary protein with biuret reagent, with use of urine ultrafiltrate blanking: comparison with a manual biuret method involving trichloroacetic acid precipitation. *Clin Chem* 30(3):443–6.
- [82] Molina-Jijón E, Tapia E, Zazueta C, El Hafidi M, Zatarain-Barrón ZL, Hernández-Pando R, Medina-Campos ON, Zarco-Márquez G, Torres I, Pedraza-Chaverri J. (2011). Curcumin prevents Cr(VI)-induced renal oxidant damage by a mitochondrial pathway. *Free Radic Biol Med* 51(8):1543–57.
- [83] Vega-Avila E, Pugsley MK. (2011). An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proc West Pharmacol Soc* 54:10–4.
- [84] Cottet-Rousselle C, Ronot X, Leverve X, Mayol JF. (2011). Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes. *Cytometry A* 79(6):405–25.
- [85] Montessuit S, Somasekharan SP, Terrones O, Lucken-Ardjomande S, Herzig S, Schwarzenbacher R, Manstein DJ, Bossy-Wetzel E, Basañez G, Meda P, Martinou JC. (2010). Membrane remodeling induced by the dynamin-related protein Drp1 stimulates Bax oligomerization. *Cell* 142(6):889–901.
- [86] Mattson MP. (2008). Hormesis defined *Ageing Res Rev* 7(1):1–7.
- [87] Jaramillo M, Zhang D. (2013). The emerging role of the Nrf2–Keap1 signaling pathway in cancer. *Genes Dev* 27:2179–2191.
- [88] Gerlier D, Thomasset N. (1986). Use of MTT colorimetric assay to measure

cell activation. *J Immunol Methods* 94(1–2):57–63.

- [89] Mancini M, Anderson BO, Caldwell E, Sedghinasab M, Paty PB, Hockenbery DM. (1997). Mitochondrial Proliferation and Paradoxical Membrane Depolarization during Terminal Differentiation and Apoptosis in a Human Colon Carcinoma Cell Line. *J Cell Biol* 138(2):449–69.
- [90] Macdonald PJ, Francy CA, Stepanyants N, Lehman L, Baglio A, Mears JA, Qi X, Ramachandran R. (2016). Distinct splice variants of dynamin-related protein 1 differentially utilize mitochondrial fission factor as an effector of cooperative GTPase activity. *J Biol Chem* 291(1):493–507.
- [91] Fan Z, Yu H, Cui N, Kong X, Liu X, Chang Y, Wu Y, Sun L, Wang G. (2015). ABT737 enhances cholangiocarcinoma sensitivity to cisplatin through regulation of mitochondrial dynamics. *Exp Cell Res* 335(1):68–81.
- [92] Lee Y, Jeong S, Karbowski M, Smith CL, Youle RJ. (2004). Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell* 15(11):5001–11.
- [93] Fan S, Chen WX, Bin Lv X, Tang QL, Sun LJ, Du Liu B, Zhong JL, Lin ZY, Wang YY, Li QX, Yu X, Zhang HQ, Li YL, Wen B, Zhang Z, Chen WL, Li JS. (2015). MiR-483-5p determines mitochondrial fission and cisplatin sensitivity in tongue squamous cell carcinoma by targeting FIS1. *Cancer Lett* 362(2):183–91.
- [94] Thomas KJ, Jacobson MR. (2012). Defects in mitochondrial fission protein dynamin-related protein 1 are linked to apoptotic resistance and autophagy in a lung cancer model. *PLoS One* 7(9):e45319.
- [95] Boland ML, Chourasia AH, Macleod KF. (2013). Mitochondrial dysfunction in cancer. *Front Oncol* 3:292.
- [96] Huerta-Yepez S, Vega M, Escoto-Chavez SE, Murdock B, Sakai T, Baritaki S, Bonavida B. (2009). Nitric oxide sensitizes tumor cells to TRAIL-induced

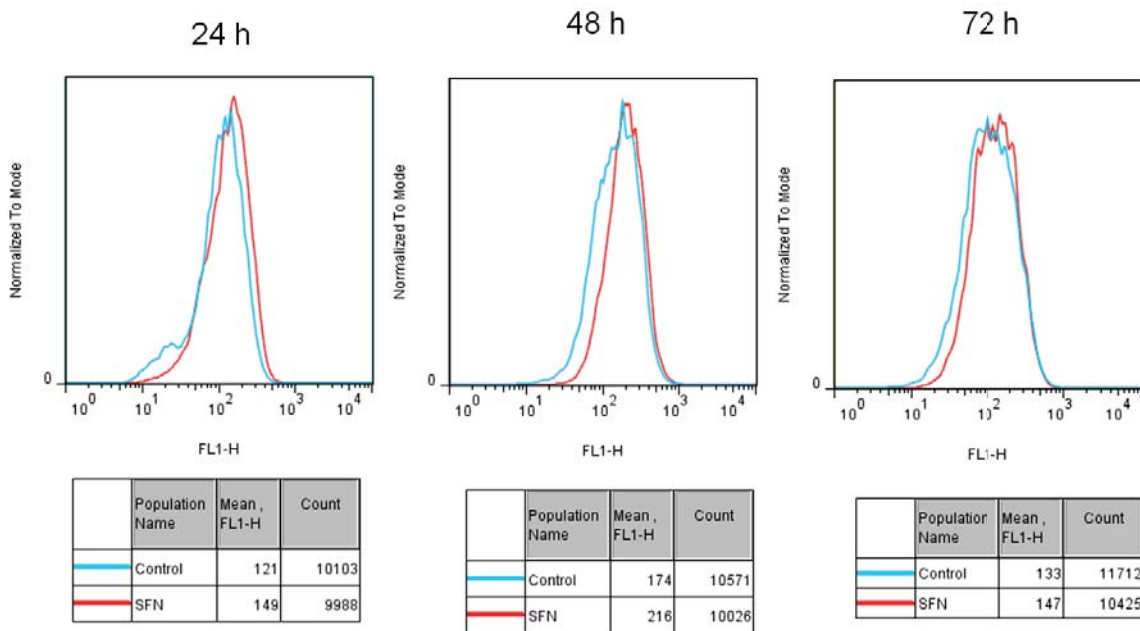
apoptosis via inhibition of the DR5 transcription repressor Yin Yang 1. *Nitric Oxide* 20(1):39–52.

- [97] Zhang H, Gao P, Fukuda R, Kumar G, Krishnamachary B, Zeller KI, Dang C, Semenza GL. (2007). HIF-1 Inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell* 11(5):407–20.
- [98] Li F, Wang Y, Zeller KI, Potter JJ, Wonsey DR, O'Donnell KA, Kim J, Yustein JT, Lee LA, Dang CV. (2005). Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. *Mol Cell Biol* 25(14):6225–34.
- [99] Finley LW, Carracedo A, Lee J, Souza A, Egia A, Zhang J, Teruya-Feldstein J, Moreira PI, Cardoso SM, Clish CB, Pandolfi PP, Haigis MC. (2011). SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1 $\alpha$  destabilization. *Cancer Cell* 19(3):416–28.
- [100] Fernandes RO, Bonetto JHP, Baregazy B, de Castro AL, Puukila S, Forsyth H, Schenkel PC, Llesuy SF, Brum IS, Araujo ASR, Khaper N, Belló-Klein A. (2014). Modulation of apoptosis by sulforaphane is associated with PGC-1 $\alpha$  stimulation and decreased oxidative stress in cardiac myoblasts. *Mol Cell Biochem* 401(1–2):61–70.
- [101] Zhang Z, Wang S, Zhou S, Yan X, Wang Y, Chen J, Mellen N, Kong M, Gu J, Tan Y, Zheng Y, Cai L. (2014). Sulforaphane prevents the development of cardiomyopathy in type 2 diabetic mice probably by reversing oxidative stress-induced inhibition of LKB1/AMPK pathway. *J Mol Cell Cardiol* 77:42–52.
- [102] Xu IM, Lai RK, Lin SH, Tse AP, Chiu DK, Koh HY, Law CT, Wong CM, Cai Z, Wong CC, Ng IO. (2016). Transketolase counteracts oxidative stress to drive cancer development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(6):E725-34.
- [103] Lopez-Novoa JM, Quiros Y, Vicente L, Morales AI, Lopez-Hernandez FJ. (2011). New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. *Kidney Int* 79(1):33–45.

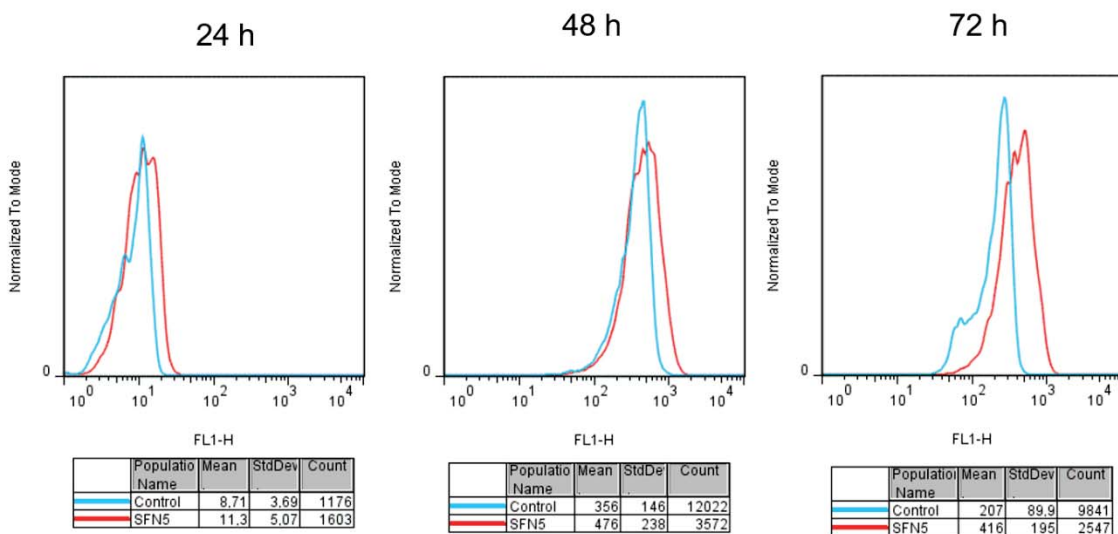
- [104] Manikandan R, Beulaja M, Thiagarajan R, Priyadarsini A, Saravanan R, Arumugam M. (2011). Ameliorative effects of curcumin against renal injuries mediated by inducible nitric oxide synthase and nuclear factor kappa B during gentamicin-induced toxicity in Wistar rats. *Eur J Pharmacol* 670(2–3):578–85.
- [105] Brand MD, Nicholls DG. (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J* 435(2):297–312.
- [106] Martínez-Abundis E, García N, Correa F, Hernández-Reséndiz S, Pedraza-Chaverri J, Zazueta C. (2010). Effects of alpha-mangostin on mitochondrial energetic metabolism. *Mitochondrion* 10(2):151–7.
- [107] Moreira MA, Nascimento MA, Bozzo TA, Cintra A, da Silva SM, Dalboni MA, Mouro MG, Higa EM. (2014). Ascorbic acid reduces gentamicin-induced nephrotoxicity in rats through the control of reactive oxygen species. *Clin Nutr* 33(2):296-301.

# 11. ANEXOS

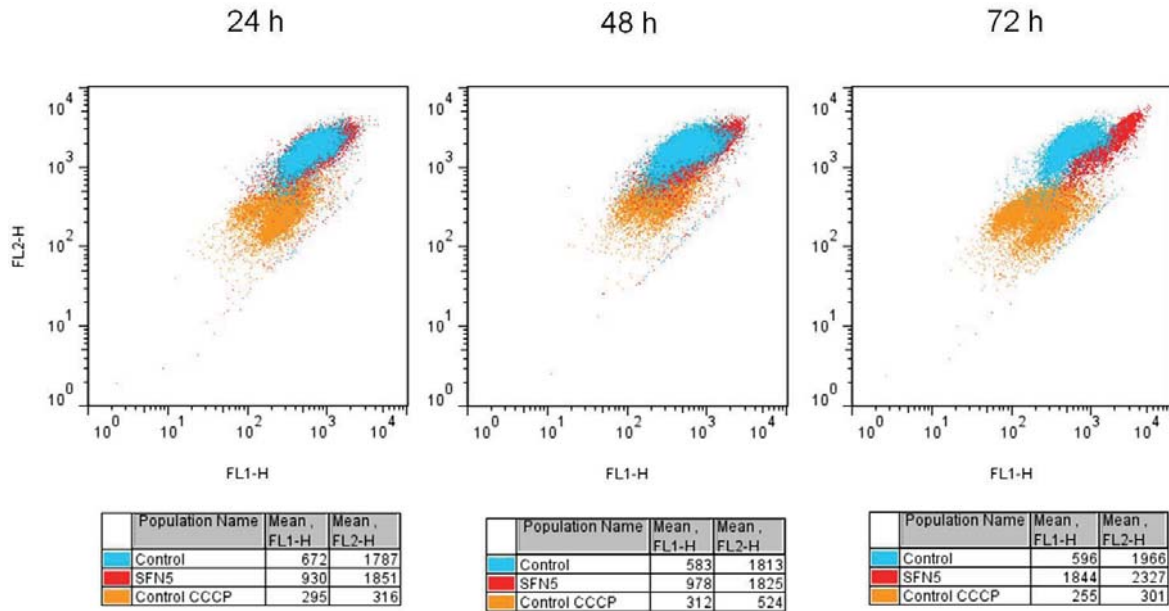
## 11.1. Figuras anexas



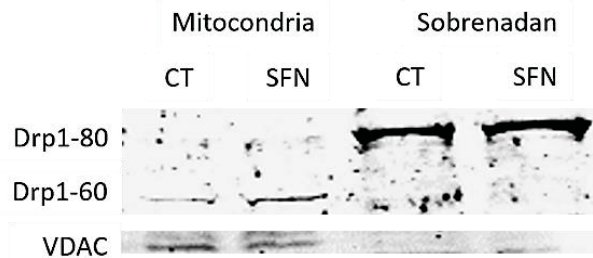
**Figura anexa 1.** Histograma representativo del análisis por citometría de flujo de la sonda MitoTracker Green FM en células LLCPK1 tratadas con SFN y sin tratamiento, con respecto al tiempo. Determinación de masa mitocondrial relativa.



**Figura anexa 2.** Histograma representativo del análisis por citometría de flujo de la sonda MitoTracker Green FM para la determinación de masa mitocondrial relativa en células PC3 tratadas con SFN y sin tratamiento, con respecto al tiempo.



**Figura anexa 3.** Diagrama de puntos representativo del análisis por citometría de flujo de la sonda JC-1 para la determinación del potencial de membrana mitocondrial en células PC3 tratadas con SFN y sin tratamiento, con respecto al tiempo.



**Figura anexa 4.** Western blot indicando dos de la isoformas de la proteína relacionada a la dinamina 1 (Drp1), la isoforma de 80 kDa (Drp1-80) y la isoforma de 60 kDa (Drp1-60). Drp1-80 se halló en la fracción citoplasmática de células PC3 tratadas con SFN y no tratadas (CT) pero no en la fracción mitocondrial. Drp1-60 sólo fue hallada en la fracción mitocondrial. Los niveles de Drp1-80 no fueron significativamente diferentes entre el CT y SFN.

## 11.2. Artículos publicados



## Review Article

# Modulation of mitochondrial functions by the indirect antioxidant sulforaphane: A seemingly contradictory dual role and an integrative hypothesis



Mario Negrette-Guzmán<sup>a</sup>, Sara Huerta-Yepez<sup>b</sup>, Edilia Tapia<sup>c</sup>, José Pedraza-Chaverri<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico City, DF, Mexico

<sup>b</sup> Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Mexico City, DF, Mexico

<sup>c</sup> Laboratorio de Patología Renal, Departamento de Nefrología, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City, DF, Mexico

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 22 May 2013

Received in revised form

21 August 2013

Accepted 22 August 2013

Available online 30 August 2013

## Keywords:

Sulforaphane

Mitochondria

Mitochondria-dependent apoptosis

Cancer cells

Cytoprotection

Mitochondrial biogenesis

Mitochondrial dynamics

Reactive oxygen species

Free radicals

## ABSTRACT

The chemotherapeutic isothiocyanate sulforaphane (SFN) was early linked to anticarcinogenic and anti-proliferative activities. Soon after, this compound, derived from cruciferous vegetables, became an excellent and useful tool for anti-cancer research in experimental models including growth tumor, metastasis, and angiogenesis. Many subsequent reports showed modifications in mitochondrial signaling, functionality, and integrity induced by SFN. When cytoprotective effects were found in toxic and ischemic insult models, seemingly contradictory behaviors of SFN were discovered: SFN was inducing deleterious changes in cancer cell mitochondria that eventually would carry the cell to death via apoptosis and also was protecting noncancer cell mitochondria against oxidative challenge, which prevented cell death. In both cases, SFN exhibited effects on mitochondrial redox balance and phase II enzyme expression, mitochondrial membrane potential, expression of the family of B cell lymphoma 2 homologs, regulation of proapoptotic proteins released from mitochondria, activation/inactivation of caspases, mitochondrial respiratory complex activities, oxygen consumption and bioenergetics, mitochondrial permeability transition pore opening, and modulation of some kinase pathways. With the ultimate findings related to the induction of mitochondrial biogenesis by SFN, it could be considered that SFN has effects on mitochondrial dynamics that explain some divergent points. In this review, we list the reports involving effects on mitochondrial modulation by SFN in anti-cancer models as well as in cytoprotective models against oxidative damage. We also attempt to integrate the data into a mechanism explaining the various effects of SFN on mitochondrial function in only one concept, taking into account mitochondrial biogenesis and dynamics and making a comparison with the theory of reactive oxygen species threshold of cell death. Our interest is to achieve a complete view of cancer and protective therapies based on SFN that can be extended to other chemotherapeutic compounds with similar characteristics. The work needed to test this hypothesis is quite extensive.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Contents

Introduction	1079
Apoptosis induction through a mitochondria-dependent pathway	1079
SFN-induced apoptosis: a p53-independent or -dependent effect?	1080
Role of kinase pathways in apoptosis activation	1080

**Abbreviations:** Bcl-2, B cell lymphoma 2; Bcl-x<sub>L</sub>, B cell lymphoma-extra large; ARE, antioxidant-response element; Cul3, cullin 3; Cyt c, cytochrome c; Drp1, dynamin-related protein 1; ERK, extracellular signal-regulated kinase; GSH, glutathione; GST, glutathione S-transferase; HIF-1, hypoxia-inducible factor-1; 4-HNE, 4-hydroxynonenal; IRL, inherent ROS level; JNK, c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase; K<sub>ATP</sub>, mitochondrial ATP-sensitive potassium channel; Keap1, Kelch-like ECH-associated protein 1;  $\Delta\psi_m$ , mitochondrial membrane potential; Mn-SOD, Mn-dependent superoxide dismutase (mitochondrial SOD); MPT, mitochondrial permeability transition; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NF- $\kappa$ B, nuclear factor  $\kappa$ B; NQO-1, NAD(P)H:quinone oxidoreductase; NRF-1, nuclear respiratory factor-1; Nrf2, nuclear factor E2-related factor 2; OMM, outer mitochondrial membrane; PGC-1, peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PKC, protein kinase C; RC, respiratory control; RL, ROS level; ROS, reactive oxygen species; SFN, sulforaphane

\* Corresponding author. Fax: +52 55 5622 3878.

E-mail address: [pedraza@unam.mx](mailto:pedraza@unam.mx) (J. Pedraza-Chaverri).



Mitochondrial metabolism and reactive oxygen species (ROS) as essential elements in SFN-induced apoptosis. . . . .	1081
Role of Nrf2 in SFN-induced apoptosis. . . . .	1082
Preservation of mitochondrial function and integrity against toxic and ischemic insult and apoptosis inhibition . . . . .	1082
Isolated mitochondria approaches . . . . .	1082
SFN now inhibits mitochondria-mediated apoptosis. . . . .	1083
Induction of mitochondrial biogenesis by SFN . . . . .	1084
A hypothesis with an integrative view. . . . .	1084
More than a hormetic biphasic behavior. . . . .	1084
The ROS threshold death perspective. . . . .	1085
Mitochondrial biogenesis and dynamics: a satisfactory answer . . . . .	1085
Conclusions . . . . .	1086
Acknowledgments. . . . .	1086
References . . . . .	1086

## Introduction

Sulforaphane (SFN), or 1-isothiocyanate-(4*R*)-(methylsulfinyl) butane (Fig. 1), is a natural compound obtained from cruciferous vegetables. In broccoli, SFN is the major inducer of phase II detoxifying enzymes and is one of the most characterized isothiocyanates [1,2]. SFN is considered an indirect antioxidant because of its potent activity as an inducer of cytoprotective proteins and its negligible scavenging capacity [3,4]. The most documented target for SFN is the Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)/nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)/antioxidant response element (ARE) signaling path (Fig. 1), a pathway that plays a significant role in protecting cells against endogenous and exogenous stresses [5,6]. However, other molecular targets have been recognized [7] (see next sections) and, at present, relationships with the Keap1/Nrf2/ARE pathway have not been established for most of them. Nrf2 is a basic leucine-zipper-like transcription factor that resides in the cytoplasm until an increase in oxidative stress causes its translocation to the nucleus. Once there, Nrf2 heterodimerizes to other basic leucine-zipper proteins (Jun and small Maf family) and binds to the *cis*-acting enhancer sequence, the ARE, present in promoters of genes that code for detoxifying proteins [6,8]. It has been proposed that the Nrf2 nuclear translocation induced by SFN could be mediated by two general mechanisms (Fig. 1): (i) disruption of the cytoplasmic association between Nrf2 and the thiol-rich repressor protein Keap1, mediated by the formation of SFN–Keap1 thionoacyl adducts that modify the Keap1 conformation and enable Nrf2 stabilization and nuclear translocation [9–11], and (ii) modulation of various kinase-mediated signaling pathways including mitogen-activated protein kinases, such as extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2, c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK), and p38, and the activation routes of phosphoinositide 3-kinase (PI3K)–protein kinase B/Akt and protein kinase C (PKC), which can directly phosphorylate Nrf2 or targets that regulate Nrf2 at other levels [12–23].

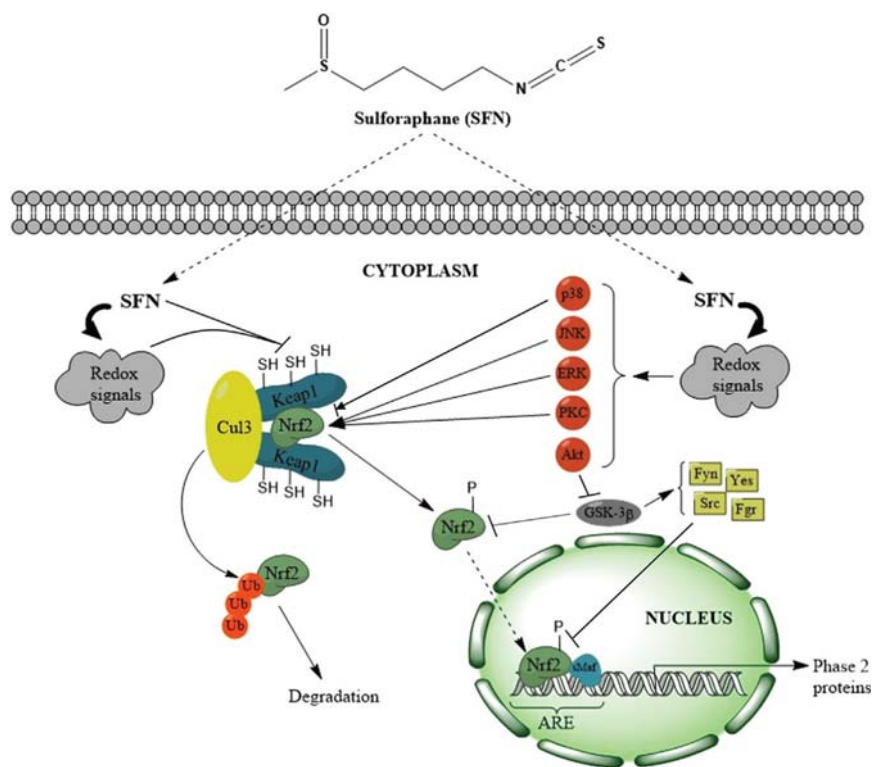
From the simplest point of view, if enzymes such as catalase or superoxide dismutase (SOD), which are in mitochondrial fractions, are regulated by Nrf2 [24–26], then an effect on mitochondrial function by SFN could be expected. In 2000, 8 years after the appearance of SFN on the investigative scene, the first work involving changes in mitochondrial parameters mediated by SFN was reported [27]. At the beginning SFN attracted much attention because of its anticarcinogenic properties mediated by inhibition of phase I and induction of phase II enzymes [28,29]. The first sightings of SFN as a modulator of mitochondrial functions were associated with its antiproliferative properties and the induction of intrinsic apoptosis in cancer cells (see Table 1). However, with the advent of numerous experimental trials in cultured cells and animals using SFN as a cytoprotective agent against oxidative

damage (as an antioxidant) [29], the mitochondrial-protective role of SFN was arising. Here, we review the reports that have implicated the biological and physiological effects of SFN in the induction of changes in mitochondrial functions and signaling, from cultured tumor cell models of cytotoxicity to animal models of cytoprotection against toxic or ischemia/reperfusion insults. We try to integrate these seemingly contradictory mitochondrial effects: those that appear damaging to the mitochondrion, making it dysfunctional and bringing the cell to an apoptotic death, and on the other side, those that seem protective, preserving the mitochondrial function when cells are exposed to mitochondria-targeted toxicants, or even that appear to increase mitochondrial activity per se.

## Apoptosis induction through a mitochondria-dependent pathway

Apoptosis is a genetically controlled form of cell death, organized into discrete signaling pathways that induce proteolytic and nucleolytic activities. Those activities drive the cell to death through a defined sequence of morphological events [30]. There are two major apoptotic pathways responding to different signals: (i) an extrinsic or death-receptor pathway, which is activated from outside the cell by ligation of transmembrane death receptors with their corresponding ligands, and (ii) an intrinsic pathway, also called the mitochondrial pathway because of the essential involvement of mitochondria. Mitochondria are not only the site where proapoptotic and antiapoptotic proteins interact and determine the cell fate, but also are the origin of signals that initiate the activation of caspases (apoptosis executioners by proteolytic cleavage of a variety of substrates) through several mechanisms [31]. The resistance of cancer cells to apoptosis can often be related to deficiencies in the intrinsic apoptosis signaling pathway [32].

Early evidence of modulation of mitochondrial functions by SFN was seen in the study of its antiproliferative properties in cancer cells. SFN induces apoptosis and cell cycle arrest in a number of tumor cell lines and inhibits tumor growth, metastasis, and angiogenesis in animal models. Some of those effects are accompanied by changes in mitochondrial features and/or in signaling pathways (Table 1). Changes have been observed in a wide range of SFN concentrations and in a variety of cancer cell types; in most of them is manifested the disruption of the mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ), one of the major markers of mitochondrial dysfunction and apoptosis. Typical features of the intrinsic apoptosis pathway were also observed: increase in the proapoptotic proteins Bcl-2 (B cell lymphoma 2)-homologous antagonist/killer (Bak) and Bcl-2-associated X protein (Bax); decrease in the antiapoptotic proteins of the Bcl-2 subfamily; release of proapoptotic factors from mitochondria to cytosol, such as cytochrome *c* (Cyt *c*),



**Fig. 1.** Structural formula of sulforaphane (SFN) and proposed mechanisms for the nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)-mediated transcriptional activation induced by SFN. SFN can induce redox signals (i.e., a moderate increase in reactive oxygen species) that act on either the Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)/Nrf2/cullin 3 (Cul3) complex or various kinases. SFN can also react with Keap1 thiol groups to form SFN–Keap1 thioacyl adducts that destabilize the cytoplasmic protein complex. In other circumstances Cul3 leads Nrf2 to ubiquitin (Ub) ligation and proteasomal degradation. Modulation of the depicted kinases by SFN has been demonstrated, but not some downstream mechanisms; however, they can be inferred from other studies of Nrf2 activation, p38 is shown to activate and inhibit Nrf2 (arrowhead with blocking line) probably because of separate effects of the different isoforms of p38 ( $\alpha$  and  $\beta$ ). c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK), extracellular signal-regulated kinase (ERK), and protein kinase C (PKC) have been proved to phosphorylate Nrf2 directly, inducing its cytoplasmic stabilization and nuclear translocation. Akt is activated by phosphoinositide 3-kinase (PI3K), which, in turn, is activated by SFN through an elusive pathway. Akt inhibits glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), which regulates Nrf2 negatively either by direct phosphorylation of Nrf2 or indirectly, phosphorylating members of the Src protein subfamily (Fyn, Yes, Src, and Fgr) that phosphorylate nuclear Nrf2, lead it to nuclear export, and induce its proteasomal degradation. Once accumulated in the nucleus, Nrf2 heterodimerizes to proteins of the small Maf (sMaf) family and binds to the antioxidant-response element (ARE), present in promoters of genes that code for detoxifying proteins.

second mitochondrial-derived activator of caspase, and apoptosis-inducing factor; activation of the initiator caspase-9 as well as increase in the apoptosis-activating factor-1; and decrease in proteins belonging to the inhibitors of apoptosis family. Nevertheless, SFN was not only reported as an intrinsic apoptosis inducer in cancer cells; the extrinsic apoptosis pathway (with caspase-8 participation) was also demonstrated in different models, concomitant or not with mitochondria-dependent pathways [33–38]. The agreement between caspase-8 activation and signals of mitochondrial pathway activation can be explained by the caspase-8-mediated cleavage of BH3-interacting-domain death agonist (Bid, a protein of the BH3-only family), which results in its inhibitory binding to Bcl-2, positive regulation of Bax/Bak, cytoplasmic release of Cyt *c*, and therefore caspase-9 activation [31,33,35,38,39].

Most of the reports that have shown mitochondria-dependent apoptosis induction by SFN have relevant aspects to be considered. In the following subsections, some of these aspects and reports are discussed.

#### SFN-induced apoptosis: a p53-independent or -dependent effect?

The tumor suppressor protein p53 is an important molecular target in cancer biology because it plays a central role in the regulation of apoptosis. More than 50% of human cancers are inactivated in p53, making cancer cells more resistant to apoptosis [40]. Normally, a fraction of p53 accumulates on mitochondria during p53-dependent apoptosis, preceding changes in  $\Delta\psi_m$ , Cyt *c*

release, and caspase-3 activation [41]. Noticeably, mutations in p53 cause downregulation of mitochondrial activity and alterations in outer mitochondrial membrane (OMM) permeabilization during apoptosis. This is due to p53 transcriptional control of synthesis of cytochrome *c* oxidase 2, required for cytochrome *c* oxidase complex assembly and thus oxygen utilization, and regulation of the BH3-only proteins expression and Bax transcription-independent activation that lead to OMM permeabilization [32,42,43]. In human leukemia and melanoma cells, SFN induced a positive effect on p53 expression with a consequent increase in Bax and decrease in Bcl-2 [44,45]. Other reports showing apoptosis induction by SFN concluded that there is no participation of p53 or that it could not be required for the SFN activity [27,46–49]. Accordingly, SFN can involve mitochondria in apoptosis through non-p53 signaling pathways, which further illustrates the versatility of this compound. Moreover, as we shall see in examples of its cytoprotective role, SFN seems to exert an effect entirely different on p53 in normal cells subjected to toxic challenges.

#### Role of kinase pathways in apoptosis activation

As mentioned above, SFN modulates several kinase signaling pathways. In some reports of SFN antiproliferative activity, the roles of kinase pathways including PI3K/Akt, rapidly accelerated fibrosarcoma/mitogen-activated ERK kinase/ERK, JNK, and p38 were determined [13,49–54]. The PI3K/Akt pathway contributes to cancer biology through the synthesis of cellular components

**Table 1**  
Mitochondria-dependent apoptosis induced by sulforaphane.

Model/cell line	[SFN] ( $\mu\text{M}$ )	Observations	Ref.
Human colon carcinoma (HT29)	15	Increased expression of Bax, release of Cyt c from mitochondria to cytosol; p53-independent effects	[27]
Human T leukemia cells (Jurkat)	30	Bax increase mediated by p53	[44]
Human prostate cancer cells (PC-3, LNCaP) and prostate cancer orthotopic model	20, 40	$\Delta\psi_m$ disruption; Bak–Bax/Bcl-2, Cyt c release; ROS generation; Apaf-1 increase; IAP family decrease; caspase-9 activation; respiratory complex activity inhibition (tumor growth and angiogenesis inhibition in mice with PI3K and ERK1/2 inhibition); NF- $\kappa$ B inhibition; no p53 participation	[47,50,57]
Metastatic medulloblastoma cells (DAOY)	10	Caspase-9 activation	[140]
Human lymphoblastoid cells	2.5–10	$\Delta\psi_m$ disruption	[100]
SV40-transformed mouse embryonic fibroblasts	20	Critical role of Bax and Bak, Cyt c and Smac/DIABLO release, caspase-9 activation	[141]
Human hepatoma cells (HepG2)	100	Bax/Bcl-2, Bcl-x <sub>L</sub> changes	[22]
Human leukemia cells (HL60)	20	$\Delta\psi_m$ disruption	[142]
Human colon cancer cells (40-16)	15	Bak–Bax/Bcl-2, Bcl-x <sub>L</sub> changes and caspase-9 activation	[48]
Human umbilical vein endothelial cells (angiogenesis model)	40	Bax/Bcl-2 changes, caspase-9 activation	[143]
Human bladder cancer cells (UM-UC-3)	15 <sup>a</sup>	$\Delta\psi_m$ disruption and caspase-9 activation	[144]
Human malignant glioblastoma (T98G, U87MG)	20, 40	Bax/Bcl-2 changes; Cyt c, AIF, and Smac/DIABLO release; IAP decrease; caspase-9 activation; no p53 participation	[46]
Human breast cancer cells (MDA-MB-468, MCF-7, T47D)	5–25	Bcl-2 decrease, Cyt c release, caspase-9 activation	[37]
Human cervical carcinoma (HeLa)	10–20	Bax/Bcl-2, Bcl-X <sub>L</sub> changes	[145]
Human leukemia cells (U937)	1–4	Bcl-2 decrease, ROS generation, $\Delta\psi_m$ disruption	[101]
Human colon carcinoma (SW620)	20	$\Delta\psi_m$ disruption, Cyt c release, caspase-9 activation (apoptosis via JNK activation non-ROS-dependent)	[51]
Salivary gland adenoid cystic carcinoma (ACC)	5–20	Bax/Bcl-2 changes, Cyt c release	[102]
Ovarian cancer cells (MDAH 2774, SkOV-3)	10	Bak/Bcl-2 changes, caspase-9 activation	[146]
Human breast cancer cells (MCF-7, MDA-MB-231)	10–20, 30	$\Delta\psi_m$ disruption, Bcl-2 decrease, role of adapter protein p66 <sup>Shc</sup>	[147,148]
Human colorectal carcinoma cells (HCT-116) with deleted p53	20	Bax/Bcl-2 changes (mediated by JNK activation), caspase-9 activation, Cyt c release, $\Delta\psi_m$ disruption; no p53 participation	[49]
Melanoma cells (B16F-10)	28.2	Bax/Bcl-2 changes mediated by p53, caspase-9 activation	[45]
Primary human multiple myeloma cells and cell lines and tumor xenograft mice model	5–20	$\Delta\psi_m$ disruption; caspase-9 activation; JNK, p38, Akt, and ERK1/2 activation (tumor growth inhibition in mice)	[52]
Human brain malignant glioma (GBM 8401) cells and tumor xenograft mouse model	12.5	$\Delta\psi_m$ disruption, caspase-9 activation, apoptosis via ERK1/2 (repression of migration and invasive ability and tumor growth inhibition in mice)	[53]
Human neuroblastoma cells (SH-SY5Y)	10–40	$\Delta\psi_m$ disruption, caspase-9 activation, apoptosis via ERK1/2 without ROS generation	[54]

*Abbreviations:* Cyt c, cytochrome c;  $\Delta\psi_m$ , mitochondrial membrane potential; ROS, reactive oxygen species; Apaf-1, apoptosis-activating factor-1; IAP, inhibitors of apoptosis; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinase 1/2; NF- $\kappa$ B, nuclear factor  $\kappa$ B; Smac, second mitochondrial-derived activator of caspase; AIF, apoptosis-inducing factor; JNK, c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase.

<sup>a</sup> Isothiocyanate extract with major activity proven for SFN.

and the regulation of growth, proliferation, migration, survival, and angiogenesis [55]. ERK1/2 stimulates DNA synthesis and activation protein-1 activity and thus stimulates cell proliferation and cell survival with the assistance of PI3K, which is indirectly activated by ERK [56]. Shankar and co-workers [50] showed that the activation (phosphorylation) of Akt and ERK1/2 was reduced in SFN-induced inhibition of orthotopically implanted PC-3 tumor in mice. Intriguingly, SFN induced cell cycle arrest and cell death via apoptosis in human colon adenocarcinoma, myeloma, malignant brain glioma, and neuroblastoma cells, apparently mediated by activation of ERK1/2 and Akt [13,52–54]. It has also been described that SFN induces apoptosis in JNK- and p38-dependent pathways [49,51,52]. This fact is not unusual because, by and large, these kinases are linked to apoptosis induction [56]. It is important to notice that, as we shall see, these signaling pathways respond differently to SFN in cytoprotective models, which is a very interesting theme to discuss.

#### Mitochondrial metabolism and reactive oxygen species (ROS) as essential elements in SFN-induced apoptosis

Another striking aspect in the induction of apoptosis by SFN is shown in the report of Xiao et al. [57], in which they set experiments with Rho-0 variants of the LNCaP and PC-3 human prostate cancer cell lines. Rho-0 cells are deficient in mitochondrial DNA (mtDNA),

which codes for 13 subunits of the mitochondrial respiratory complexes, and as a result are without, or with negligible, activity and rely solely on ATP derived from anaerobic glycolysis for survival and growth [57,58]. Interestingly, ROS generation and apoptosis induced by SFN are almost totally inhibited in Rho-0 variants of LNCaP and PC-3 cells. Nevertheless, some researchers found cancer cell death induced by SFN in a non-ROS-dependent manner [51,54]. In addition, Wiczak and colleagues [59] found that SFN inhibited protein synthesis independent of mitochondria-derived ROS, possibly contributing to apoptosis in Rho-0 variants of PC-3 cells. The decreased level of the short-lived protein survivin was associated with that effect. They also found a decrease in the glycolytic flux (without changes in ATP levels) in this cell line, a significant result in light of the ability and feature of cancer cells to increase their glycolytic metabolism and decrease the mitochondria-dependent one.

Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is a transcriptional factor linked to apoptosis resistance, angiogenesis, and metastasis. It seems to have some responsibility for the shift in pathways for cancer cell energy supply, functioning as a switch between glycolysis and oxidative phosphorylation. Maybe, this switch-like control is given at the level of pyruvate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinase 1 regulation by HIF-1 [32,60]. In various cancer cell lines, treatment with SFN inhibited HIF-1 $\alpha$  as well as some of its representative targets downstream, including proteins for angiogenesis and glucose consumption [61–63].

**Table 2**

Role of mitochondria in the protective effect of sulforaphane.

Model/physiological protective effect	[SFN] or dose	Mechanism associated with mitochondria	Ref.
Protection against oxidative cytotoxicity and prevention of ROS accumulation induced by XO/xanthine, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , and SIN-1 in rat aortic smooth muscle cells (A10)	0.5–5 μM	Protection mediated by increase in intramitochondrial GSH level and phase II enzyme level/activity	[72]
Protection against ischemia–reperfusion in Langerdorff hearts of Sprague–Dawley rats	500 μg/kg/day	Activation of K <sub>ATP</sub> channels and preservation of Mn-SOD protein levels	[73]
Protection against cisplatin-induced cytotoxicity in porcine kidney proximal tubule epithelium cells (LLC-PK1)	5 μM	Prevention of Δψ <sub>m</sub> disruption mediated by increase in phase II enzyme activity	[78]
Protection against cisplatin-induced kidney damage in Wistar rats (includes isolated mitochondria experiments)	500 μg/kg	Preservation of mitochondrial respiratory capacity and inhibition of MPT, p53 activation, and renal apoptosis	[21,78]
Prevention of mitochondrial integrity loss induced by <i>tert</i> -butylhydroperoxide in isolated mitochondria from Fischer 344 rat nonsynaptic brain	10 mg/kg	Inhibition of MPT	[81]
Protection against cisplatin-induced liver damage in Wistar rats (isolated mitochondria)	500 μg/kg/day	Preservation of mitochondrial respiratory capacity and mitochondrial phase II enzyme activity	[4]
Anticarcinogenic in Swiss albino mice treated with benzo( <i>a</i> )pyrene	9 μmol/mouse/day	Prevention/attenuation of fall in mitochondrial antioxidants, GSH redox cycle and Krebs cycle enzyme activities, mitochondrial GSH levels, and respiratory chain complex activities; benzo( <i>a</i> )pyrene-induced Bcl-2 increase and Bax expression, Cyt <i>c</i> release, caspase-3 activation, and DNA fragmentation decreases	[90,91]
Prevention of mitochondrial integrity loss induced by <i>tert</i> -butylhydroperoxide in isolated mitochondria from Fischer 344 rat liver	10 mg/kg	Inhibition of MPT and increase in mitochondrial GSH and phase II enzyme levels	[82]
Protection against unilateral ureteral obstruction-induced kidney damage in Wistar rats	0.7 mmol/kg	Prevention of renal apoptosis mediated by Bax/Bcl-2 changes, Cyt <i>c</i> release, and caspase activation	[89]
Protection against 4-HNE-induced mitochondrial dysfunction <i>ex vivo</i> in isolated mitochondria from cortical brain of CF-1 mice	1 mg/kg/day	Prevention of oxygen consumption, complex I impairment, and reduction in 4-HNE bound to mitochondrial proteins	[85]
Protection against gentamicin-induced cytotoxicity in LLC-PK1 cells	1–7.5 μM	Prevention of Δψ <sub>m</sub> disruption and apoptotic death	[87]
Protection against gentamicin-induced kidney damage in Wistar rats	1 mg/kg/day	Prevention of renal apoptosis mediated by caspase-9 activation	[87]

Abbreviations: XO, xanthine oxidase; K<sub>ATP</sub>, mitochondrial ATP-sensitive potassium channel; SIN-1, 3-morpholininosynonimine; Mn-SOD, manganese-dependent superoxide dismutase; Δψ<sub>m</sub>, mitochondrial membrane potential; MPT, mitochondrial permeability transition; Cyt *c*, cytochrome *c*; 4-HNE, 4-hydroxynonenal.

### Role of Nrf2 in SFN-induced apoptosis

It is noteworthy that most of the reports shown in Table 1 are not associated with Nrf2, the better known therapeutic target of SFN. Moreover, other authors have shown data suggesting that constitutive activation of Nrf2 confers chemoresistance and radioresistance to some cancer cell lines [64,65]. These works coincide in marking Nrf2 as an inducer of phase II enzymes and antioxidants, which attenuates the intracellular ROS level and therefore protects the cancer cell against death. This last statement could be contradictory regarding SFN's ability to induce cell death mediated by mitochondrial ROS generation (discussed in the previous section). Apparently, the effects described above in cancer cells would be Nrf2-independent; however, care must be taken with this argument because of the Nrf2 interaction with other signaling pathways. As an example, we can mention the inhibitory effect of SFN on nuclear factor κB (NF-κB), which is activated in many cancer cell lines, inhibiting apoptosis and promoting cell proliferation [47,50,66]. The effect of SFN on NF-κB could be mediated by the documented cross talk between Nrf2 (activated by SFN) and NF-κB signaling [67].

Despite reports evidencing chemoresistance induced by constitutive activation of Nrf2, there are also reports in which apoptosis induction by SFN was observed to be accompanied by an increase in Nrf2 nuclear translocation [68–70]. It is clear that a lot of information is needed to elucidate this issue.

### Preservation of mitochondrial function and integrity against toxic and ischemic insult and apoptosis inhibition

The physiological functions of mitochondria include ATP production, ROS generation and detoxification, apoptosis involvement,

cytoplasmic and mitochondrial matrix calcium regulation, metabolite synthesis and catabolism, and the transport of the organelles themselves to correct locations within the cell. Abnormality in any of these processes can be termed as mitochondrial dysfunction [71]. Table 2 shows trials involving cytoprotective effects of SFN mediated by prevention of mitochondrial dysfunction. As previously mentioned, a first fact to predict mitochondrial changes accomplished by SFN is the induction of Nrf2-responsive phase II proteins that have a mitochondrial presence. SFN induced an elevation in enzyme activity of mitochondrial SOD (Mn-SOD), catalase, and glutathione S-transferase (GST); mRNA expression of Mn-SOD; and mitochondrial glutathione (GSH) levels of rat aortic smooth muscle A10 cells. A cytoprotective effect was observed when these cells were exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and several ROS generator systems [72].

In an early *in vivo* approach, Piao and co-workers [73] reported that SFN administered to Sprague–Dawley rats had a cardioprotective effect in an ischemia–reperfusion Langendorff heart model. They showed evidence indicating activation of mitochondrial ATP-sensitive potassium (K<sub>ATP</sub>) channels by SFN as a part of the protective mechanism as well as the preservation of Mn-SOD, catalase, and heme oxygenase-1 protein levels. K<sub>ATP</sub> channels play an important role in pharmacological preconditioning that protects hearts against ischemia–reperfusion. Opening of K<sub>ATP</sub> channels is mediated by mitochondrial PKCε activation and the resulting K<sup>+</sup> influx leads to the inhibition of mitochondrial permeability transition (MPT), which is widely considered to be the cause of cell death after ischemia–reperfusion [74].

### Isolated mitochondria approaches

An advantage of working with isolated mitochondria is the control the experimenter can exert over the well-understood assay conditions. In isolated mitochondria, the mitochondrial respiratory

control (RC; the increase in respiration rate in response to ADP) index is the best general measure of mitochondrial function. The *P/O* ratio (moles of ATP synthesized per mole of oxygen) is also a classic function parameter often measured together with RC index.  $\text{Ca}^{2+}$ -induced MPT pore formation in the control of Cyt *c* release can also be determined with the appropriate approaches in isolated mitochondria [71]. As well as endoplasmic reticulum, mitochondria belong to the cellular system for regulation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  distribution and compartmentalization [30]; mitochondria can take up  $\text{Ca}^{2+}$  and retain it in the matrix in a limited way. When mitochondria sequester  $\text{Ca}^{2+}$  up to its capacity, accumulated  $\text{Ca}^{2+}$  is released, along with other matrix solutes, through a nonspecific pore in the mitochondrial inner membrane, the MPT pore, which precedes the swelling of mitochondrial matrix, rupture of OMM, and release of Cyt *c* and other proteins from the intermembrane space [39,75]. Therefore, MPT pore-induced mitochondrial dysfunction is a consequence of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload; however, it has been seen in vitro that the MPT pore is induced as a result of pseudopathological conditions of oxidative stress [75,76]. ROS production sensitizes mitochondria toward MPT induction and, in turn, increases in MPT-induced mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  can enhance ROS production [39,77], a good phenomenon for evaluating the role of an antioxidant with mitochondrial action.

Our research group was the first to set up experiments with isolated mitochondria in a model of toxic damage using SFN as a cytoprotective agent. In addition to the mitochondrial respiration parameters preserved after induction of kidney failure by cisplatin in rats, we also demonstrated that SFN inhibits the MPT pore opening. SFN prevented cisplatin-induced mitochondrial dysfunction, as it avoided the fall in mitochondrial RC, the impairment in mitochondrial ATP synthesis, the loss in mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  retention capacity (MPT pore formation), and the Cyt *c* release [78]. Similar outcomes were seen when liver mitochondrial dysfunction was induced by cisplatin and the role of SFN was evaluated [4]. Relationships between the MPT pore opening and the death phenotype were established. Rats treated with cisplatin developed acute kidney failure mediated by both necrotic and apoptotic cell death in renal proximal tubules [21,78,79] (see next subsection for mitochondria-dependent apoptosis prevention by SFN). MPT pore formation was first related to necrotic cell death observed in ischemia–reperfusion, but it has also been associated with some forms of apoptosis as a mild death stimulus that allows moderate  $\Delta\psi_m$  and ATP losses and damage in a subpopulation of mitochondria only. Apoptosis can be turned on by the proapoptotic proteins released and if the ATP levels produced by spared mitochondria are enough to activate the apoptosome [75]. Even a synergistic relationship between apoptosis and necrosis could exist through the cross-talk signaling between the MPT pore opening and the mitochondrial apoptosis-induced channel formation, enhancing the OMM permeabilization [80].

Soon after, almost simultaneous with our first experiments in isolated mitochondria, Greco and Fiskum [81] also reported inhibition of *tert*-butylhydroperoxide-induced  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent MPT pore opening in nonsynaptic brain mitochondria isolated from rats administered SFN. Thereafter, the same research group obtained similar results in rat liver mitochondria with the plus of finding an increase in some mitochondrial antioxidant levels [82]. Those findings and others observed previously gave signs about the mechanism by which SFN inhibits MPT pore opening: (i) it has been shown that toxic cell death is better correlated to a deficiency of the mitochondrial GSH pool rather than a cytoplasmic GSH depletion [39,83], (ii) it has been proposed that the MPT pore allows mitochondrial GSH release leading to ROS generation [84], (iii) SFN avoided the mitochondrial GSH depletion induced by *tert*-butylhydroperoxide that could be associated with the inhibition of

MPT pore opening, (iv) SFN also induced an increase in the mitochondrial level of proteins, such as glutathione peroxidase 1, malic enzyme 3, and thioredoxin 2, involved in the total mitochondrial peroxidase activity [82]. All of these data together could evidence that SFN inhibits the redox-sensitive MPT pore opening by attenuation of mitochondrial oxidative stress and this could be attenuated by induction of Nrf2-dependent antioxidant synthesis.

Recently, modulation of mitochondrial status by SFN in protective trials showed a novel finding when cerebral cortical mitochondria from CF-1 mice injected with SFN were exposed to 4-hydroxynonenal (4-HNE), a by-product of lipid peroxidation. After 15 min exposure, the oxygen consumption rate for complexes II and I diminished considerably in untreated mitochondria in vivo, indicating impairment of mitochondrial bioenergetics. SFN reduced significantly this impairment (only in complex I) and the 4-HNE-bound mitochondrial protein levels [85]. Information generated in this study is relevant because lipid peroxidation is a pivotal process in toxic tissue damage and its by-products can have a direct impact on respiratory machinery. In addition, a new facet in mitochondrial protection by SFN was exhibited.

#### *SFN now inhibits mitochondria-mediated apoptosis*

Cisplatin and gentamicin are drugs with known collateral effects that may be good models to test the mitochondrial protective properties of SFN. Both drugs cause mitochondrial injury, leading to cytosolic release of caspase activators and triggering the intrinsic apoptosis [86]. Additional assays in our laboratory showed that SFN averted the  $\Delta\psi_m$  collapse, ROS generation, and death in porcine renal proximal tubular LLC-PK1 cells (an accepted model to assess nephrotoxicity) exposed to cisplatin. Induction of the Nrf2-dependent enzymes NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and  $\gamma$ -glutamylcysteine ligase as well as of GSH synthesis could be responsible for this protection [78,79]. In vivo, SFN was able to prevent DNA fragmentation, an apoptosis hallmark measurable by in situ terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling and caspase-3 activation in rodent kidneys injured by cisplatin. Interestingly, it was found that this SFN-mediated protection was linked to an attenuation in cisplatin-induced activation of p38 $\alpha$ , JNK, and p53 and a counteracting of depression of p38 $\beta$  and ERK activities [21], just the opposite of the several above cancer cell instances.

Recently, we assessed the protective role of SFN against nephrotoxicity induced by gentamicin [87]. In LLC-PK1 cells, SFN prevented the apoptotic cell death and early loss of  $\Delta\psi_m$  induced by gentamicin. In renal cortex from rats cotreated with SFN and gentamicin for 4 days, the apoptotic death and caspase-9 activation (without caspase-8 participation) were significantly attenuated compared to those in gentamicin-only rats. However, an interesting question arose when an increment in 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction (a useful parameter for cell viability measurement based on mitochondrial activity of cells [88]) without an increment in the number of cells was observed in LLC-PK1 cells incubated only in SFN: does SFN promote an improvement per se in mitochondrial function rather than protect them against a toxic insult? The former investigations showed no significant changes in respiratory state or in respiratory complex activities [4,78,81]; nonetheless, further trials must be performed to explore other mitochondrial functions.

Inhibition of apoptosis via mitochondrial signaling mediated by SFN has not been found only in toxic models. In a Wistar rat model of unilateral ureteral obstruction, the treatment with SFN ameliorated the renal damage by avoiding Bax/Bcl-2 ratio augmentation, Cyt *c* release, and caspases activation, among other findings [89]. Previously, SFN-mediated changes in the Bax/Bcl-2 ratio were also shown to behave differently in cancer cells.

Back to the origins of SFN, Priya and colleagues [90,91] also found mitochondrial implications in the anticarcinogenic quality of SFN in a mouse model employing benzo(a)pyrene as a lung carcinogenesis inducer. But, some different outcomes appear when the above reports are compared: SFN attenuated falls in mitochondrial antioxidant and Krebs cycle enzyme activities, mitochondrial GSH levels, and respiratory chain complex activities. SFN also prevented increases in ROS generation, glyco-conjugate circulation, and lipid, protein, and DNA oxidative damage. Despite these findings, mitochondria-mediated apoptosis was seen to be favored by the SFN treatment as benzo(a)pyrene-induced Bcl-2 increase was blunted by SFN, as well as Bax expression, Cyt *c* release, caspase-3 activation, and DNA fragmentation. Even though the authors argued that SFN inhibits the shift in the balance of the cells toward a proliferative state caused by the carcinogenic agent through apoptosis induction, the animal organ functionality after treatment was compromised and the role of mitochondria as a “molecular clock” is not clear at all [90,91].

### Induction of mitochondrial biogenesis by SFN

Since Piantadosi and colleagues [92] reported that mitochondrial biogenesis was regulated via Nrf2, the hypothesis that SFN induced such mechanism became quite acceptable. This working group reported that the 5′ untranslated region for nuclear respiratory factor-1 (NRF-1; required for mitochondrial biogenesis) contains ARE promoter motifs for Nrf2. Indeed, nuclear translocation of Nrf2 was followed by NRF-1 induction and mitochondrial biogenesis, rescuing mice from doxorubicin-induced cardiomyopathy and lethal *Staphylococcus aureus* sepsis. Those effects were also found linked to Akt phosphorylation and accompanied by induction of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ), another stimulator of mitochondrial biogenesis [92,93].

Lately, Brose and colleagues [94] demonstrated that SFN induces mitochondrial biogenesis. An increase in mitochondrial mass and an induction of PGC-1 $\alpha$  and -1 $\beta$  in normal human fibroblasts and spinal muscular atrophy fibroblasts were obtained with SFN at low concentration (5  $\mu$ M). Even though mitochondrial biogenesis assessment could be more rigorous or require more evidence [95], certainly, this report is a starting point to investigate the role of SFN-induced mitochondrial biogenesis in cytoprotection or even in cancer cell death induction.

### A hypothesis with an integrative view

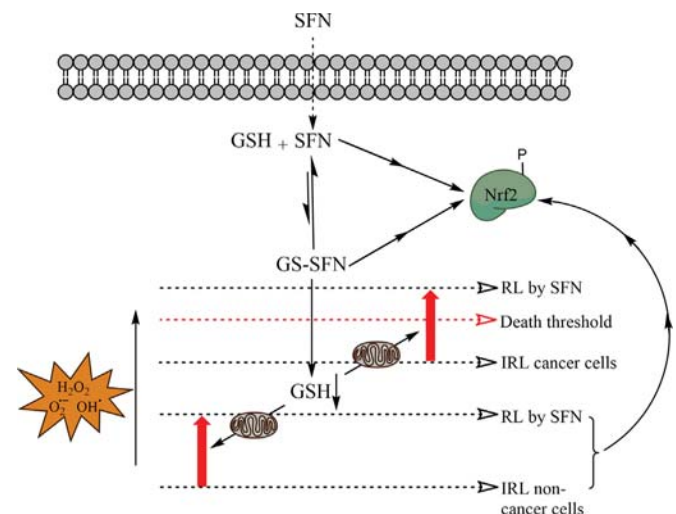
#### More than a hormetic biphasic behavior

SFN has been proposed to be a phytochemical with hormetic features because of its capacity to induce an adaptive response to a moderate stress in cells and organisms through induction of cytoprotective phase II proteins [96–98]. In addition, SFN has shown biphasic dose responses in cells. For example, Zanichelli et al. [99] showed evidence that low concentrations of SFN (0.25–5  $\mu$ M) promote human mesenchymal stem cell (noncancer cells) proliferation and protect them from apoptosis and senescence, whereas higher concentrations (20  $\mu$ M) have a cytotoxic effect that leads cells to cell cycle arrest, programmed cell death, and senescence. However, as is summarized in Table 1, SFN causes mitochondria-dependent apoptosis in various types of cancer cells in a wide range of concentrations including concentrations as low as 1–5  $\mu$ M [37,52,100–102]. In contrast, experiments in cytoprotective models involving SFN at low concentrations ( $\leq$  5  $\mu$ M) showed protection against oxidative challenges and prevention of cell viability decreases and/or cell death via apoptosis in

noncancer cells [72,79,87]. Moreover, the exposure to this concentration range of SFN yielded an increment in expression and activity of Nrf2-dependent proteins, GSH levels [72,78], and, interestingly, MTT reduction without a cell number increase [87]. This last observation could be a slight signal that SFN induces a promotion of mitochondrial functions. The fact that SFN, in the same low concentration range, induces both apoptosis via an intrinsic pathway in cancer cells and mitochondrial protection against toxic agents in noncancer cells suggests that these effects depend on the cell type more than a hormetic biphasic behavior.

Cell-specific responses at low concentrations are very important considering the SFN plasma concentrations in humans and rats after isothiocyanate/SFN-containing meal consumption. In general, total isothiocyanate, SFN, or SFN metabolite peak plasma concentrations below 2.9  $\mu$ M have been reported at 1.5–3 h post-consumption of broccoli sprouts or combinations with broccoli powder rich in glucoraphanin (glucosinolate precursor of SFN) [68,103–108]. Nevertheless, strategies such as using isothiocyanate-enriched broccoli have been proven to improve SFN bioavailability biomarkers, obtaining SFN metabolite peak concentrations of 7.8  $\mu$ M at 2 h [109]. Effects on the phase II enzyme transcriptional profile, oxidative stress biomarkers, and other targets have been reported in clinical trials involving oral administrations of broccoli sprout preparations [110–113], but little is known about the relationship between pharmacokinetics and effects on human health. Large interindividual differences can occur in the bioavailability of SFN after broccoli sprout consumption, reflecting differences in the efficacy of treatment [114]. However, there are still no reports about pharmacokinetics or effects of purified SFN administered to humans. Rat trials with purified SFN administration have shown better bioavailability parameters (SFN equivalent peak concentrations of 15.2 to 20.8  $\mu$ M at 1–4 h) associated with cytoprotective protein expression and activity profiles [115–117].

Common mechanisms producing an SFN-induced cell-specific response related to both cell death and cell survival could exist, though. Now, we shall discuss a hypothetical mechanism that would partially explain cell-specific effects with regard to ROS generation,



**Fig. 2.** Explanation of antiproliferative and cytoprotective effects induced by SFN based on the concepts of the ROS death threshold and the redox-signaling signature. The input of SFN to the cell is favored by its conjugation with GSH. SFN as well as the GS-SFN conjugate can induce the stabilization of cytoplasmic Nrf2 and its nuclear accumulation. The drop in GSH intracellular levels could lead to an increase in ROS levels that may or may not be mediated by mitochondria. In noncancer cells that have an inherent ROS level (IRL) lower than for cancer cells, this increase in ROS to a new ROS level (RL) by SFN causes just an antioxidant response through Nrf2 activation (see Fig. 1). In turn, this same ROS increase in cancer cells, which have an IRL closer to the ROS death threshold, leads them to death. This scheme is hypothetical and has not been fully demonstrated for the SFN action.

the “ROS threshold death.” Given that not all cancer cells are sensitive to ROS level changes and that cancer cells are governed by numerous signaling and metabolic abnormalities concerning mitochondria, we next intend to build a hypothesis that might explain all the observations of mitochondrial features discussed earlier.

#### *The ROS threshold death perspective*

At early minutes of SFN exposure, this is accumulated at high intracellular concentrations as a GSH-conjugated form (GS-SFN), leading to an intense reduction in cellular GSH levels [118]. The conjugation of SFN with GSH is catalyzed by GSTs, which can also catalyze the reverse dissociation reaction. The rate for such reaction is much lower than that for conjugation, so that the negative contribution of the GS-SFN dissociation to SFN cellular accumulation could be not regarded [119]. The drop in intracellular GSH might be responsible for the increase in ROS generation observed in several cancer cell death trials and some have been found to be of mitochondrial origin [50,57,101,120]. According to the ROS threshold theory, cancer cells generally have a high inherent ROS level (IRL) very close to a death-triggering threshold. In addition, tumor cells may also have an impaired antioxidant system that facilitates reaching the threshold (Fig. 2). This ROS level (RL) behind the threshold might activate, for instance, JNK kinase to activate Bax/Bak, inhibit Bcl-2/B cell lymphoma-extra large (Bcl-x<sub>L</sub>), or induce MPT pore opening that allows Cyt c release, amplifying the death signal (these features of SFN-induced cell death were reviewed above). That would not happen in normal cells, which have less ROS generation and profound antioxidant systems that make them able to absorb an increase in ROS [121]. In normal cells subjected to an oxidative challenge, this controlled ROS increase due to SFN treatment, unlike in cancer cells, would turn on a cytoprotective response (Fig. 2).

However, what about those reports of non-ROS-generation-dependent cell death induced by SFN? It has been established that ROS promote proliferation, invasiveness, angiogenesis, metastasis, and apoptosis suppression in some cancer cell lines [122]. It can be argued that for tumor cells with a moderate IRL, high enough to induce these mentioned effects but too low to reach easily the death threshold, diminishing ROS generation could be a better strategy. A decrease in RL has been reported in both antiproliferative and cytoprotective models involving SFN. Although these concepts fit very well to a fair amount of given evidence, proving them would require the establishment of an either pro-oxidant or antioxidant role for SFN related to cancer cell-specific redox status, antioxidant enzyme expression, cell signaling, and transcription factor activation profiles, parameters that together are known as the “redox signaling signature” [121].

A recent work carried out by Panieri et al. [123] showed that the mitochondrial ROS generation in lung cancer cell lines resistant to conventional chemotherapy may be insufficient to induce cytotoxicity, but when ROS generation is combined with glycolysis inhibition, then cells are sensitized to death. These facts could suggest that merely induction of ROS increase in cancer cells does not explain SFN-induced cell death successfully. Accompanying phenomena, such as the inversion of metabolism from glycolysis to oxidation or changes in other mitochondrial functions [32], could be required to realize an effective antiproliferative role in cancer cells, and there are several insights that suggest they occur.

#### *Mitochondrial biogenesis and dynamics: a satisfactory answer*

An alternative hypothesis can be proposed, considering the modulating properties of mitochondria recently recounted for SFN. Mitochondrial dynamics deal with various events such as metabolic and environmental stress, cell proliferation, and apoptosis [124–126]. For instance, it has found that the dynamin-related protein 1 (Drp1),

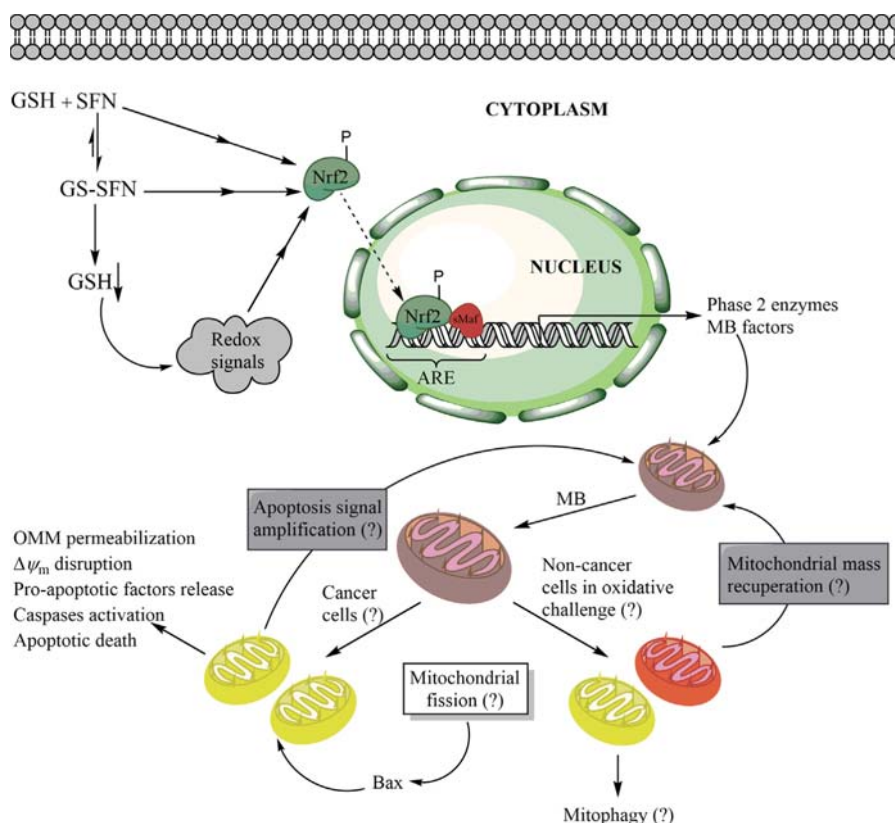
a large GTPase belonging to the dynamin superfamily, which mediates mitochondrial fission in mammals, stimulates Bax oligomerization, essential for OMM permeabilization and the ensuing release of Cyt c [127]. Inhibition of mitochondrial fission by downregulation of Drp1 and mitochondrial fission 1 protein has been shown to delay  $\Delta\psi_m$  loss and Cyt c release and make cells resistant to apoptosis. In contrast, cells depleted in optic atrophy protein 1 (required for mitochondrial fusion) were shown to be extremely sensitive to apoptosis induction [128,129].

In terms of cell stress, mitochondrial dynamics play a critical role in maintaining functional mitochondria when the cell suffers environmental or metabolic stress. Low levels of mitochondrial damage might be corrected by fusion, promoting a kind of complementation between mitochondria that allows them to share dysfunctional and functional components. But, badly damaged mitochondria will revolve their dynamics toward fission, which can start a quality control mechanism enabling the removal of damaged mitochondria (mitophagy) [126]. These perceptions were achieved through representative experiments such as those of Twig et al. [130] and Tondera et al. [131], who showed that fusion precedes fission, and fission is essential for producing metabolically different daughter mitochondria, ones with reduced  $\Delta\psi_m$ , unlikely to refuse and likely to be targeted for mitophagy, and ones that are able to fuse and adapt against stress.

Notwithstanding the previous, SFN has not been shown to be a modulator of mitochondrial dynamics. Mitochondrial biogenesis increases mitochondrial mass, whereas mitochondrial fission increases the actual number of mitochondria [125]. Intuitively, we can say that before an increase in the number of mitochondria that are going to be inherited during cell division, an event of mitochondrial biogenesis must occur. We could say the same in the case of stress-induced fission to compensate for the loss of mitochondria through mitophagy or, in the case of apoptotic cells, to generate the energy necessary for the apoptotic process (Fig. 3). Despite nothing conclusive being said about an eventual relationship between mitochondrial dynamics and biogenesis, some authors have suggested in their reviews that mitochondrial fission could be preceded by a biogenesis process [124,126]. In this context, Berman and co-workers [132] found that mitochondrial fission and fusion is regulated by Bcl-x<sub>L</sub> in neurons without favoring one or the other, but a linking between mitochondrial mass/content and elongated mitochondria was found. This same group had described an increase in mitochondrial content under a more fragmented mitochondrial morphology in axons [133].

We propose that, with or without the assistance of ROS, SFN might modulate the mitochondrial dynamics that govern the cell responses to stress and apoptosis (Fig. 3). Mitochondrial biogenesis induced by SFN could be an event concatenated to this regulation. It may be anticipated that the increase in mitochondrial components and density would lead healthy cells to an improvement in mitochondrial function and an enabling to carry out better mitochondrial quality control when they are subjected to oxidant stress. Meanwhile, in some types of cancer cells, the increase in mitochondrial mass could induce a shift in cell metabolism, inhibiting the glycolytic and its associated proliferative features and promoting the oxidative, with the consequent activation of mitochondrial tasks in cell death. For example, SFN-induced mitochondrial biogenesis could improve the cellular ability to carry out OMM permeabilization during apoptosis, which is blocked by p53 mutations (discussed above). Or, SFN could simply shift the cell metabolism by inhibiting HIF-1 and inducing mitochondrial biogenesis (also discussed above).

Otherwise seen, many cancer cells have proven alterations in mtDNA that make dysfunctional mitochondria. These mtDNA mutations have been associated with pathogenesis, apoptosis resistance, and metastasis promotion phenotypes [134–139]. An increase in dysfunctional elements of mitochondria would lead to



**Fig. 3.** Hypothesis of mitochondrial biogenesis and dynamics modulation by SFN to integrate both antiproliferative and cytoprotective effects. In noncancer cells, as well as certain kinds of cancer cells that have a good redox signaling signature and an inherent ROS level slightly away from the ROS death threshold, SFN would induce Nrf2 activation by the mechanism already reviewed. Nrf2 activates phase II protein transcription and mitochondrial biogenesis (MB) factor expression as well. Noncancer cell mitochondria subjected to an oxidative challenge by toxicants or ischemia–reperfusion would address mitochondrial fission to segregate damaged mitochondria (yellow mitochondria) and to take them to mitophagy. Then, mitochondria that pass this quality control (orange mitochondria) reestablish their density by SFN-induced MB. Otherwise, mitochondrial fission in cancer cells may generate an increase in dysfunctional mitochondria (yellow) and induce Bax oligomerization and thus outer mitochondrial membrane (OMM) permeabilization, which allows mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) disruption, proapoptotic factor release, and apoptosis progression. MB induced by SFN would augment mitochondrial mass so that the apoptosis signals would be amplified. The symbol (?) indicates hypothetical issues that should be elucidated.

higher ROS generation that could force an apoptosis program. In addition, mitochondrial biogenesis and fission may bring cells to an apoptosis signaling amplification (Fig. 3). Although most of these events have been proven, all of them together are hypothetical and have to be connected.

Finally, the connection between SFN-induced mitochondrial biogenesis and other molecular effects of SFN that have not been fully linked to Nrf2 could establish an indirect but solid relationship. Although there is no objective evidence for the mediation of Nrf2 in SFN-induced mitochondrial biogenesis, there is strong evidence in the literature suggesting it [92]. If the increase in mitochondrial components and activity explains successfully the sensitization of cancer cells to apoptosis [32], effects documented as modulation of Bcl-2 family proteins and other apoptogenic proteins could be definitively bonded to Nrf2, although indirectly. The role of Nrf2 as a master regulator in control of the cell life and death cycle may rise up and Nrf2-targeted anti-cancer cytoprotective therapies may have a new boom.

## Conclusions

Taking together all the evidence cited for either antiproliferative or cytoprotective effects induced by SFN, regulation of mitochondrial redox balance and phase II enzyme expression, control of  $\Delta\psi_m$ , changes in the family of Bcl-2 homologs, regulation of proapoptotic protein release from mitochondria, activation/inactivation of caspases,

preservation of mitochondrial respiratory complex activity, oxygen consumption and bioenergetics, regulation of MPT pore opening, modulation of some kinase pathways, and, finally, induction of mitochondrial biogenesis, it is plausible to explain all of them in an integrative way, considering SFN-induced changes in mitochondrial dynamics. Visibly, a lot of assumptions have to be demonstrated experimentally and a number of observations connected. The concepts of the ROS threshold of cell death and the redox signaling signature could be eventually integrated, thus providing a complete view of cancer and protective therapies based on SFN. Clearly, all of these principles can be applied to other chemotherapeutic compounds with similar characteristics. There is a good deal of work to do.

## Acknowledgments

This work was supported by PAPIIT (Grant IN210713) and CONACYT (Grants 167949 and 129838). We are grateful to Luis Fernando Granados-Castro and Daniela Saraí Rodríguez-Rangel for reviewing the language in the manuscript.

## References

- [1] Zhang, Y.; Talalay, P.; Cho, C. G.; Posner, G. H. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:2399–2403; 1992.
- [2] Vasanthi, H. R.; Mukherjee, S.; Das, D. K. Potential health benefits of broccoli—a chemico-biological overview. *Mini Rev. Med. Chem* **9**:749–759; 2009.



- [3] Dinkova-Kostova, A. T.; Talalay, P. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol. Nutr. Food Res.* **52**:S128–S138; 2008.
- [4] Gaona-Gaona, L.; Molina-Jijón, E.; Tapia, E.; Zazueta, C.; Hernández-Pando, R.; Calderón-Oliver, M.; Zarco-Márquez, G.; Pinzón, E.; Pedraza-Chaverri, J. Protective effect of sulforaphane pretreatment against cisplatin-induced liver and mitochondrial oxidant damage in rats. *Toxicology* **286**:20–27; 2011.
- [5] Zhang, Y.; Tang, L. Discovery and development of sulforaphane as a cancer chemopreventive phytochemical. *Acta Pharmacol. Sin.* **28**:1343–1354; 2007.
- [6] Kensler, T. W.; Wakabayashi, N.; Biswal, S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1–Nrf2–ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **47**:89–116; 2007.
- [7] Myzak, M. C.; Dashwood, R. H. Chemoprotection by sulforaphane: keep one eye beyond Keap1. *Cancer Lett.* **233**:208–218; 2006.
- [8] Vomhof-Dekrey, E. E.; Picklo Sr. M. J. The Nrf2–antioxidant response element pathway: a target for regulating energy metabolism. *J. Nutr. Biochem.* **23**:1201–1206; 2012.
- [9] Dinkova-Kostova, A. T.; Holtzclaw, W. D.; Cole, R. N.; Itoh, K.; Wakabayashi, N.; Katoh, Y.; Yamamoto, M.; Talalay, P. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:11908–11913; 2002.
- [10] Hong, F.; Freeman, M. L.; Liebler, D. C. Identification of sensor cysteines in human Keap1 modified by the cancer chemopreventive agent sulforaphane. *Chem. Res. Toxicol.* **18**:1917–1926; 2005.
- [11] Ahn, Y. H.; Hwang, Y.; Liu, H.; Wang, X. J.; Zhang, Y.; Stephenson, K. K.; Boronina, T. N.; Cole, R. N.; Dinkova-Kostova, A. T.; Talalay, P.; Cole, P. A. Electrophilic tuning of the chemoprotective natural product sulforaphane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**:9590–9595; 2010.
- [12] Yu, R.; Lei, W.; Mandelkar, S.; Weber, M. J.; Der, C. J.; Wu, J.; Kong, A. N. Role of a mitogen-activated protein kinase pathway in the induction of phase II detoxifying enzymes by chemicals. *J. Biol. Chem.* **274**:27545–27552; 1999.
- [13] Jakubiková, J.; Sedláč, J.; Mithen, R.; Bao, Y. Role of PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways in sulforaphane- and erucin-induced phase II enzymes and MRP2 transcription. *G2/M arrest and cell death in Caco-2 cells. Biochem. Pharmacol.* **69**:1543–1552; 2005.
- [14] Wang, L.; Chen, Y.; Sternberg, P.; Cai, J. Essential roles of the PI3 kinase/Akt pathway in regulating Nrf2-dependent antioxidant functions in the RPE. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **49**:1671–1678; 2008.
- [15] Rojo, A. I.; Rada, P.; Egea, J.; Rosa, A. O.; López, M. G.; Cuadrado, A. Functional interference between glycogen synthase kinase-3 beta and the transcription factor Nrf2 in protection against kainate-induced hippocampal cell death. *Mol. Cell. Neurosci.* **39**:125–132; 2008.
- [16] Shan, Y.; Wang, X.; Wang, W.; He, C.; Bao, Y. p38 MAPK plays a distinct role in sulforaphane-induced up-regulation of ARE-dependent enzymes and down-regulation of COX-2 in human bladder cancer cells. *Oncol. Rep.* **23**:1133–1138; 2010.
- [17] Huang, H. C.; Nguyen, T.; Pickett, C. B. Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:12475–12480; 2000.
- [18] Salazar, M.; Rojo, A. I.; Velasco, D. de Sagarra, R.M.; Cuadrado, A. Glycogen synthase kinase-3beta inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2. *J. Biol. Chem.* **281**:14841–14851; 2006.
- [19] Niture, S. K.; Jain, A. K.; Shelton, P. M.; Jaiswal, A. K. Src subfamily kinases regulate nuclear export and degradation of transcription factor Nrf2 to switch off Nrf2-mediated antioxidant activation of cytoprotective gene expression. *J. Biol. Chem.* **286**:28821–28832; 2011.
- [20] Keum, Y. S.; Yu, S.; Chang, P. P.; Yuan, X.; Kim, J. H.; Xu, C.; Han, J.; Agarwal, A.; Kong, A. N. Mechanism of action of sulforaphane: inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms contributing to the induction of antioxidant response element-mediated heme oxygenase-1 in human hepatoma HepG2 cells. *Cancer Res.* **66**:8804–8813; 2006.
- [21] Guerrero-Beltrán, C. E.; Mukhopadhyay, P.; Horváth, B.; Rajesh, M.; Tapia, E.; García-Torres, I.; Pedraza-Chaverri, J.; Pacher, P. Sulforaphane, a natural constituent of broccoli, prevents cell death and inflammation in nephropathy. *J. Nutr. Biochem.* **23**:494–500; 2012.
- [22] Yeh, C. T.; Yen, G. C. Effect of sulforaphane on metallothionein expression and induction of apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Carcinogenesis* **26**:2138–2148; 2005.
- [23] Jayakumar, T.; Chen, W. F.; Lu, W. J.; Chou, D. S.; Hsiao, G.; Hsu, C. Y.; Sheu, J. R.; Hsieh, C. Y. A novel antithrombotic effect of sulforaphane via activation of platelet adenylylase: ex vivo and in vivo studies. *J. Nutr. Biochem.* **24**:1086–1095; 2013.
- [24] Zamocky, M.; Furtmüller, P. G.; Obinger, C. Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxid. Redox Signaling* **10**:1527–15248; 2010.
- [25] Dhar St S. K.; Clair, D. K. Manganese superoxide dismutase regulation and cancer. *Free Radic. Biol. Med.* **52**:2209–2222; 2012.
- [26] Zhu, H.; Itoh, K.; Yamamoto, M.; Zweier, J. L.; Li, Y. Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury. *FEBS Lett* **579**:3029–3036; 2005.
- [27] Gamet-Payrastré, L.; Li, P.; Lumeau, S.; Cassar, G.; Dupont, M. A.; Chevolleau, S.; Gasc, N.; Tulliez, J.; Tercé, F. Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells. *Cancer Res.* **60**:1426–1433; 2000.
- [28] Hecht, S. S. Chemoprevention of cancer by isothiocyanates, modifiers of carcinogen metabolism. *J. Nutr.* **129**:768 S–774S; 1999.
- [29] Guerrero-Beltrán, C. E.; Calderón-Oliver, M.; Pedraza-Chaverri, J.; Chirino, Y. I. Protective effect of sulforaphane against oxidative stress: recent advances. *Exp. Toxicol. Pathol.* **64**:503–508; 2012.
- [30] Orrenius, S.; Zhivotovsky, B.; Nicotera, P. Regulation of cell death: the calcium–apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**:552–565; 2003.
- [31] Wang, C.; Youle, R. J. The role of mitochondria in apoptosis. *Annu. Rev. Genet.* **43**:95–118; 2009.
- [32] Gogvadze, V.; Zhivotovsky, B.; Orrenius, S. The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells. *Mol. Aspects Med.* **31**:60–74; 2010.
- [33] Singh, A. V.; Xiao, D.; Lew, K. L.; Dhir, R.; Singh, S. V. Sulforaphane induces caspase-mediated apoptosis in cultured PC-3 human prostate cancer cells and retards growth of PC-3 xenografts in vivo. *Carcinogenesis* **25**:83–90; 2004.
- [34] Pham, N. A.; Jacobberger, J. W.; Schimmer, A. D.; Cao, P.; Gronda, M.; Hedley, D. W. The dietary isothiocyanate sulforaphane targets pathways of apoptosis, cell cycle arrest, and oxidative stress in human pancreatic cancer cells and inhibits tumor growth in severe combined immunodeficient mice. *Mol. Cancer Ther.* **3**:1239–1248; 2004.
- [35] Singh, S. V.; Srivastava, S. K.; Choi, S.; Lew, K. L.; Antosiewicz, J.; Xiao, D.; Zeng, Y.; Watkins, S. C.; Johnson, C. S.; Trump, D. L.; Lee, Y. J.; Xiao, H.; Herman-Antosiewicz, A. Sulforaphane-induced cell death in human prostate cancer cells is initiated by reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* **280**:19911–19924; 2005.
- [36] Tang, L.; Zhang, Y. Mitochondria are the primary target in isothiocyanate-induced apoptosis in human bladder cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **4**:1250–1259; 2008.
- [37] Pledge-Tracy, A.; Sobolewski, M. D.; Davidson, N. E. Sulforaphane induces cell type-specific apoptosis in human breast cancer cell lines. *Mol. Cancer Ther.* **6**:1013–1021; 2007.
- [38] Chen, M. J.; Tang, W. Y.; Hsu, C. W.; Tsai, Y. T.; Wu, J. F.; Lin, C. W.; Cheng, Y. M.; Hsu, Y. C. Apoptosis induction in primary human colorectal cancer cell lines and retarded tumor growth in SCID mice by sulforaphane. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* **2012**:415231; 2012.
- [39] Orrenius, S. Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug Metab. Rev.* **39**:443–455; 2007.
- [40] Estaguer, J.; Vallette, F.; Vayssiere, J. L.; Mignotte, B. The mitochondrial pathways of apoptosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **942**:157–183; 2012.
- [41] Marchenko, N. D.; Zaika, A.; Moll, U. M. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria: a potential role in apoptotic signaling. *J. Biol. Chem.* **275**:16202–16212; 2000.
- [42] Chipuk, J. E.; Kuwana, T.; Bouchier-Hayes, L.; Droin, N. M.; Newmeyer, D. D.; Schuler, M.; Green, D. R. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* **303**:1010–1014; 2004.
- [43] Matoba, S.; Kang, J. G.; Patino, W. D.; Wragg, A.; Boehm, M.; Gavrilova, O.; Hurley, P. J.; Bunz, F.; Hwang, P. M. p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* **312**:1650–1653; 2006.
- [44] Fimognari, C.; Nüsse, M.; Cesari, R.; Iori, R.; Cantelli-Forti, G.; Hrelia, P. Growth inhibition, cell-cycle arrest and apoptosis in human T-cell leukemia by the isothiocyanate sulforaphane. *Carcinogenesis* **23**:581–586; 2002.
- [45] Hamsa, T. P.; Thejass, P.; Kuttan, G. Induction of apoptosis by sulforaphane in highly metastatic B16F-10 melanoma cells. *Drug Chem. Toxicol.* **34**:332–340; 2011.
- [46] Karmakar, S.; Weinberg, M. S.; Banik, N. L.; Patel, S. J.; Ray, S. K. Activation of multiple molecular mechanisms for apoptosis in human malignant glioblastoma T98G and U87MG cells treated with sulforaphane. *Neuroscience* **141**:1265–1280; 2006.
- [47] Choi, S.; Lew, K. L.; Xiao, H.; Herman-Antosiewicz, A.; Xiao, D.; Brown, C. K.; Singh, S. V. D,L-Sulforaphane-induced cell death in human prostate cancer cells is regulated by inhibitor of apoptosis family proteins and Apaf-1. *Carcinogenesis* **28**:151–162; 2007.
- [48] Pappa, G.; Lichtenberg, M.; Iori, R.; Barillari, J.; Bartsch, H.; Gerhäuser, C. Comparison of growth inhibition profiles and mechanisms of apoptosis induction in human colon cancer cell lines by isothiocyanates and indoles from Brassicaceae. *Mutat. Res.* **599**:76–87; 2006.
- [49] Rudolf, E.; Cervinka, M. Sulforaphane induces cytotoxicity and lysosome- and mitochondria-dependent cell death in colon cancer cells with deleted p53. *Toxicol. In Vitro* **25**:1302–1309; 2011.
- [50] Shankar, S.; Ganapathy, S.; Srivastava, R. K. Sulforaphane enhances the therapeutic potential of TRAIL in prostate cancer orthotopic model through regulation of apoptosis, metastasis, and angiogenesis. *Clin. Cancer Res.* **14**:6855–6866; 2008.
- [51] Rudolf, E.; Andelová, H.; Cervinka, M. Activation of several concurrent proapoptotic pathways by sulforaphane in human colon cancer cells SW620. *Food Chem. Toxicol.* **47**:2366–23673; 2009.
- [52] Jakubiková, J.; Cervi, D.; Ooi, M.; Kim, K.; Nahar, S.; Klippel, S.; Cholujo, D.; Leiba, M.; Daley, J. F.; Delmore, J.; Negri, J.; Blotta, S.; McMillin, D. W.; Hideshima, T.; Richardson, P. G.; Sedláč, J.; Anderson, K. C.; Mitsiades, C. S. Anti-tumor activity and signaling events triggered by the isothiocyanates, sulforaphane and phenethyl isothiocyanate, in multiple myeloma. *Haematologica* **96**:1170–1179; 2011.
- [53] Huang, T. Y.; Chang, W. C.; Wang, M. Y.; Yang, Y. R.; Hsu, Y. C. Effect of sulforaphane on growth inhibition in human brain malignant glioma GBM

- 8401 cells by means of mitochondrial- and MEK/ERK-mediated apoptosis pathway. *Cell Biochem. Biophys.* **63**:247–259; 2012.
- [54] Hsu, Y. C.; Chang, S. J.; Wang, M. Y.; Chen, Y. L.; Huang, T. Y. Growth inhibition and apoptosis of neuroblastoma cells through ROS-independent MEK/ERK activation by sulforaphane. *Cell Biochem. Biophys.* **66**:765–774; 2013.
- [55] Willems, L.; Tamburini, J.; Chapuis, N.; Lacombe, C.; Mayeux, P.; Bouscary, D. PI3K and mTOR signaling pathways in cancer: new data on targeted therapies. *Curr. Oncol. Rep.* **14**:129–138; 2012.
- [56] Chang, L.; Karin, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**:37–40; 2001.
- [57] Xiao, D.; Powolny, A. A.; Antosiewicz, J.; Hahm, E. R.; Bommareddy, A.; Zeng, Y.; Desai, D.; Amin, S.; Herman-Antosiewicz, A.; Singh, S. V. Cellular responses to cancer chemopreventive agent D,L-sulforaphane in human prostate cancer cells are initiated by mitochondrial reactive oxygen species. *Pharm. Res.* **26**:1729–1738; 2009.
- [58] Chandel, N. S.; Schumacker, P. T. Cells depleted of mitochondrial DNA (rho0) yield insight into physiological mechanisms. *FEBS Lett.* **454**:173–176; 1999.
- [59] Wiczak, A.; Hofman, D.; Konopa, G.; Herman-Antosiewicz, A. Sulforaphane, a cruciferous vegetable-derived isothiocyanate, inhibits protein synthesis in human prostate cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1823**:1295–1305; 2012.
- [60] Scatena, R. Mitochondria and cancer: a growing role in apoptosis, cancer cell metabolism and dedifferentiation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **942**:287–308; 2012.
- [61] Bertl, E.; Bartsch, H.; Gerhäuser, C. Inhibition of angiogenesis and endothelial cell functions are novel sulforaphane-mediated mechanisms in chemoprevention. *Mol. Cancer Ther.* **5**:575–585; 2006.
- [62] Yao, H.; Wang, H.; Zhang, Z.; Jiang, B. H.; Luo, J.; Shi, X. Sulforaphane inhibited expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in human tongue squamous cancer cells and prostate cancer cells. *Int. J. Cancer.* **123**:1255–1261; 2008.
- [63] Jeon, Y. K.; Yoo, D. R.; Jang, Y. H.; Jang, S. Y.; Nam, M. J. Sulforaphane induces apoptosis in human hepatic cancer cells through inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase4, mediated by hypoxia inducible factor-1-dependent pathway. *Biochim. Biophys. Acta* **1814**:1340–1348; 2011.
- [64] Shibata, T.; Kokubu, A.; Gotoh, M.; Ojima, H.; Ohta, T.; Yamamoto, M.; Hirohashi, S. Genetic alteration of Keap1 confers constitutive Nrf2 activation and resistance to chemotherapy in gallbladder cancer. *Gastroenterology* **135**:1358–1368; 2008.
- [65] Zhang, P.; Singh, A.; Yegnasubramanian, S.; Esopi, D.; Kombairaju, P.; Bodas, M.; Wu, H.; Bova, S. G.; Biswal, S. Loss of Kelch-like ECH-associated protein 1 function in prostate cancer cells causes chemoresistance and radioresistance and promotes tumor growth. *Mol. Cancer Ther.* **9**:336–346; 2010.
- [66] Dutta, J.; Fan, Y.; Gupta, N.; Fan, G.; Gélinas, C. Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB. *Oncogene* **25**:6800–6816; 2006.
- [67] Wakabayashi, N.; Slocum, S. L.; Skoko, J. J.; Shin, S.; Kensler, T. W. When NRF2 talks, who's listening? Antioxid *Redox Signaling* **13**:1649–1663; 2010.
- [68] Keum, Y. S.; Khor, T. O.; Lin, W.; Shen, G.; Kwon, K. H.; Barve, A.; Li, W.; Kong, A. N. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of broccoli sprouts on the suppression of prostate cancer in transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP) mice: implication of induction of Nrf2, HO-1 and apoptosis and the suppression of Akt-dependent kinase pathway. *Pharm. Res.* **26**:2324–2331; 2009.
- [69] Kombairaju, P.; Ma, J.; Thimmulappa, R. K.; Yan, S. G.; Gabrielson, E.; Singh, A.; Biswal, S. Prolonged sulforaphane treatment does not enhance tumorigenesis in oncogenic K-ras and xenograft mouse models of lung cancer. *J. Carcinog* **11**:8; 2012.
- [70] Hu, K.; Qi, Y. J.; Zhao, J.; Jiang, H. F.; Chen, X.; Ren, J. Synthesis and biological evaluation of sulforaphane derivatives as potential antitumor agents. *Eur. J. Med. Chem.* **64**:529–539; 2013.
- [71] Brand, M. D.; Nicholls, D. G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem. J.* **435**:297–312; 2011.
- [72] Zhu, H.; Jia, Z.; Strobl, J. S.; Ehrlich, M.; Misra, H. P.; Li, Y. Potent induction of total cellular and mitochondrial antioxidants and phase 2 enzymes by cruciferous sulforaphane in rat aortic smooth muscle cells: cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. *Cardiovasc. Toxicol.* **8**:115–125; 2008.
- [73] Piao, C. S.; Gao, S.; Lee, G. H.; do, K. i. m.; Park, S.; Chae, B. H.; Chae, S. W.; Kim, H. J. S.H. Sulforaphane protects ischemic injury of hearts through antioxidant pathway and mitochondrial K(ATP) channels. *Pharmacol. Res.* **61**:342–348; 2010.
- [74] Garlid, K. D.; Costa, A. D.; Quinlan, C. L.; Pierre, S. V.; Dos Santos, P. Cardioprotective signaling to mitochondria. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **46**:858–866; 2009.
- [75] Martinou, J. C.; Green, D. R. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**:63–67; 2001.
- [76] Crompton, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* **341**:233–249; 1999.
- [77] Rasola, A.; Bernardi, P. Mitochondrial permeability transition in Ca(2+)-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium* **50**:222–233; 2011.
- [78] Guerrero-Beltrán, C. E.; Calderón-Oliver, M.; Martínez-Abundis, E.; Tapia, E.; Zarco-Márquez, G.; Zazueta, C.; Pedraza-Chaverri, J. Protective effect of sulforaphane against cisplatin-induced mitochondrial alterations and impairment in the activity of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and  $\gamma$  glutamyl cysteine ligase: studies in mitochondria isolated from rat kidney and in LLC-PK1 cells. *Toxicol. Lett.* **199**:80–92; 2010.
- [79] Guerrero-Beltrán, C. E.; Calderón-Oliver, M.; Tapia, E.; Medina-Campos, O. N.; Sánchez-González, D. J.; Martínez-Martínez, C. M.; Ortiz-Vega, K. M.; Franco, M.; Pedraza-Chaverri, J. Sulforaphane protects against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Toxicol. Lett.* **192**:278–285; 2010.
- [80] Kinnally, K. W.; Peixoto, P. M.; Ryu, S. Y.; Dejean, L. M. Is mPTP the gatekeeper for necrosis, apoptosis, or both? *Biochim. Biophys. Acta* **1813**:616–622; 2011.
- [81] Greco, T.; Fiskum, G. Brain mitochondria from rats treated with sulforaphane are resistant to redox-regulated permeability transition. *J. Bioenerg. Biomembr.* **42**:491–497; 2010.
- [82] Greco, T.; Shafer, J.; Fiskum, G. Sulforaphane inhibits mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **51**:2164–21671; 2011.
- [83] Meredith, M. J.; Reed, D. J. Depletion in vitro of mitochondrial glutathione in rat hepatocytes and enhancement of lipid peroxidation by adriamycin and 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU). *Biochem. Pharmacol.* **32**:1383–1388; 1983.
- [84] Gunter, T. E.; Sheu, S. S. Characteristics and possible functions of mitochondrial Ca(2+) transport mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* **1787**:1291–1308; 2009.
- [85] Miller, D. M.; Singh, I. N.; Wang, J. A.; Hall, E. D. Administration of the Nrf2-Are activators sulforaphane and carnosic acid attenuates 4-hydroxy-2-nonenal-induced mitochondrial dysfunction ex vivo. *Free Radic. Biol. Med.* **57**:1–9; 2013.
- [86] Servais, H.; Ortiz, A.; Devuyt, O.; Denamur, S.; Tulkens, P. M.; Mingeot-Leclercq, M. P. Renal cell apoptosis induced by nephrotoxic drugs: cellular and molecular mechanisms and potential approaches to modulation. *Apoptosis* **13**:11–32; 2008.
- [87] Negrette-Guzmán, M.; Huerta-Yepez, S.; Medina-Campos, O. N.; Zatarain-Barrón, Z. L.; Hernández-Pando, R.; Torres, I.; Tapia, E.; Pedraza-Chaverri, J. Sulforaphane attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity: role of mitochondrial protection. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2013**:135314; 2013.
- [88] Sumantran, V. N. Cellular chemosensitivity assays: an overview. *Methods Mol. Biol.* **731**:219–236; 2011.
- [89] Chung, S. D.; Lai, T. Y.; Chien, C. T.; Yu, H. J. Activating Nrf-2 signaling depresses unilateral ureteral obstruction-evoked mitochondrial stress-related autophagy, apoptosis and pyroptosis in kidney. *PLoS One.* *e47299*; 2012.
- [90] Priya, D. K.; Gayathri, R.; Gunassekaran, G. R.; Sakthisekaran, D. Protective role of sulforaphane against oxidative stress mediated mitochondrial dysfunction induced by benzo(a)pyrene in female Swiss albino mice. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **24**:110–117; 2011.
- [91] Kalpana Deepa, P. D.; Gayathri, R.; Gunassekaran, G. R.; Murugan, S.; Sakthisekaran, D. Apoptotic role of natural isothiocyanate from broccoli (*Brassica oleracea italica*) in experimental chemical lung carcinogenesis. *Pharm. Biol.* **51**:621–628; 2013.
- [92] Piantadosi, C. A.; Carraway, M. S.; Babiker, A.; Suliman, H. B. Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1. *Circ. Res.* **103**:1232–1240; 2008.
- [93] MacGarvey, N. C.; Suliman, H. B.; Bartz, R. R.; Fu, P.; Withers, C. M.; Welty-Wolf, K. E.; Piantadosi, C. A. Activation of mitochondrial biogenesis by heme oxygenase-1-mediated NF-E2-related factor-2 induction rescues mice from lethal *Staphylococcus aureus* sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **185**:851–861; 2012.
- [94] Brose, R. D.; Shin, G.; McGuinness, M. C.; Schneidereith, T.; Purvis, S.; Dong, G. X.; Keefer, J.; Spencer, F.; Smith, K. D. Activation of the stress proteome as a mechanism for small molecule therapeutics. *Hum. Mol. Genet.* **21**:4237–4252; 2012.
- [95] Miller, B. F.; Hamilton, K. L. A perspective on the determination of mitochondrial biogenesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **302**:E496–E499; 2012.
- [96] Mattson, M. P. Dietary factors, hormesis and health. *Ageing Res. Rev.* **7**:43–48; 2008.
- [97] Mattson, M. P. Hormesis defined. *Ageing Res. Rev.* **7**:1–7; 2008.
- [98] Calabrese, V.; Cornelius, C.; Dinkova-Kostova, A. T.; Iavicoli, I.; Di Paola, R.; Koverech, A.; Cuzzocrea, S.; Rizzarelli, E.; Calabrese, E. J. Cellular stress responses, hormetic phytochemicals and vitamins in aging and longevity. *Biochim. Biophys. Acta* **1822**:753–783; 2012.
- [99] Zanichelli, F.; Capasso, S.; Cipollaro, M.; Pagnotta, E.; Carteni, M.; Casale, F.; Iori, R.; Galderisi, U. Dose-dependent effects of R-sulforaphane isothiocyanate on the biology of human mesenchymal stem cells: at dietary amounts, it promotes cell proliferation and reduces senescence and apoptosis, while at anti-cancer drug doses, it has a cytotoxic effect. *Age (Dordrecht)* **34**:281–293; 2012.
- [100] Misiewicz, I.; Skupińska, K.; Kowalska, E.; Lubiński, J.; Kasprzycka-Guttman, T. Sulforaphane-mediated induction of a phase 2 detoxifying enzyme NAD(P)H:quinone reductase and apoptosis in human lymphoblastoid cells. *Acta Biochim. Pol.* **51**:711–721; 2004.
- [101] Choi, W. Y.; Choi, B. T.; Lee, W. H.; Choi, Y. H. Sulforaphane generates reactive oxygen species leading to mitochondrial perturbation for apoptosis in human leukemia U937 cells. *Biomed. Pharmacother.* **62**:637–644; 2008.
- [102] Chu, W. F.; Wu, D. M.; Liu, W.; Wu, L. J.; Li, D. Z.; Xu, D. Y.; Wang, X. F. Sulforaphane induces G2-M arrest and apoptosis in high metastasis cell line of salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Oral Oncol.* **45**:998–1004; 2009.

- [103] Vermeulen, M.; Klöpping-Ketelaars, I. W.; van den Berg, R.; Vaes, W. H. Bioavailability and kinetics of sulforaphane in humans after consumption of cooked versus raw broccoli. *J. Agric. Food Chem.* **56**:10505–10509; 2008.
- [104] Conaway, C. C.; Getahun, S. M.; Liebes, L. L.; Pusateri, D. J.; Topham, D. K.; Botero-Omary, M.; Chung, F. L. Disposition of glucosinolates and sulforaphane in humans after ingestion of steamed and fresh broccoli. *Nutr. Cancer* **38**:168–178; 2000.
- [105] Cramer, J. M.; Jeffery, E. H. Sulforaphane absorption and excretion following ingestion of a semi-purified broccoli powder rich in glucoraphanin and broccoli sprouts in healthy men. *Nutr. Cancer* **63**:196–201; 2011.
- [106] Clarke, J. D.; Hsu, A.; Riedl, K.; Bella, D.; Schwartz, S. J.; Stevens, J. F.; Ho, E. Bioavailability and inter-conversion of sulforaphane and erucin in human subjects consuming broccoli sprouts or broccoli supplement in a cross-over study design. *Pharmacol. Res.* **64**:456–463; 2011.
- [107] Cramer, J. M.; Teran-Garcia, M.; Jeffery, E. H. Enhancing sulforaphane absorption and excretion in healthy men through the combined consumption of fresh broccoli sprouts and a glucoraphanin-rich powder. *Br. J. Nutr.* **13**:1–6; 2011.
- [108] Saha, S.; Hollands, W.; Teucher, B.; Needs, P. W.; Narbad, A.; Ortori, C. A.; Barrett, D. A.; Rossiter, J. T.; Mithen, R. F.; Kroon, P. A. Isothiocyanate concentrations and interconversion of sulforaphane to erucin in human subjects after consumption of commercial frozen broccoli compared to fresh broccoli. *Mol. Nutr. Food Res.* **56**:1906–1916; 2012.
- [109] Gasper, A. V.; Al-Janobi, A.; Smith, J. A.; Bacon, J. R.; Fortun, P.; Atherton, C.; Taylor, M. A.; Hawkey, C. J.; Barrett, D. A.; Mithen, R. F. Glutathione S-transferase M1 polymorphism and metabolism of sulforaphane from standard and high-glucosinolate broccoli. *Am. J. Clin. Nutr.* **82**:1283–1291; 2005.
- [110] Murashima, M.; Watanabe, S.; Zhuo, X. G.; Uehara, M.; Kurashige, A. Phase I study of multiple biomarkers for metabolism and oxidative stress after one-week intake of broccoli sprouts. *Biofactors* **22**:271–275; 2004.
- [111] Traka, M.; Gasper, A. V.; Melchini, A.; Bacon, J. R.; Needs, P. W.; Frost, V.; Chantry, A.; Jones, A. M.; Ortori, C. A.; Barrett, D. A.; Ball, R. Y.; Mills, R. D.; Mithen, R. F. Broccoli consumption interacts with GSTM1 to perturb oncogenic signalling pathways in the prostate. *PLoS One.* **e2568**; 2008.
- [112] Navarro, S. L.; Chang, J. L.; Peterson, S.; Chen, C.; King, I. B.; Schwarz, Y.; Li, S. S.; Li, L.; Potter, J. D.; Lampe, J. W. Modulation of human serum glutathione S-transferase A1/2 concentration by cruciferous vegetables in a controlled feeding study is influenced by GSTM1 and GSTT1 genotypes. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **18**:2974–2978; 2009.
- [113] Riedl, M. A.; Saxon, A.; Diaz-Sanchez, D. Oral sulforaphane increases Phase II antioxidant enzymes in the human upper airway. *Clin. Immunol.* **130**:244–251; 2009.
- [114] Kensler, T. W.; Chen, J. G.; Egner, P. A.; Fahey, J. W.; Jacobson, L. P.; Stephenson, K. K.; Ye, L.; Coady, J. L.; Wang, J. B.; Wu, Y.; Sun, Y.; Zhang, Q. N.; Zhang, B. C.; Zhu, Y. R.; Qian, G. S.; Carmella, S. G.; Hecht, S. S.; Benning, L.; Gange, S. J.; Groopman, J. D.; Talalay, P. Effects of glucosinolate-rich broccoli sprouts on urinary levels of aflatoxin–DNA adducts and phenanthrene tetraols in a randomized clinical trial in He Zuo township, Qidong, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **14**:2605–2613; 2005.
- [115] Hu, R.; Hebbbar, V.; Kim, B. R.; Chen, C.; Winnik, B.; Buckley, B.; Soteropoulos, P.; Tolia, P.; Hart, R. P.; Kong, A. N. In vivo pharmacokinetics and regulation of gene expression profiles by isothiocyanate sulforaphane in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **310**:263–271; 2004.
- [116] Wang, H.; Lin, W.; Shen, G.; Khor, T. O.; Nomeir, A. A.; Kong, A. N. Development and validation of an LC–MS–MS method for the simultaneous determination of sulforaphane and its metabolites in rat plasma and its application in pharmacokinetic studies. *J. Chromatogr. Sci.* **49**:801–806; 2011.
- [117] Veeranki, O. L.; Bhattacharya, A.; Marshall, J. R.; Zhang, Y. Organ-specific exposure and response to sulforaphane, a key chemopreventive ingredient in broccoli: implications for cancer prevention. *Br. J. Nutr.* **109**:25–32; 2013.
- [118] Zhang, Y. Role of glutathione in the accumulation of anticarcinogenic isothiocyanates and their glutathione conjugates by murine hepatoma cells. *Carcinogenesis* **21**:1175–1182; 2000.
- [119] Zhang, Y.; Kolm, R. H.; Mannervik, B.; Talalay, P. Reversible conjugation of isothiocyanates with glutathione catalyzed by human glutathione transferases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **206**:748–755; 1995.
- [120] Cho, S. D.; Li, G.; Hu, H.; Jiang, C.; Kang, K. S.; Lee, Y. S.; Kim, S. H.; Lu, J. Involvement of c-Jun N-terminal kinase in G2/M arrest and caspase-mediated apoptosis induced by sulforaphane in DU145 prostate cancer cells. *Nutr. Cancer.* **52**:213–224; 2005.
- [121] Wang, J.; Yi, J. Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. *Cancer Biol. Ther.* **7**:1875–1884; 2008.
- [122] Halliwell, B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J.* **401**:1–11; 2007.
- [123] Panieri, E.; Gogvadze, V.; Norberg, E.; Venkatesh, R.; Orrenius, S.; Zhivotovskiy, B. Reactive oxygen species generated in different compartments induce cell death, survival, or senescence. *Free Radic. Biol. Med.* **57**:176–187; 2013.
- [124] Westermann, B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**:872–884; 2010.
- [125] Antico Arciuch, V. G.; Elguero, M. E.; Poderoso, J. J.; Carreras, M. C. Mitochondrial regulation of cell cycle and proliferation. *Antioxid. Redox Signaling* **16**:1150–1180; 2012.
- [126] Youle, R. J.; van der Bliek, A. M. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* **377**:1062–1065; 2012.
- [127] Montessuit, S.; Somasekharan, S. P.; Terrones, O.; Lucken-Ardjomande, S.; Herzig, S.; Schwarzenbacher, R.; Manstein, D. J.; Bossy-Wetzel, E.; Basañez, G.; Meda, P.; Martinou, J. C. Membrane remodeling induced by the dynamin-related protein Drp1 stimulates Bax oligomerization. *Cell* **142**:889–901; 2010.
- [128] Frank, S.; Gaume, B.; Bergmann-Leitner, E. S.; Leitner, W. W.; Robert, E. G.; Gatz, F.; Smith, C. L.; Youle, R. J. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev. Cell* **1**:515–525; 2001.
- [129] Lee, Y. J.; Jeong, S. Y.; Karbowski, M.; Smith, C. L.; Youle, R. J. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol. Biol. Cell* **15**:5001–5011; 2004.
- [130] Twig, G.; Elorza, A.; Molina, A. J.; Mohamed, H.; Wikstrom, J. D.; Walzer, G.; Stiles, L.; Haigh, S. E.; Katz, S.; Las, G.; Alroy, J.; Wu, M.; Py, B. F.; Yuan, J.; Deeney, J. T.; Corkey, B. E.; Shirihai, O. S. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* **27**:433–446; 2008.
- [131] Tondera, D.; Grandemange, S.; Jourdain, A.; Karbowski, M.; Mattenberger, Y.; Herzig, S.; Da Cruz, S.; Clerc, P.; Raschke, I.; Merkwirth, C.; Ehses, S.; Krause, F.; Chan, D. C.; Alexander, C.; Bauer, C.; Youle, R.; Langer, T.; Martinou, J. C. SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J.* **8**:1589–1600; 2009.
- [132] Berman, S. B.; Chen, Y. B.; Qi, B.; McCaffery, J. M.; Rucker 3rd E. B.; Goebbels, S.; Nave, K. A.; Arnold, B. A.; Jonas, E. A.; Pineda, F. J.; Hardwick, J. M. Bcl-xL increases mitochondrial fission, fusion, and biomass in neurons. *J. Cell Biol.* **184**:707–719; 2009.
- [133] Li, H.; Chen, Y.; Jones, A. F.; Sanger, R. H.; Collis, L. P.; Flannery, R.; McNay, E. C.; Yu, T.; Schwarzenbacher, R.; Bossy, B.; Bossy-Wetzel, E.; Bennett, M. V.; Pypaert, M.; Hickman, J. A.; Smith, P. J.; Hardwick, J. M.; Jonas, E. A. Bcl-xL induces Drp1-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**:2169–2174; 2008.
- [134] Radpour, R.; Fan, A. X.; Kohler, C.; Holzgrevé, W.; Zhong, X. Y. Current understanding of mitochondrial DNA in breast cancer. *Breast J.* **15**:505–509; 2009.
- [135] Tseng, L. M.; Yin, P. H.; Yang, C. W.; Tsai, Y. F.; Hsu, C. Y.; Chi, C. W.; Lee, H. C. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human breast cancers. *Genes Chromosomes Cancer* **50**:800–811; 2011.
- [136] Imanishi, H.; Hattori, K.; Wada, R.; Ishikawa, K.; Fukuda, S.; Takenaga, K.; Nakada, K.; Hayashi, J.; Mitochondrial, D. N. A. mutations regulate metastasis of human breast cancer cells. *PLoS One.* **e23401**; 2011.
- [137] Kulawiec, M.; Owens, K. M.; Singh, K. K. Cancer cell mitochondria confer apoptosis resistance and promote metastasis. *Cancer Biol. Ther.* **8**:1378–1385; 2009.
- [138] Kanematsu, S.; Yoshizawa, K.; Uehara, N.; Miki, H.; Sasaki, T.; Kuro, M.; Lai, Y. C.; Kimura, A.; Yuri, T.; Tsubura, A. Sulforaphane inhibits the growth of KPL-1 human breast cancer cells in vitro and suppresses the growth and metastasis of orthotopically transplanted KPL-1 cells in female athymic mice. *Oncol. Rep.* **26**:603–608; 2011.
- [139] Ye, C.; Shu, X. O.; Pierce, L.; Wen, W.; Courtney, R.; Gao, Y. T.; Zheng, W.; Cai, Q. Mutations in the mitochondrial DNA D-loop region and breast cancer risk. *Breast Cancer Res. Treat.* **119**:431–436; 2010.
- [140] Gingras, D.; Gendron, M.; Boivin, D.; Moghrabi, A.; Théorêt, Y.; Béliveau, R. Induction of medulloblastoma cell apoptosis by sulforaphane, a dietary anticarcinogen from Brassica vegetables. *Cancer Lett.* **203**:35–43; 2004.
- [141] Choi, S.; Singh, S. V. Bax and Bak are required for apoptosis induction by sulforaphane, a cruciferous vegetable-derived cancer chemopreventive agent. *Cancer Res.* **65**:2035–2043; 2005.
- [142] Jakubikova, J.; Bao, Y.; Sedlak, J. Isothiocyanates induce cell cycle arrest, apoptosis and mitochondrial potential depolarization in HL-60 and multidrug-resistant cell lines. *Anticancer Res.* **25**:3375–3386; 2005.
- [143] Asakage, M.; Tsuno, N. H.; Kitayama, J.; Tsuchiya, T.; Yoneyama, S.; Yamada, J.; Okaji, Y.; Kaisaki, S.; Osada, T.; Takahashi, K.; Nagawa, H. Sulforaphane induces inhibition of human umbilical vein endothelial cells proliferation by apoptosis. *Angiogenesis* **9**:83–91; 2006.
- [144] Tang, L.; Zhang, Y.; Jobson, H. E.; Li, J.; Stephenson, K. K.; Wade, K. L.; Fahey, J. W. Potent activation of mitochondria-mediated apoptosis and arrest in S and M phases of cancer cells by a broccoli sprout extract. *Mol. Cancer Ther.* **5**:935–944; 2006.
- [145] Park, S. Y.; Kim, G. Y.; Bae, S. J.; Yoo, Y. H.; Choi, Y. H. Induction of apoptosis by isothiocyanate sulforaphane in human cervical carcinoma HeLa and hepatocarcinoma HepG2 cells through activation of caspase-3. *Oncol. Rep.* **18**:181–187; 2007.
- [146] Bryant, C. S.; Kumar, S.; Chamala, S.; Shah, J.; Pal, J.; Haider, M.; Seward, S.; Qazi, A. M.; Morris, R.; Semaan, A.; Shamma, M. A.; Steffes, C.; Potti, R. B.; Prasad, M.; Weaver, D. W.; Batchu, R. B. Sulforaphane induces cell cycle arrest by protecting RB-E2F-1 complex in epithelial ovarian cancer cells. *Mol. Cancer* **9**:47; 2010.
- [147] Kanematsu, S.; Uehara, N.; Miki, H.; Yoshizawa, K.; Kawanaka, A.; Yuri, T.; Tsubura, A. Autophagy inhibition enhances sulforaphane-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Anticancer Res.* **30**:3381–3390; 2010.
- [148] Sakao, K.; Singh, S. V. D.L-Sulforaphane-induced apoptosis in human breast cancer cells is regulated by the adapter protein p66Shc. *J. Cell. Biochem.* **113**:599–610; 2012.

## Research Article

# Curcumin Attenuates Gentamicin-Induced Kidney Mitochondrial Alterations: Possible Role of a Mitochondrial Biogenesis Mechanism

Mario Negrette-Guzmán,<sup>1</sup> Wylly Ramsés García-Niño,<sup>2</sup> Edilia Tapia,<sup>3</sup> Cecilia Zazueta,<sup>2</sup> Sara Huerta-Yepe,<sup>4</sup> Juan Carlos León-Contreras,<sup>5</sup> Rogelio Hernández-Pando,<sup>5</sup> Omar Emiliano Aparicio-Trejo,<sup>1</sup> Magdalena Madero,<sup>6</sup> and José Pedraza-Chaverri<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM, 04510 Ciudad de México, DF, Mexico

<sup>2</sup>Departamento de Biomedicina Cardiovascular, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, 14080 Ciudad de México, DF, Mexico

<sup>3</sup>Laboratorio de Fisiopatología Renal, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, 14080 Ciudad de México, DF, Mexico

<sup>4</sup>Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas, Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, 06720 Ciudad de México, DF, Mexico

<sup>5</sup>Departamento de Patología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, 14000 Ciudad de México, DF, Mexico

<sup>6</sup>Departamento de Nefrología, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, 14080 Ciudad de México, DF, Mexico

Correspondence should be addressed to José Pedraza-Chaverri; [pedraza@unam.mx](mailto:pedraza@unam.mx)

Received 7 May 2015; Revised 3 July 2015; Accepted 15 July 2015

Academic Editor: Jian-Li Gao

Copyright © 2015 Mario Negrette-Guzmán et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

It has been shown that curcumin (CUR), a polyphenol derived from *Curcuma longa*, exerts a protective effect against gentamicin- (GM-) induced nephrotoxicity in rats, associated with a preservation of the antioxidant status. Although mitochondrial dysfunction is a hallmark in the GM-induced renal injury, the role of CUR in mitochondrial protection has not been studied. In this work, LLC-PK1 cells were preincubated 24 h with CUR and then cocultured 48 h with CUR and 8 mM GM. Treatment with CUR attenuated GM-induced drop in cell viability and led to an increase in nuclear factor (erythroid-2)-related factor 2 (Nrf2) nuclear accumulation and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha (PGC-1 $\alpha$ ) cell expression attenuating GM-induced losses in these proteins. *In vivo*, Wistar rats were injected subcutaneously with GM (75 mg/Kg/12 h) during 7 days to develop kidney mitochondrial alterations. CUR (400 mg/Kg/day) was administered orally 5 days before and during the GM exposure. The GM-induced mitochondrial alterations in ultrastructure and bioenergetics as well as decrease in activities of respiratory complexes I and IV and induction of calcium-dependent permeability transition were mostly attenuated by CUR. Protection of CUR against GM-induced nephrotoxicity could be in part mediated by maintenance of mitochondrial functions and biogenesis with some participation of the nuclear factor Nrf2.

## 1. Introduction

Curcumin (CUR) is the most active compound in *Curcuma longa* (turmeric or curcuma), an herbaceous plant popularly used as a culinary spice and traditional remedy. Chemically, curcumin is a bis- $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated  $\beta$ -diketone that also features two methoxy groups, two phenolic hydroxyl groups, and two double-conjugated bonds that play important roles

in its well-known physiological benefits [1]. Among its reported biological properties, curcumin includes anticarcinogenic [2, 3], anti-inflammatory [4], antimicrobial [5], antiatherosclerotic [6], and antifibrotic [7] effects. Most of the anti-inflammatory and cytoprotective reports have been linked to the antioxidant activity of curcumin, which is a bifunctional antioxidant [8]. On one hand, curcumin can react directly with reactive oxygen species (ROS) thanks to

the phenolic groups in its structure. On the other hand, curcumin is able to induce an upregulation of various cytoprotective and antioxidant proteins by activation of nuclear factor (erythroid-2)-related factor 2 (Nrf2), a master regulator of the cell antioxidant response [1, 9].

As was documented by our group and others, curcumin protective properties against different kinds of damage models in several tissues might be also mediated by mechanisms that involve preservation in mitochondrial integrity and functions [10]. Indeed, fails in heart performance induced by cardiac reperfusion [11] and 5/6-nephrectomy in rats [12] were improved with curcumin treatment in correlation with attenuated oxidative stress, recovery of antioxidant enzymes activities, and preservation of the respiratory capacity in isolated mitochondria. In addition, cardiotoxicity induced by catecholamine [13] and anoxia-reoxygenation in rats [14] was attenuated by curcumin-mediated inhibition of the mitochondrial permeability transition (MPT) pore and preserving energy production, respectively. In rat kidney and liver, hexavalent chromium-induced injury was attenuated through maintenance of bioenergetic status, calcium retention capacity, and activity of the respiratory complexes [15, 16]. Pretreatment with curcumin rendered similar results in a rat model of indomethacin-induced enteropathy [17]. Interestingly, Kuo et al. [18] and Liu et al. [19] found that the curcumin treatment normalized the mitochondrial biogenesis altered in a liver steatosis obese mice model and a cerebral ischemia reperfusion rat model, respectively, as markers like nuclear respiratory factor 1 (NRF1) and mitochondrial transcription factor A (Tfam) were preserved after the treatment.

Renal protection by curcumin has been well established [1]. There are numerous animal trials that showed nephroprotection by curcumin in some common health complications and in exposures to drugs and chemicals. For its clinical relevance, the protective effect of curcumin against gentamicin- (GM-) induced renal injury is highlighted [20, 21]. Nephrotoxicity is one of the main side effects of this aminoglycoside antibiotic and occurs in 10%–20% of therapeutic regimes. GM is one of the best known nephrotoxic drugs and its association with mitochondrial dysfunction in proximal tubules has been well studied [22]. Mitochondrial membrane potential disruption [23], oxygen consumption anomalies, adenosine triphosphate (ATP) yield decrease, MPT pore formation, mitochondrial cytochrome c release, intrinsic apoptosis, and mitochondrial antioxidant status impairment have been observed both in culture tubular cells and in rat kidneys exposed to GM [23–26]. On the other hand, some reports suggest that curcumin protective effect against GM nephrotoxicity is associated with preservation of the renal antioxidant status and with modulation of the inflammatory response mediated by NF- $\kappa$ B, rather than with protection of renal mitochondrial function [20, 21, 27].

In the present work, we investigate the unexplored effect of curcumin treatment on alterations induced by GM in renal mitochondria in both cells and rats. Because inducers of nuclear translocation of Nrf2 like curcumin have been proposed as inducers of mitochondrial biogenesis [28], we evaluated Nrf2 and peroxisome proliferator-activated receptor

gamma coactivator-1 alpha (PGC-1 $\alpha$ ) expression. PGC-1 $\alpha$  is a central stimulator of mitochondrial biogenesis [29]. Ultrastructural mitochondrial changes, bioenergetic status, and respiratory complexes activities as well as calcium-dependent MPT pore opening were also evaluated. Our results evidence that the protective effect of CUR against GM-induced renal injury and dysfunction could be mediated by maintenance of kidney mitochondrial biogenesis, structure, and functions.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Chemicals and Reagents.** CUR (Cat. no. C1386, batch 081M1611V), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), glutaraldehyde, sodium cacodylate, osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>), paraformaldehyde, bovine serum albumin, potassium succinate, sodium glutamate, sodium malate, adenosine diphosphate (ADP), N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) (HEPES), rotenone, carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP), decylubiquinone, nicotinamide adenine dinucleotide reduced form (NADH), potassium cyanide (KCN), antimycin A, sucrose, phenazine methosulfate (PMS), cytochrome c from equine heart, ascorbic acid, tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD), manganese(II) chloride tetrahydrate, safranin O, arsenazo III, cyclosporine A (CsA), 3-(N-morpholino) propane-sulfonic acid (MOPS), and ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). GM (Garamicina G.U. 120 mg/1.5 mL, batches 2DPDA006 and 1DPDA002) was obtained from Schering-Plough (Mexico City, DF, Mexico). Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), trypsin, antibiotic (10,000 U/mL penicillin and 10,000  $\mu$ g/mL streptomycin), and other tissue culture reagents were purchased from Gibco (Mexico City). Rabbit polyclonal anti-Nrf2 antibody (C-20, Cat. no. sc-722) was obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Rabbit polyclonal anti-PGC-1 $\alpha$  antibody (Cat. no. ab54481) was purchased from Abcam, Inc. (Cambridge, MA, USA). Normal goat serum blocking solution (S-1000) and Avidin/Biotin Blocking Kit (SP-2001) were obtained from Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA, USA). Biotinylated Link Universal, Streptavidin-HRP, and 3,3'-diaminobenzidine (DAB) were obtained from Dako (Carpinteria, CA, USA). Potassium chloride (KCl), sodium citrate, dextrose, and ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA) were acquired from J.T. Baker (Xalostoc, Edo. Mex, Mexico). All other reagents and chemicals used were of the highest grade of purity commercially available.

**2.2. Cell Culture and Viability.** Lily Laboratory Culture Porcine Kidney (LLC-PK1) porcine renal epithelial cells were obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). This cell line is an accepted model to study toxicity of aminoglycosides [23, 30]. LLC-PK1 cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% of antibiotic and cultured under permissive conditions:

37°C and 5% CO<sub>2</sub>. In order to evaluate the effect of CUR on GM-induced toxicity, cells were seeded at a density of  $3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> onto either 96-well or 6-well plates and used for the experiment on the following day. Cells were incubated for 24 h with CUR (10–30 μM) or medium before the GM addition. At the end of preincubation period, CUR or culture medium was replaced by fresh CUR or medium, adding 8 mM GM to some cell groups in order to induce toxicity. CUR treatment and GM exposure were maintained for 48 h by replacing the first medium with fresh medium at 24 h. Cell viability was assessed by MTT reduction. At the end of 72 h of experiment, medium was removed and cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4. In 96-well plates, cells were incubated in medium containing MTT (0.125 mg/mL) at 37°C for 1 h in humidified air supplemented with 5% CO<sub>2</sub>. Medium was then discarded and the formazan crystals deposited in each well bottom were dissolved in 100 μL of 0.1 N HCl in isopropanol. Absorbance was determined at 570 nm using an EnSpire multimode plate reader (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA). Cells incubated in 6-well plates were trypsinized and resuspended in PBS at a proportion of 20 000 cells/10 μL. Spots of 20 000 cells were seeded on slides, left drying at room temperature, fixed in 4% formaldehyde at 4°C, and washed three times in PBS for posterior immunocytochemical analysis.

**2.3. Immunocytochemistry.** Immunocytochemical staining for Nrf2 and PGC-1α was performed in LLC-PK1 cells fixed with formaldehyde pH 7.4 on slides. Antigens were recuperated by boiling for 20 min in 0.01% sodium citrate solution, pH 6.0. Background staining was reduced by blocking with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution in methanol for 30 minutes, incubation in a 2% solution of normal goat serum in PBS (PBS-NGS) for 2 hours, and treatment with avidin and biotin for 10 min each. Slides were incubated overnight at room temperature with anti-Nrf2 (1:100) and anti-PGC-1α (1:250) primary antibodies. The following day, slides were washed five times for 5 min in PBS IX pH 7.4. After washing, slides were incubated for 30 min at room temperature with universal biotinylated link and for 30 min at room temperature with streptavidin conjugated to HRP. For color developing, DAB was used from 1 to 5 min. The reaction was stopped with distilled water and the slides were counterstained with hematoxylin. Finally, cells were dehydrated and fixed with Mount E-2 medium (Shandon Laboratory, Pittsburgh, PA, USA). Slides were analyzed under a microscope Olympus BX40 and immunopositive cells were quantified by simple counting.

**2.4. Animals.** Male Wistar rats with an initial body weight of 200–220 g were used. Animals were maintained under 12-h light/dark cycles at controlled temperature, having *ad libitum* access to water and standard food. Local Committee for the Care and Use of Laboratory Animals approved this experimental study (FQ/CICUAL/038/12), which was conducted according to the guidelines of Mexican Official Norm Guide for the use and care of laboratory animals (NOM-062-ZOO-1999) and for the disposal of biological residues (NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002).

**2.5. Experimental Design.** Animals were randomly divided into four groups: (i) control group (CT) was injected subcutaneously (s.c.) with isotonic saline solution (ISS, vehicle for GM) every 12 h for 7 days and administered with carboxymethyl cellulose (vehicle of CUR) by oral gavage once a day during five days previous to any ISS injection and between the daily ISS injections. (ii) Gentamicin group (GM) was administered s.c. with GM at a dose of 75 mg/Kg/12 h [31] and carboxymethyl cellulose was given like in CT group. (iii) CUR + GM group was injected with GM as in the GM group but received oral CUR (400 mg/Kg) in carboxymethyl cellulose [15] 5 days before GM exposure and between the two daily GM injections (14 doses). (iv) CUR group was administered s.c. with ISS during 7 days and with CUR during 12 days. On the thirteenth day of treatment, rats were euthanized by anesthetization with sodium pentobarbital (60 mg/Kg) and bled via abdominal aorta using a syringe containing heparin and a needle #18 at room temperature. Plasma was separated and stored at –20°C until the markers of renal damage, plasma creatinine, and blood urea nitrogen (BUN) were measured.

**2.6. Analytical Methods.** Creatinine and BUN in plasma were determined by spectrophotometric assays using commercial Spinreact kits as previously reported [23]. Creatinine determination in plasma is based on the reaction of this compound with sodium picrate forming a red complex whose intensity is proportional to the creatinine concentration. However, urea present in the plasma reacts with o-phthalaldehyde forming a colored complex which is quantified at 510 nm.

**2.7. Ultrastructural Study.** To study the mitochondrial ultrastructural morphology, immediately after animal sacrifice, thin kidney tissue slices were obtained and immersed into 4% glutaraldehyde dissolved in 1 mM cacodylate buffer pH 7.2. Then, the kidney cortex was selected and sectioned in small tissue fragments that were deposited into glass tubes and fixed by immersion in the same solution during 24 hr at 4°C. Then, tissue fragments were postfixed with 2% OsO<sub>4</sub> buffer, dehydrated in graded ethyl alcohol solutions, and embedded in Epon Resin (London Resin Company, London, UK). Thin sections from 70 to 90 nm were placed on copper grids, contrasted with lead and uranium salts, and examined with a FEI Tecnai G2 Spirit transmission electron microscope (Hillsboro, OR, USA).

**2.8. Mitochondria Isolation.** Kidneys were quickly removed and maintained in cold isolation buffer (250 mM sucrose, 10 mM HEPES, 1 mM EGTA, pH 7.3). The renal cortex was separated and utilized for mitochondria isolation. Tissue was ground and then homogenized in a Glass/Teflon Potter Elvehjem homogenizer in the same buffer. Mitochondria were obtained by differential centrifugation and the protein content was measured by Biuret method [15].

**2.9. Mitochondrial Bioenergetics.** Oxygen consumption was measured using a Clark type oxygen electrode (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH, USA) and two

different respiratory substrates. To evaluate respiration driven by complex I, 1 mg of mitochondrial protein was added to 1.7 mL of basic medium containing 125 mM KCl, 10 mM HEPES, 3 mM inorganic phosphate (Pi), 10 mM sodium malate, and 10 mM sodium glutamate at pH 7.3. Oxygen consumption sustained by complex II was evaluated replacing malate and glutamate with 10 mM succinate plus 1  $\mu$ g/mL rotenone. State 4 was registered in basic medium, while state 3 respiration was stimulated with ADP (final concentration 200  $\mu$ M) [32]. Respiratory control index (RCI) was calculated as the ratio state 3/state 4. Uncoupled respiration was obtained by adding 1  $\mu$ M of CCCP. Phosphorylation efficiency (ADP/O ratio) was calculated from the added amount of ADP and the total amount of oxygen utilized during the developed state 3 [16].

**2.10. Activity of Mitochondrial Respiratory Complexes and Aconitase.** Effects on mitochondrial enzyme activities were evaluated as previously described [15]. Complex I activity was measured by following the decrease in absorbance due to oxidation of NADH to NAD<sup>+</sup> at 340 nm. The reaction was initiated by adding 60  $\mu$ M decylubiquinone in 1.7 mL of standard reaction medium (125 mM KCl, 10 mM HEPES, 3 mM inorganic phosphate, pH 7.3) supplemented with 0.1  $\mu$ g antimycin A, 1 mM KCN, 100  $\mu$ M NADH, and 0.5 mg of mitochondrial protein. Complex II activity was determined polarographically by recording oxygen consumption. PMS was used as an artificial electron acceptor and succinate as a donor. The reaction was initiated by adding 1 mM PMS in 1.7 mL of standard reaction medium supplemented with 5 mM succinate, 2  $\mu$ M rotenone, 0.1  $\mu$ g antimycin A, 1 mM KCN, 1  $\mu$ M CCCP, and 0.5 mg of mitochondrial protein. Complex III activity was performed by following the increase in absorbance at 550 nm resulting from the reduction of cytochrome c. The assay included oxidized cytochrome c as electron acceptor and decylubiquinol as donor. The reaction was carried out in 2 mL of reaction medium (25 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, pH 7.6) supplemented with 1 mM KCN, 20  $\mu$ M cytochrome c, 2  $\mu$ M rotenone, and 10  $\mu$ g of mitochondrial protein. The reaction was initiated by the addition of 25  $\mu$ M decylubiquinol. An extinction coefficient value of 18.7 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> was used for reduced cytochrome c. Complex IV activity was followed polarographically. TMPD was used as an artificial electron mediator that accelerates the transfer of electrons from ascorbate to membrane-bound cytochrome c. The reaction was carried out in 1.7 mL of the standard reaction medium supplemented with 5 mM ascorbic acid, 2  $\mu$ M rotenone, 1  $\mu$ M CCCP, 0.5  $\mu$ g antimycin A, 25  $\mu$ M cytochrome c, and 2.5 mM TMPD. The reaction was initiated by the addition of 50  $\mu$ g of mitochondrial protein. The activity of aconitase was assayed by determining the rate of formation of the intermediate product, *cis*-aconitate, from the interconversion of L-citrate and isocitrate at 240 nm. Briefly, the reaction was carried out in 1 mL of reaction medium containing 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 0.05% Tween, 1 mM sodium citrate, and 0.6 mM MnCl<sub>2</sub>. The reaction was initiated by the addition of 50  $\mu$ g of mitochondrial protein. An extinction coefficient for *cis*-aconitate of 3.6 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> was used.

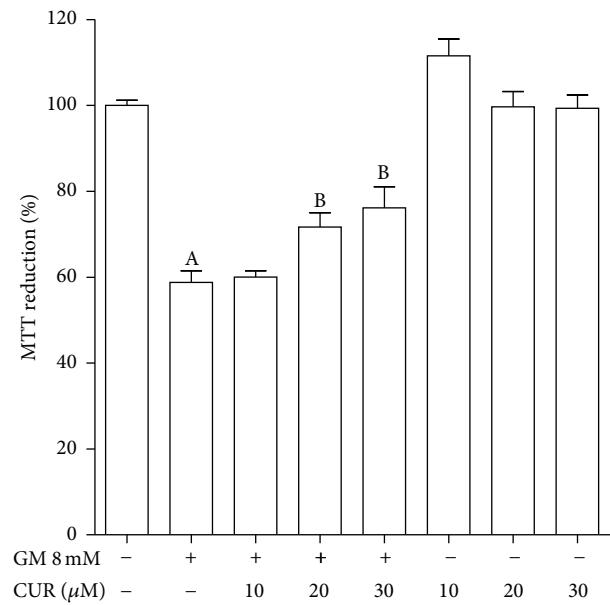


FIGURE 1: CUR attenuates GM-induced cell viability drop in LLC-PK1 cells. Cells were preincubated with 10–30  $\mu$ M CUR during 24 h and then coincubated with 10–30  $\mu$ M CUR and 8 mM GM during further 48 h. Viability was measured as percentage of MTT reduction compared to control cells (CT). Data are mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$ . <sup>A</sup> $P < 0.001$  versus CT; <sup>B</sup> $P < 0.05$  versus GM-treated cells.

**2.11. Ca<sup>2+</sup>-Dependent MPT.** Effects on the opening of MPT pore induced by Ca<sup>2+</sup> overload were evaluated in a double-beam spectrophotometer UV-2401 Shimadzu (Kyoto, Japan), as previously described [15]. Ca<sup>2+</sup> retention capacity was determined monitoring the absorbance changes at 625–675 nm of the dye arsenazo III (60  $\mu$ M) in 2.8 mL of medium containing 125 mM KCl, 10 mM HEPES, 3 mM Pi, 10 mM succinate, 1.8  $\mu$ g/mL rotenone, and 200  $\mu$ M ADP (pH 7.3). Mitochondria (2 mg of mitochondrial protein) were added and then challenged with 100  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>. In a similar way, Ca<sup>2+</sup>-induced membrane potential dissipation was evaluated spectrophotometrically at 525–575 nm using 10  $\mu$ M safranin O. Both assays were also performed in presence of 1  $\mu$ M CsA, a known inhibitor of the MPT pore. Depolarization of the membrane potential was induced by CCCP addition at the end of the assays [15].

**2.12. Statistics.** Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test using the software Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). A  $P$  value less than 0.05 was considered statistically significant.

### 3. Results and Discussion

**3.1. Viability of LLC-PK1 Cells.** Incubation for 48 h with GM decreased cell viability (expressed as MTT reduction) to 58.8% compared to untreated cells (Figure 1). A cytoprotective effect was observed when LLC-PK1 cells were pre- and coincubated with 20 and 30  $\mu$ M CUR (viabilities of

71.6% and 76.1%, resp.). Viability of cells only incubated with CUR was not significantly different from control cells. Minor concentrations were assayed but no protection was found. On the other hand, concentrations of 40 and 50  $\mu\text{M}$  were also tested but they were seemingly toxic as viability decreased in cells incubated only with CUR and the protection against GM was not observed (data not shown).

**3.2. Nrf2 Nuclear Accumulation and PGC-1 $\alpha$  Expression.** CUR is a bifunctional antioxidant that induces nuclear accumulation of the factor Nrf2 in LLC-PK1 cells [33]. In order to confirm its role in this cell culture model, we evaluated the nuclear immunoprevalence of Nrf2 at the end of the CUR-GM scheme. After 72 h of 30  $\mu\text{M}$  CUR incubation, nuclear translocation of Nrf2 significantly increases compared to CT cells (Figures 2(a) and 2(d)). Nuclear accumulation is inhibited in GM cells as expression is mainly located in cytoplasm but not in nucleus (Figure 2(b)). Immunopositive nuclei fell from 28.3% in CT cells to 9.8% in GM cells (Figure 2(e)). However, pre- and coincubation with 30  $\mu\text{M}$  CUR in cells exposed to GM (CUR + GM cells) prevented this effect ( $P < 0.05$ ). Hereafter, it could be considered that Nrf2 plays a role in the effects observed.

The coactivator PGC-1 $\alpha$  has been well identified as a potent inducer of mitochondrial biogenesis *trans*-activating target genes of nuclear factors like NRF1 and NRF2, involved in the program of respiratory gene expression. Also, PGC-1 $\alpha$  induces transcripts of these factors, confirming its important integrative role upstream of biogenic program [29]. In Figures 3(a) and 3(b), it can be noticed that GM induced a strong drop in PGC-1 $\alpha$ -expressing cells (from 88.5% in CT to 16.9% in GM). This effect was entirely prevented with the CUR treatment; nevertheless, it seems that CUR does not induce *per se* an increase in cells expressing PGC-1 $\alpha$  (Figure 3(e)).

Connection between Nrf2 and mitochondrial biogenesis has been established. It was reported that 5'-UTR for NRF1 contains binding motifs for Nrf2, antioxidant response elements (AREs). Nuclear translocation of Nrf2 was followed by NRF1 induction and mitochondrial biogenesis that enabled rescuing mice from doxorubicin-induced cardiomyopathy and lethal *Staphylococcus aureus* sepsis, effects accompanied by an induction in PGC-1 $\alpha$  [34, 35]. The conservation of PGC-1 $\alpha$  levels in CUR + GM LLC-PK1 cells could be associated with the curcumin-induced Nrf2 nuclear translocation. This *in vitro* approach could work in involving mitochondrial biogenesis in the following observations *in vivo*.

**3.3. Rat Renal Function.** Figure 4 shows the protective effect of CUR against GM-induced renal dysfunction in rats. GM induced an 8-fold increase in plasma creatinine level (Figure 4(a)). This notable GM-elicited change was attenuated in the CUR + GM group that showed plasma creatinine values 37% lower than those found in the GM group ( $P < 0.05$  versus GM). A similar trend was observed in BUN (Figure 4(b)). An increase about 10-fold above CT value was obtained in the rats injected with GM, which was attenuated by 37% in the CUR + GM rats ( $P < 0.05$ ). Animals administered only with CUR showed no changes in these parameters.

Previous works carried out by Ali et al. [20] and Farombi and Ekor [21] where a different GM administration scheme was used, with daily single doses of 80 mg/Kg intramuscularly during 6 days [20] and 100 mg/Kg intraperitoneally for 7 days [21], showed that creatinine and BUN levels in animals treated with GM increase 2–4.4-fold compared to CT group. Nevertheless, in rats cotreated with GM and CUR, those levels were similar to CT group. In our study, we observed that creatinine and BUN levels were about 10-fold greater in GM group than those observed in the CT animals after daily administration of 150 mg/Kg, which was distributed in two injections, to approach a clinical multidoses system. In this regard, some meta-analysis studies have shown that monodoses system (one daily single dose) correlates with less nephrotoxicity than multidoses system [36]. We choose the administration of a higher GM dose by a multidose system to achieve significant mitochondrial dysfunction and then evaluate the protective effect of curcumin in this condition. Successfully, CUR treatment ameliorates the GM-induced increase on both plasma creatinine and BUN levels in the GM + CUR group in spite of the high toxicity induced for this antibiotic.

**3.4. Mitochondrial Ultrastructure.** In well agreement with these determinations, the electron microscopy study showed extensive damage in the mitochondrial morphology produced by GM, characterized by effacement of inner membrane (cristae) (Figure 5(b)), while GM + CUR group showed higher number of mitochondria with almost normal structure; just some swollen mitochondria were seen (Figure 5(c)). The mitochondrial ultrastructure of proximal tubules from CT rats (Figure 5(a)) and treated with CUR (Figure 5(d)) was well preserved. In addition, it was observed that CUR treatment increases the number of rounded mitochondria having electron dense matrices and tightly packed cristae (Figures 5(c) and 5(d)).

In this connection, there are several *in vivo* studies on rodents that demonstrate the protective effect of CUR on mitochondrial ultrastructure injury [37–41], in a similar way to our results. Besides, it has been previously confirmed that CUR increases mitochondrial biogenesis [18, 42, 43]. Liu et al. [19] suggested that this mechanism could be responsible for neuroprotection in a model of ischemia/reperfusion on brain. Thus, CUR attenuates GM-induced mitochondrial alterations by a mitochondrial biogenesis mechanism.

**3.5. Mitochondrial Bioenergetics.** Oxygen consumption profiles of rat renal mitochondria representatives of each experimental group are indicated for the two respiratory substrate conditions, malate/glutamate (Figure 6(a)) and succinate (Figure 6(b)). Oxygen consumption coupled to phosphorylation was reduced in mitochondria obtained from the GM-treated group as compared with CT mitochondria. CCCP stimulated respiratory rates in all conditions except in GM mitochondria oxidizing NADH-linked substrates (Figure 6(a)). At both substrates conditions, it can be graphically noted that the healthy behavior is partially preserved in mitochondria from rats cotreated with CUR and GM.



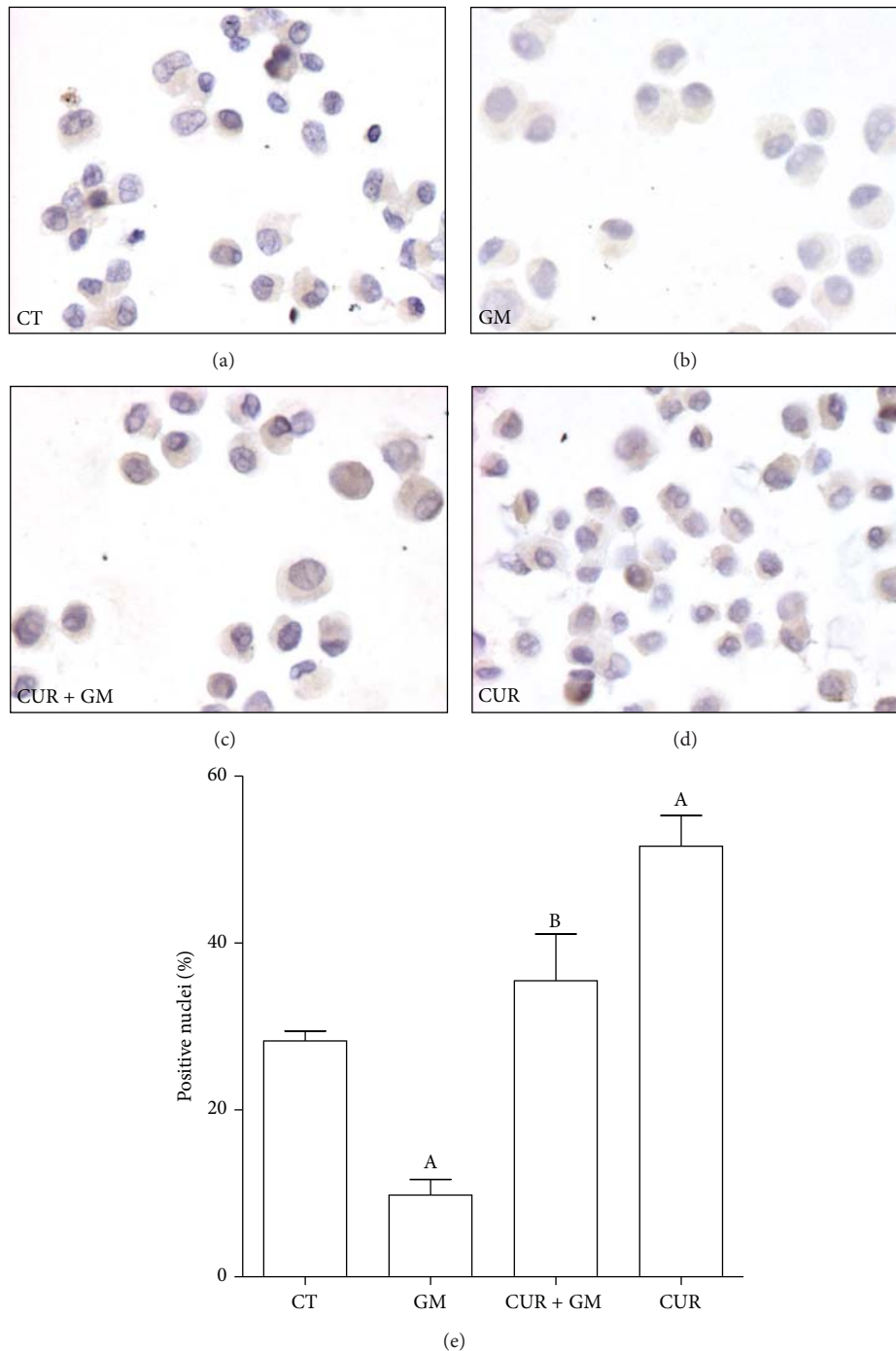


FIGURE 2: CUR induces an increase in nuclear accumulation of Nrf2 and prevented the GM-induced drop in Nrf2 expression and nuclear accumulation in LLC-PK1 cells. Cells were preincubated with 30  $\mu$ M CUR during 24 h and then coincubated with 30  $\mu$ M CUR and 8 mM GM during further 48 h. Expression of Nrf2 was detected by immunocytochemical technique. (a) CT. (b) GM. (c) CUR + GM. (d) CUR. (e) Quantification of positive nuclei. Data are mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$ . <sup>A</sup> $P < 0.05$  versus CT; <sup>B</sup> $P < 0.01$  versus GM.

Besides, there were no relevant differences between CUR and CT mitochondria (data not shown).

Outcomes for the major bioenergetics parameters obtained by oxygen consumption measurements are shown in Figure 7 (using malate/glutamate as substrate) and in Figure 8 (using succinate as substrate). State 3 decreased by

30% in mitochondria from rats treated with GM (Figures 7(a) and 8(a),  $P < 0.05$  versus CT). ADP-stimulated oxygen consumption was preserved in CUR + GM by 73% in mitochondria supplied with malate/glutamate and around 61% in mitochondria supplied with succinate. Basal respiration was maintained in mitochondria from all groups

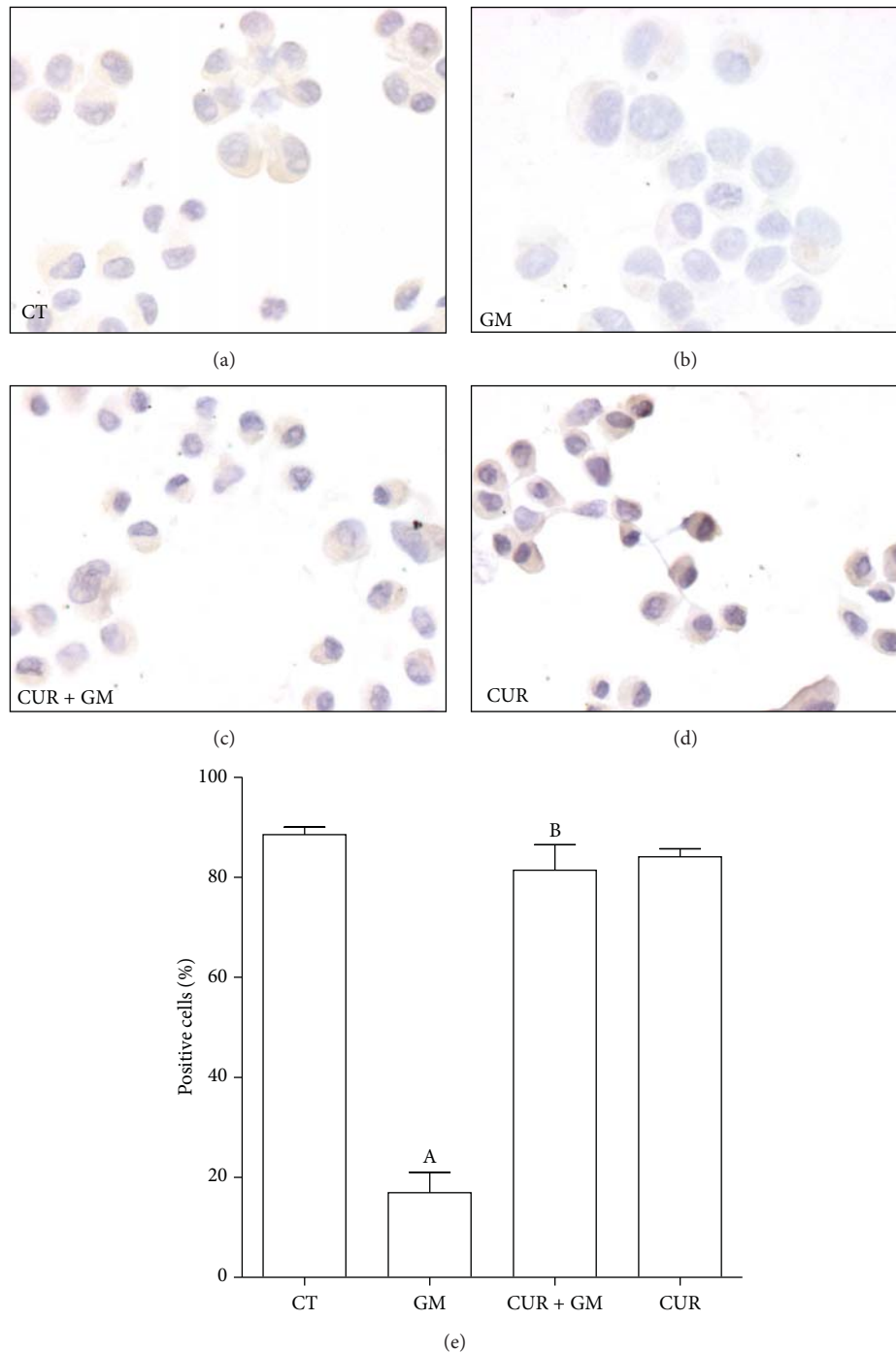


FIGURE 3: CUR prevents GM-induced drop in expression of the coactivator PGC-1 $\alpha$  in LLC-PK1 cells. Cells were preincubated with 30  $\mu$ M CUR during 24 h and then coincubated with 30  $\mu$ M CUR and 8 mM GM during further 48 h. Expression of PGC-1 $\alpha$  was detected by immunocytochemical technique. (a) CT. (b) GM. (c) CUR + GM. (d) CUR. (e) Quantification of positive cells. Data are mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$ . <sup>A</sup> $P < 0.001$  versus CT; <sup>B</sup> $P < 0.001$  versus GM.

fed with malate/glutamate (Figure 7(b)). In contrast, state 4 was lower in mitochondria from the GM group oxidizing succinate. State 4 rates were not completely reestablished in CUR + GM, while similar values of oxygen consumption between CT and CUR were observed under these conditions

(Figure 8(b)). However, using either substrate, these values lead to significant differences in the RCI between the GM group and the CT group and between CUR + GM group and GM group. RCI falls from 4.7 in CT mitochondria to 1.4 (30%) in GM mitochondria and was recovered to

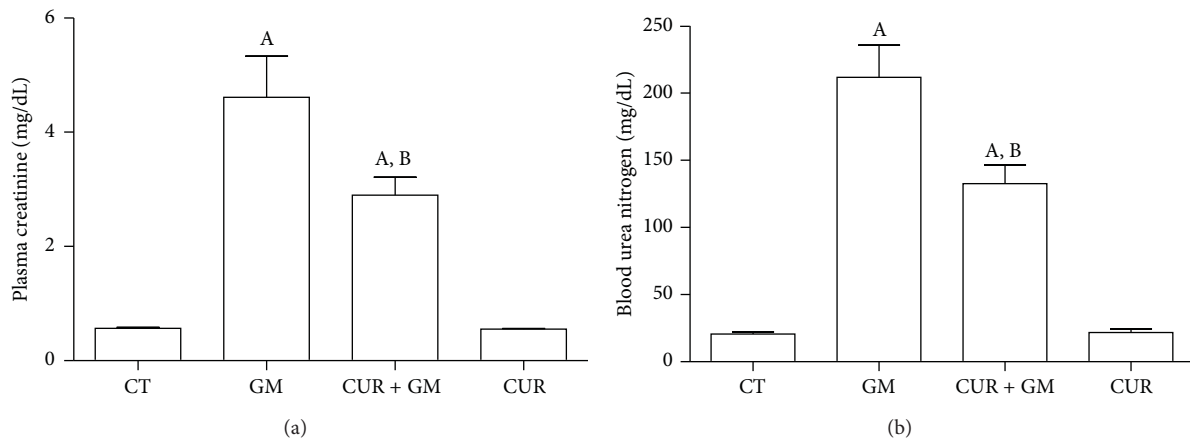


FIGURE 4: CUR ameliorates GM-induced renal dysfunction in rats. (a) Plasma creatinine. (b) Blood urea nitrogen. Data are mean  $\pm$  SEM,  $n = 6$ . <sup>A</sup> $P < 0.01$  versus CT; <sup>B</sup> $P < 0.05$  versus GM.

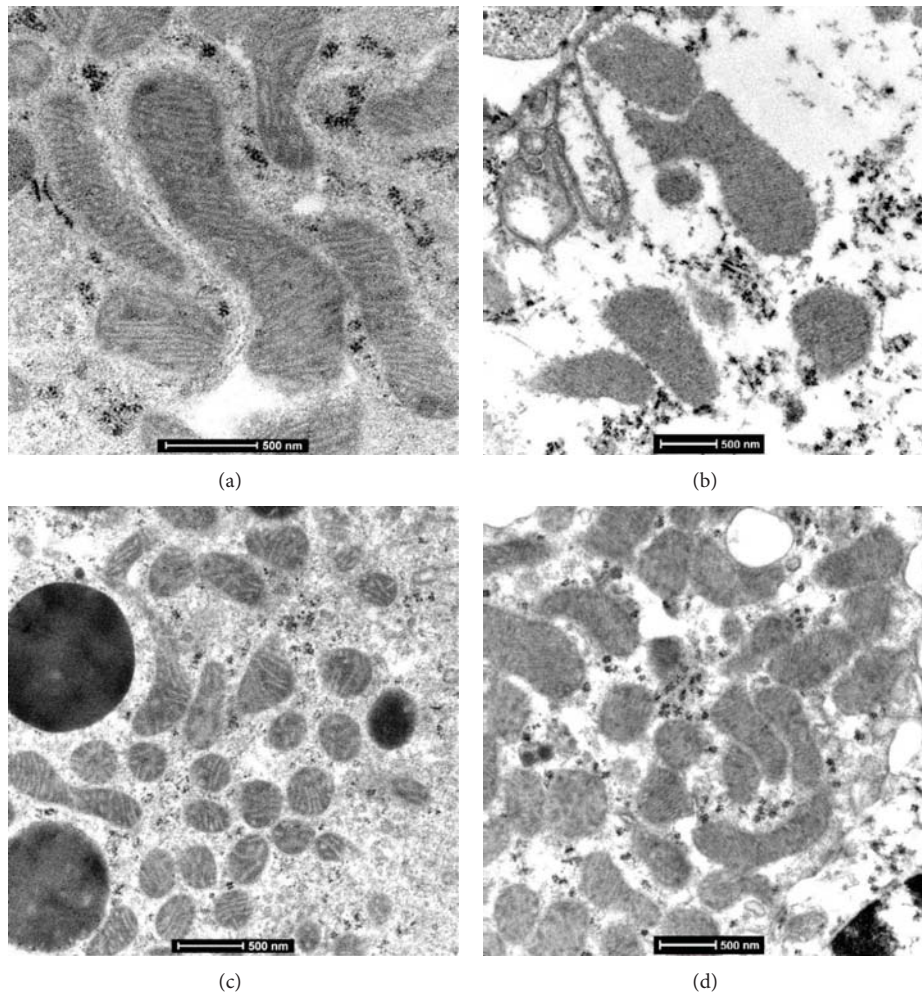


FIGURE 5: Representative micrographs of mitochondrial ultrastructure from convoluted proximal tubules. (a) Normal mitochondria structure in epithelial cell from convoluted proximal tubule from control rat. (b) In contrast, mitochondria show total cristae effacement in an animal treated with GM. (c) Convoluted proximal epithelial cell from a rat treated with CUR + GM shows numerous mitochondria with well-preserved morphology. (d) Similar mitochondrial morphology to CT animal is observed in rat only treated with CUR.

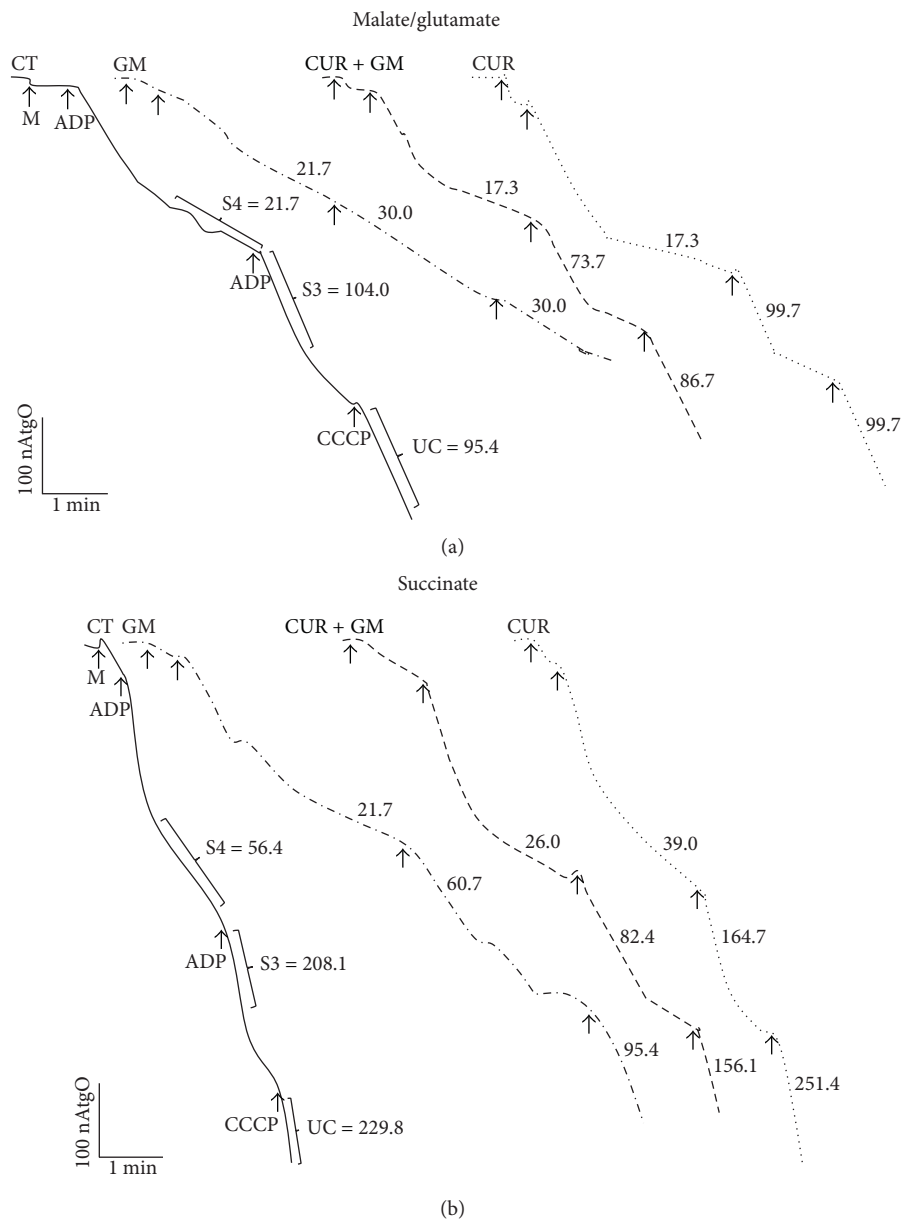


FIGURE 6: Representative tracings for oxygen consumption profiles of renal mitochondria using (a) malate/glutamate or (b) succinate as substrates. Values on tracings belong to punctual observations and are not means. M: mitochondria; ADP: adenosine diphosphate; CCCP: carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone; S3: state 3; S4: state 4; UC: uncoupled respiration; CT: control; GM: gentamicin; CUR: curcumin. Units of S3, S4, and UC are ngAtO/min/mg protein.

3.8 (81% compared with CT) in CUR + GM mitochondria (Figure 7(c)) with malate/glutamate, whereas RCI of GM group falls to 67% of CT and renal mitochondria from the CUR + GM group reached 86% of untreated rats RCI (Figure 8(c),  $P < 0.05$  versus GM) when using succinate.

Uncoupled respiration was lower (24% of CT group) in GM mitochondria oxidizing malate/glutamate (Figure 7(d),  $P < 0.05$  versus CT) and such diminution was prevented with curcumin. A similar trend was observed when succinate was supplemented, but the drop was lesser and was slightly attenuated by CUR treatment (Figure 8(d)).

ADP/O ratio in GM mitochondria oxidizing NADH-linked substrates showed lower phosphorylation rates as compared with CT mitochondria. Mitochondria from CUR + GM group recovered phosphorylation rates (Figure 7(e)). On the other hand, ADP/O values were similar in all experimental groups when succinate was the energizing substrate (Figure 8(e)). The CUR group had a behavior similar to that for CT group in all of evaluated bioenergetics parameters.

Oxidative phosphorylation is controlled by the activity of ATP turnover (adenine nucleotide translocase, phosphate

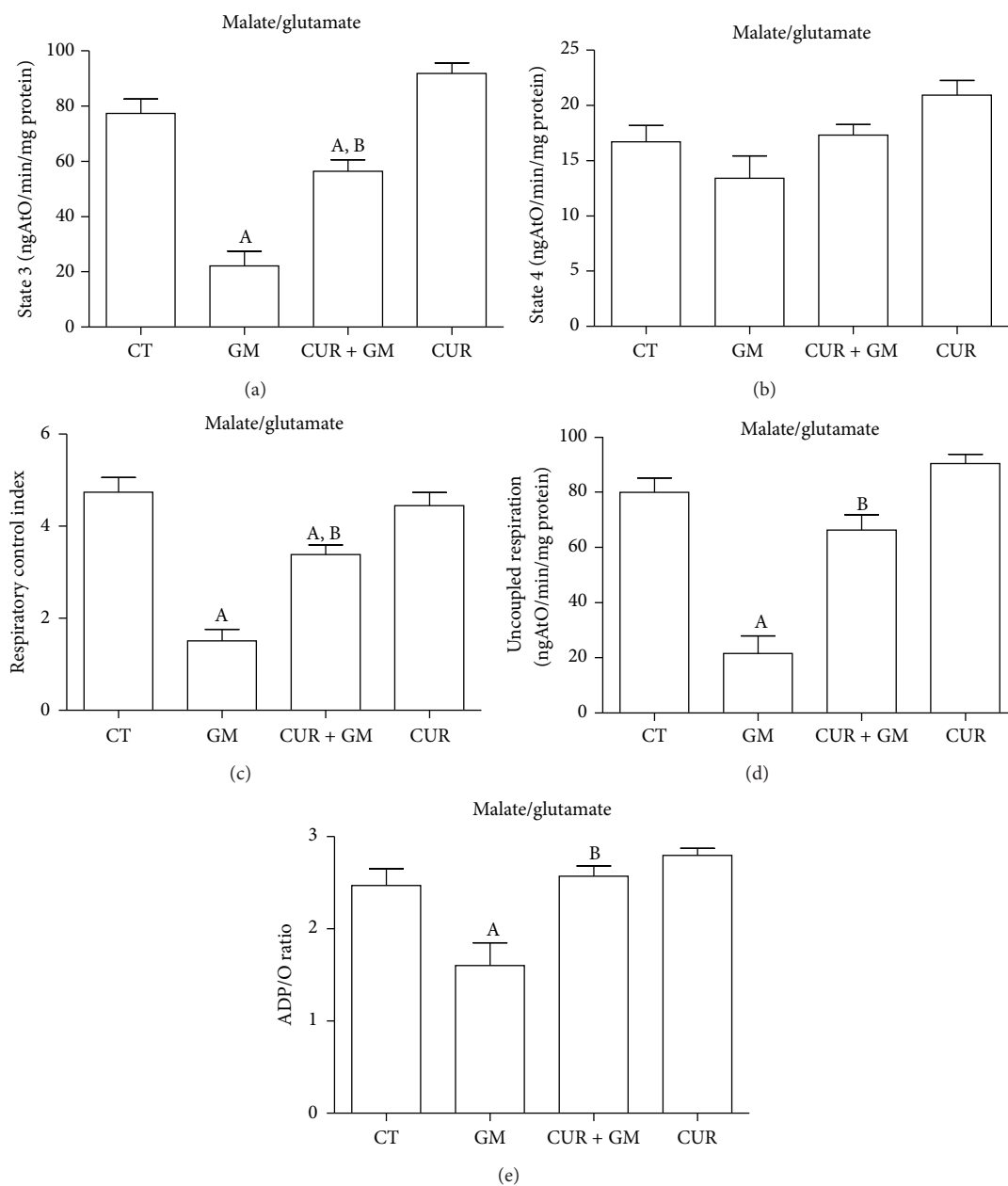


FIGURE 7: CUR attenuates GM-induced alterations in renal mitochondrial site I (malate/glutamate as a respiratory substrate) bioenergetics. (a) State 3. (b) State 4. (c) Respiratory control index. (d) Uncoupled respiration. (e) ADP/O ratio. Data are mean  $\pm$  SEM,  $n = 6-8$ . <sup>A</sup> $P < 0.05$  versus CT; <sup>B</sup> $P < 0.01$  versus GM.

transporter, and ATP synthase) and substrate oxidation (substrate uptake, processing enzymes, relevant electron-transport chain complexes, pool sizes of ubiquinone and cytochrome c, and  $O_2$  concentration) [44]. Simmons et al. [45] and Weinberg and Humes [46] determined that GM inhibits oxidative phosphorylation in renal cortical mitochondria related with the inhibition in maximal rates of electron transport mainly in the input components of the chain. Consequently, our results showed that mitochondria from GM-treated rats presented alterations in oxygen consumption by decreasing state 3 rates using malate/glutamate and

succinate as substrates, which was noticeably recovered after curcumin treatment. Previously, it has been reported that curcumin restored mitochondrial state 3 rates in a model of renal dysfunction induced by hexavalent chromium [15]. On the other hand, in GM mitochondria, no significant change was registered on state 4 in glutamate/malate-dependent oxygen consumption. In contrast, state 4 in mitochondria from GM-treated rats presented lower values of oxygen consumption using succinate as a substrate. Morales et al. [25] reported a similar reduction on state 4 rates in rats treated with GM. Studies in isolated mitochondria from rat

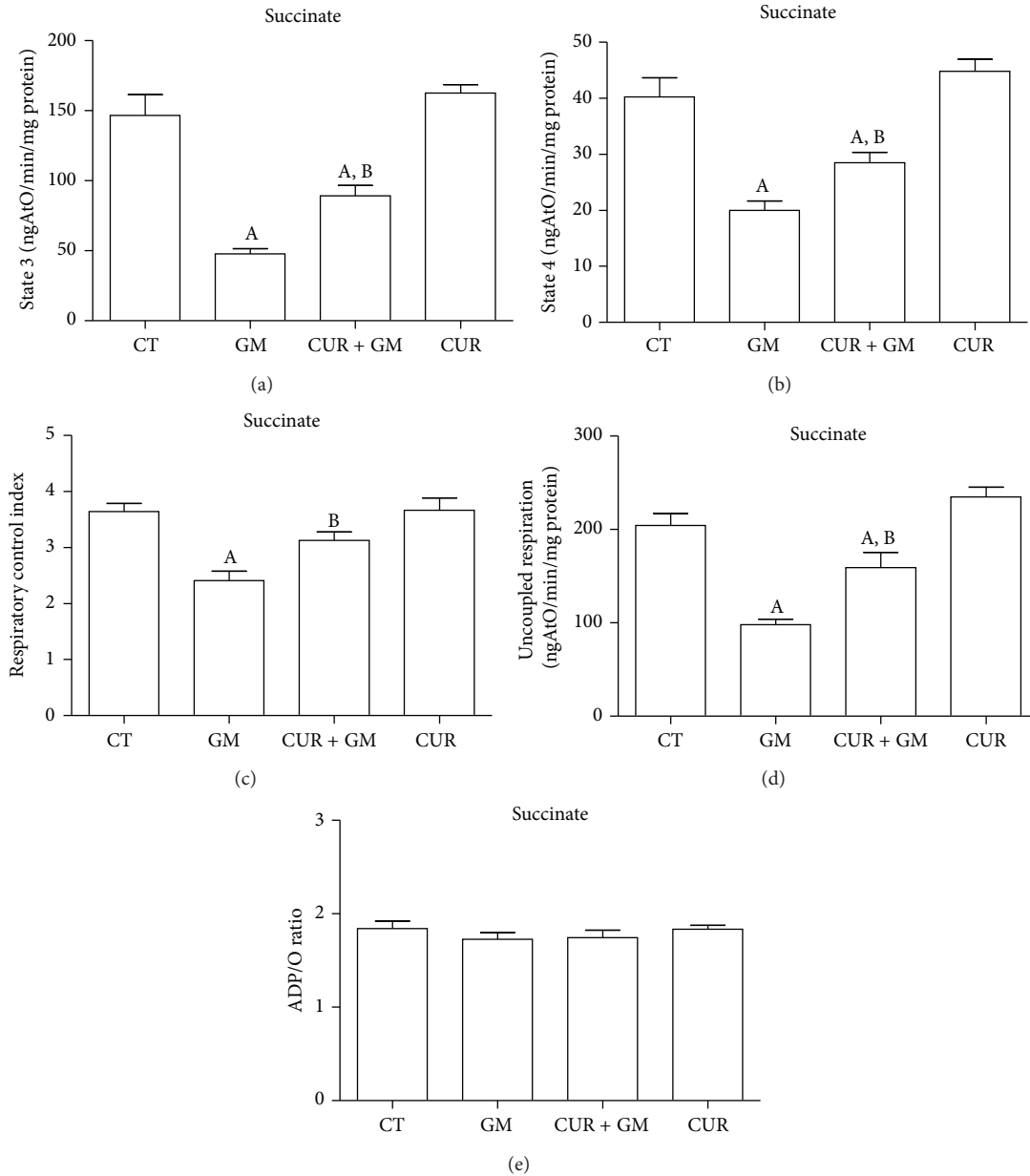


FIGURE 8: CUR attenuates GM-induced alterations in renal mitochondrial site II (succinate as a respiratory substrate) bioenergetics. (a) State 3. (b) State 4. (c) Respiratory control index. (d) Uncoupled respiration. (e) ADP/O ratio. Data are mean  $\pm$  SEM,  $n = 6-8$ . <sup>A</sup>*P* < 0.05 versus CT; <sup>B</sup>*P* < 0.05 versus GM.

renal cortex incubated with GM showed increment in state 4 dependent on the antibiotic concentration [46, 47].

RCI is the single most useful general measure of function in isolated mitochondria. High RCI indicates good function and low RCI usually indicates uncoupling [44]. Mitochondria from GM-treated rats showed dysfunction when using both malate/glutamate or succinate and curcumin attenuated strongly such dysfunction. Uncoupled respiration was substantially reduced below CT values in GM group and recovered in CUR + GM group, mainly when malate/glutamate were used. This is a parameter controlled exclusively by substrate oxidation and detects dysfunction in respiratory

chain components, substrate translocases, or dehydrogenases [44]. Accordingly, ADP/O ratio in mitochondria oxidizing malate/glutamate was decreased in GM group and recovered in mitochondria from cotreated rats. Curcumin prevents mitochondrial dysfunction by maintaining redox homeostasis or by protecting the mitochondrial respiratory complexes [17, 48]; nevertheless, biogenic recuperation of complexes could be another way.

**3.6. Activity of Respiratory Complexes and Aconitase.** We also evaluated the activity of the respiratory complexes and found that GM induced reduction in the activity of complexes

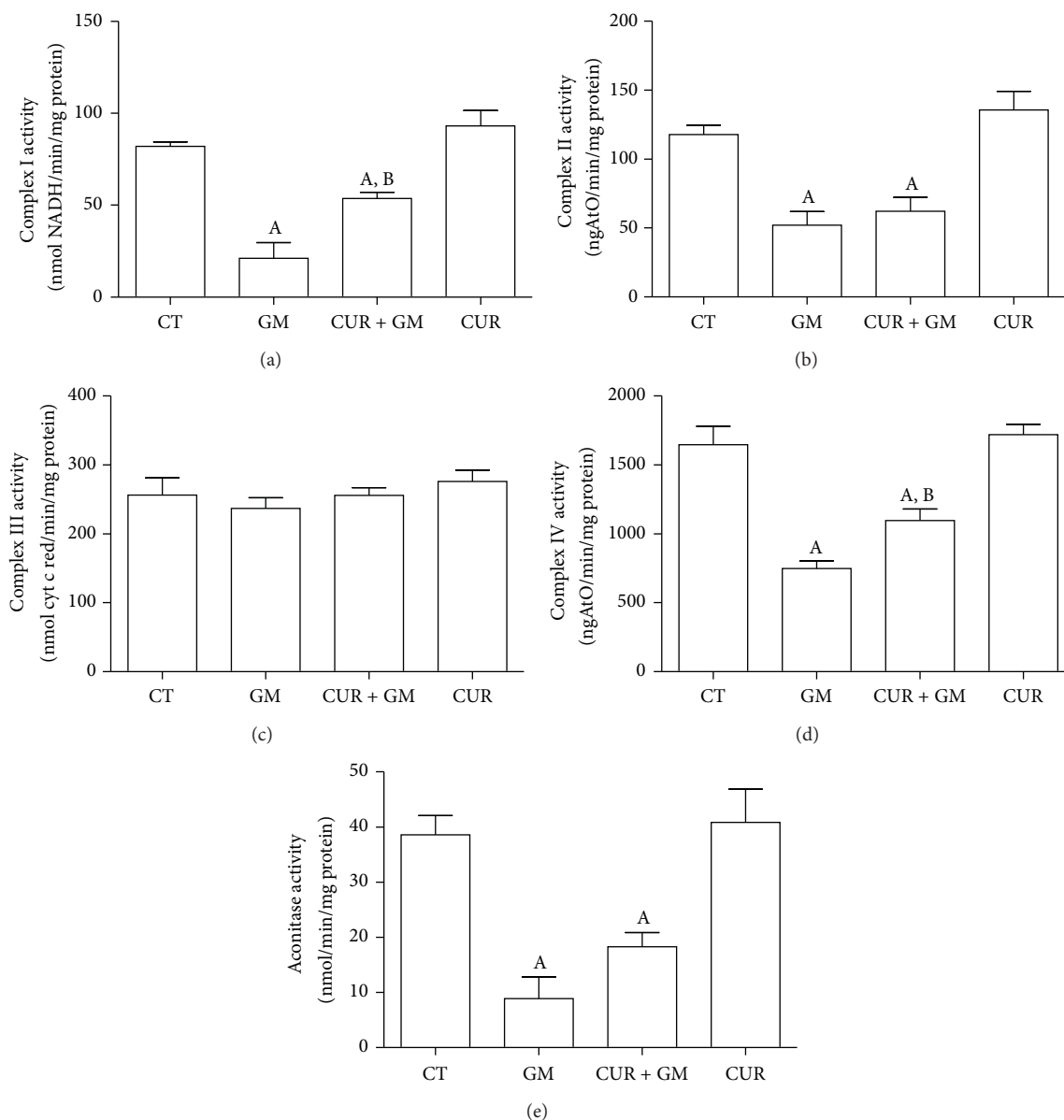


FIGURE 9: Effect of CUR treatment over GM-induced changes in the activity of renal respiratory complexes and of aconitase. (a) Complex I. (b) Complex II. (c) Complex III. (d) Complex IV. (e) Aconitase. Data are mean  $\pm$  SEM,  $n = 5-6$ . <sup>A</sup> $P < 0.05$  versus CT; <sup>B</sup> $P < 0.05$  versus GM.

I, II, and IV. Activity of complex I in the GM group was the most affected retaining 25% of the activity observed in CT mitochondria ( $P < 0.05$ ) (Figure 9(a)). Activity of complexes II and IV declined close to 45% of that observed in the CT group (Figures 9(b) and 9(d)). Curcumin treatment recovered the activities of complexes I and IV (Figures 9(a) and 9(d)), but no recovery was observed in complex II (Figure 9(b)). Retrievals reached approximately 67% of the respective CT value ( $P < 0.05$  versus GM). Respiratory complexes from CUR-administered rats had similar activities to those corresponding to untreated animals.

In Figure 9(e) it is shown that the GM exposure in rats leads to a significant loss of aconitase activity in relation to the CT ( $P < 0.05$ ). Even though a weak trend toward activity

recuperation is observed in the CUR + GM group, this was not significantly different. Aconitase activity in mitochondria of rats treated only with CUR showed similar values to CT group.

We have already discussed the components of RCI, state 3 and state 4, and with the results of complexes activity assays we will identify the primary causes of mitochondrial dysfunction. According to oxygen consumption analysis, we observed that GM decreased the activity of complexes I and II which may explain the diminution in state 3 rates, RCI, and uncoupled respiration (Figures 7 and 8). These effects induced by GM on complexes I and II were recently known [49]. The absence of complex III activity alterations is in agreement with the previous observation of absence

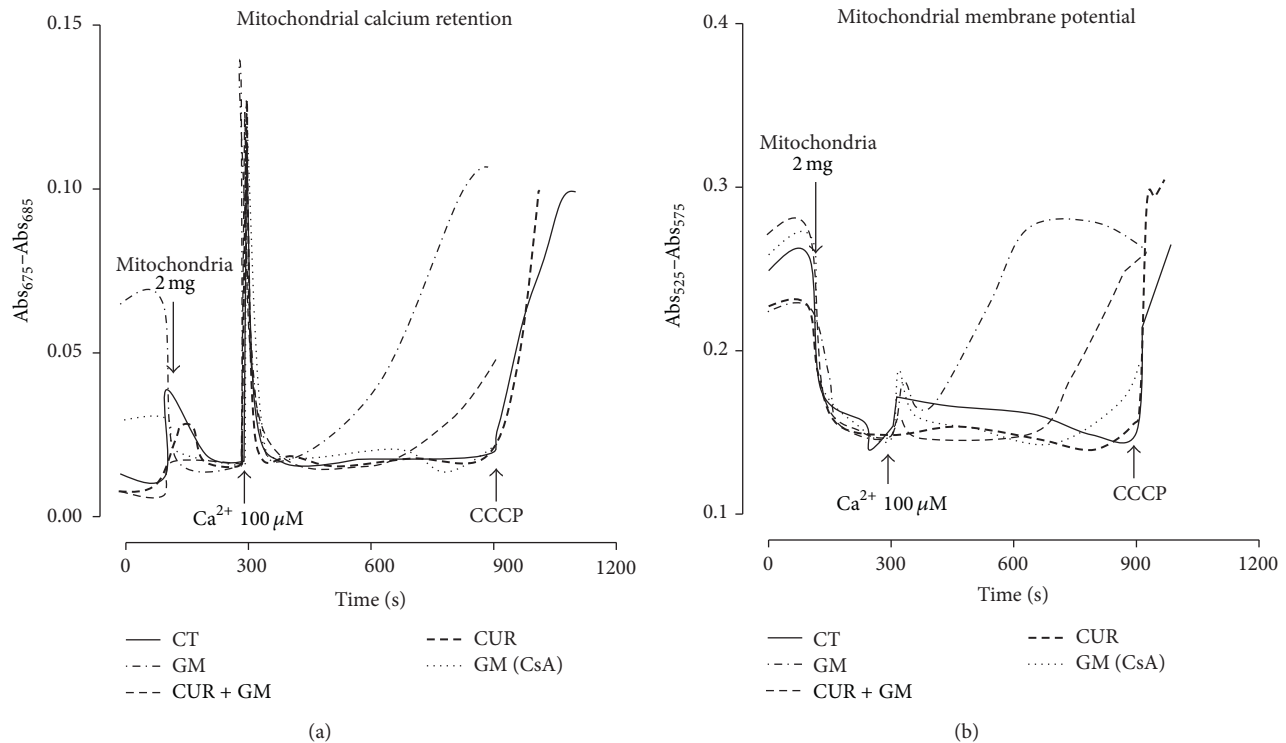


FIGURE 10: CUR treatment delays the  $Ca^{2+}$ -dependent mitochondrial permeability transition in renal cortex of GM-exposed rats. (a) Representative tracings of  $Ca^{2+}$  retention capacity obtained by arsenazo III assay and (b) representative tracings of mitochondrial membrane potential responsive to  $Ca^{2+}$  overload obtained by safranin O assay. CCCP: carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone; CT: control; GM: gentamicin; CUR: curcumin; CsA: cyclosporine A.

of changes in ascorbate-TMPD-supported respiration in isolated mitochondria exposed to GM [46]. Notwithstanding, complex IV activity was altered by GM exposure countering the statement that the terminal components of respiratory chain are relatively insensitive to GM effect [46]. Indeed, it has been demonstrated that cytochrome oxidase (complex IV) concentration and its activity decreased significantly after GM treatment in rats [49, 50]. Curcumin attenuating action in complex IV activity was consistent with its effects on state 3 and uncoupled respiration. Besides, several studies have shown the potential protective effect of curcumin on the respiratory chain complexes [10].

On the other hand, it is known that anion superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ) generation is an important event in mitochondria exposed to GM *in vitro* [51]. Results in Figure 9(e) support this idea in our model as aconitase activity was strongly inhibited in GM group. Aconitase is an enzyme belonging to the tricarboxylic acids pathway and its activity can be used as a measure of mitochondrial oxidative stress [52]; specifically, aconitase activity inhibition can be used to indirectly determine  $O_2^{\cdot-}$  production [32]. However, curcumin treatment produced a marginal nonsignificant recovery in aconitase activity probably because of the high sensitivity of this enzyme to GM-induced ROS production [25].

**3.7.  $Ca^{2+}$ -Dependent MPT.** The effects of  $Ca^{2+}$  overload on the opening of the MPT pore evaluated as  $Ca^{2+}$  retention

mitochondrial capacity and mitochondrial membrane potential are shown in Figures 10(a) and 10(b), respectively. Calcium was rapidly accumulated and maintained in mitochondria in all the experimental groups; however, high calcium concentration promoted the opening of the MPT pore in GM mitochondria, as CsA totally prevents this condition (Figure 10(a)). CUR partially mitigated  $Ca^{2+}$  release induced by GM.  $Ca^{2+}$  overload promotes membrane permeabilization and abolition of the mitochondrial membrane potential. In Figure 10(b), tracing GM evidences membrane potential dissipation next to  $Ca^{2+}$  addition. Unlike GM, CT and CUR tracings maintained their potential 600 s after  $Ca^{2+}$  addition, until CCCP was added. In CUR + GM mitochondria, depolarization was delayed as compared with GM mitochondria. The absence of this pattern in GM mitochondria with CsA confirms that potential loss is mediated by the formation of the MPT pore.

$Ca^{2+}$  retention mitochondrial capacity and the membrane potential disruption by  $Ca^{2+}$  overload could be associated with the phenomenon of MPT as a triggering mechanism of cell death [53]. MPT pore opening is induced under pseudopathological conditions of oxidative stress. ROS production sensitizes mitochondria toward the MPT induction that, in turn, increases  $Ca^{2+}$  release which may enhance ROS production [54–56]. Thus, our results confirmed that mitochondria from GM-treated rats presented MPT pore opening, as previously described [57, 58]. CUR treatment



favorably ameliorates the MPT pore opening from GM-treated rats protecting them from the noxious effects generated from this antibiotic by preserving mitochondrial integrity.

#### 4. Conclusions

The main finding of this work was that the attenuation of GM-induced nephrotoxicity by curcumin was associated with an improvement of mitochondrial dysfunction. This improvement could be probably linked to a maintenance in the program of gene expression for mitochondrial components involved in respiratory chain that could result minimized by GM. Curcumin treatment attenuated the GM-induced alterations in mitochondrial energy-linked functions of renal cortex of rats, which are associated with protection of mitochondrial chain complexes and preserving mitochondrial integrity. Despite the well-known antioxidant properties of curcumin that can protect mitochondrial proteins against oxidative stress, another presumptive protective mechanism could be the preservation of mitochondrial biogenesis which would guarantee an opportune replacement of impaired structures. Mitochondrial biogenesis could be diminished by GM and curcumin would prevent this effect with participation of Nrf2 in some extension, another proposed mechanism of protection against GM-induced nephrotoxicity.

#### Disclosure

The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

#### Conflict of Interests

The authors report no conflict of interests.

#### Authors' Contribution

Mario Negrette-Guzmán and Wylly Ramsés García-Niño contributed equally to this work and should be considered as first authors.

#### Acknowledgments

This work was supported by PAPIIT (Grant IN210713) and CONACYT (Grants nos. 167949, 177527, 252008, and 220046).

#### References

- [1] J. Trujillo, Y. I. Chirino, E. Molina-Jijón, A. C. Andérica-Romero, E. Tapia, and J. Pedraza-Chaverri, "Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: recent findings," *Redox Biology*, vol. 1, no. 1, pp. 448–456, 2013.
- [2] M. Singh and N. Singh, "Molecular mechanism of curcumin induced cytotoxicity in human cervical carcinoma cells," *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 325, no. 1-2, pp. 107–119, 2009.
- [3] J.-M. Kim, E.-M. Noh, K.-B. Kwon et al., "Curcumin suppresses the TPA-induced invasion through inhibition of PKC $\alpha$ -dependent MMP-expression in MCF-7 human breast cancer cells," *Phytomedicine*, vol. 19, no. 12, pp. 1085–1092, 2012.
- [4] H. Nishikawa, J. Tsutsumi, and S. Kitani, "Anti-inflammatory and anti-oxidative effect of curcumin in connective tissue type mast cell," *Journal of Functional Foods*, vol. 5, no. 2, pp. 763–772, 2013.
- [5] S. Z. Moghadamtousi, H. Abdul Kadir, P. Hassandarvish, H. Tajik, S. Abubakar, and K. Zandi, "A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin," *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 186864, 12 pages, 2014.
- [6] S.-K. Shin, T.-Y. Ha, R. A. McGregor, and M.-S. Choi, "Long-term curcumin administration protects against atherosclerosis via hepatic regulation of lipoprotein cholesterol metabolism," *Molecular Nutrition and Food Research*, vol. 55, no. 12, pp. 1829–1840, 2011.
- [7] M. R. Smith, S. R. Gangireddy, V. R. Narala et al., "Curcumin inhibits fibrosis-related effects in IPF fibroblasts and in mice following bleomycin-induced lung injury," *The American Journal of Physiology—Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 298, no. 5, pp. L616–L625, 2010.
- [8] S. González-Reyes, S. Guzmán-Beltrán, O. N. Medina-Campos, and J. Pedraza-Chaverri, "Curcumin pretreatment induces Nrf2 and an antioxidant response and prevents hemin-induced toxicity in primary cultures of cerebellar granule neurons of rats," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2013, Article ID 801418, 14 pages, 2013.
- [9] W. R. García-Niño and J. Pedraza-Chaverri, "Protective effect of curcumin against heavy metals-induced liver damage," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 69, pp. 182–201, 2014.
- [10] J. Trujillo, L. F. Granados-Castro, C. Zazueta, A. C. Andérica-Romero, Y. I. Chirino, and J. Pedraza-Chaverri, "Mitochondria as a target in the therapeutic properties of curcumin," *Archiv der Pharmazie*, vol. 347, no. 12, pp. 873–884, 2014.
- [11] A. González-Salazar, E. Molina-Jijón, F. Correa et al., "Curcumin protects from cardiac reperfusion damage by attenuation of oxidant stress and mitochondrial dysfunction," *Cardiovascular Toxicology*, vol. 11, no. 4, pp. 357–364, 2011.
- [12] F. Correa, M. Buelna-Chontal, S. Hernández-Reséndiz et al., "Curcumin maintains cardiac and mitochondrial function in chronic kidney disease," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 61, pp. 119–129, 2013.
- [13] M. Izem-Meziane, B. Djerdjouri, S. Rimbaud et al., "Catecholamine-induced cardiac mitochondrial dysfunction and mPTP opening: protective effect of curcumin," *The American Journal of Physiology—Heart and Circulatory Physiology*, vol. 302, no. 3, pp. H665–H674, 2012.
- [14] P. H. Xu, Y. L. Yao, P. J. Guo, T. Wang, B. W. Yang, and Z. Zhang, "Curcumin protects rat heart mitochondria against anoxia-reoxygenation induced oxidative injury," *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 91, no. 9, pp. 715–723, 2013.
- [15] E. Molina-Jijón, E. Tapia, C. Zazueta et al., "Curcumin prevents Cr(VI)-induced renal oxidant damage by a mitochondrial pathway," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 51, no. 8, pp. 1543–1557, 2011.
- [16] W. R. García-Niño, E. Tapia, C. Zazueta et al., "Curcumin pretreatment prevents potassium dichromate-induced hepatotoxicity, oxidative stress, decreased respiratory Complex I activity, and membrane permeability transition pore opening," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, Article ID 424692, 19 pages, 2013.

- [17] N. Sivalingam, J. Basivireddy, K. A. Balasubramanian, and M. Jacob, "Curcumin attenuates indomethacin-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction," *Archives of Toxicology*, vol. 82, no. 7, pp. 471–481, 2008.
- [18] J.-J. Kuo, H.-H. Chang, T.-H. Tsai, and T.-Y. Lee, "Positive effect of curcumin on inflammation and mitochondrial dysfunction in obese mice with liver steatosis," *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 30, no. 3, pp. 673–679, 2012.
- [19] L. Liu, W. Zhang, L. Wang et al., "Curcumin prevents cerebral ischemia reperfusion injury via increase of mitochondrial biogenesis," *Neurochemical Research*, vol. 39, no. 7, pp. 1322–1331, 2014.
- [20] B. H. Ali, N. Al-Wabel, O. Mahmoud, H. M. Mousa, and M. Hashad, "Curcumin has a palliative action on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats," *Fundamental and Clinical Pharmacology*, vol. 19, no. 4, pp. 473–477, 2005.
- [21] E. O. Farombi and M. Ekor, "Curcumin attenuates gentamicin-induced renal oxidative damage in rats," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 44, no. 9, pp. 1443–1448, 2006.
- [22] Y. Quiros, L. Vicente-Vicente, A. I. Morales, J. M. López-Novoa, and F. J. López-Hernández, "An integrative overview on the mechanisms underlying the renal tubular cytotoxicity of gentamicin," *Toxicological Sciences*, vol. 119, no. 2, pp. 245–256, 2011.
- [23] M. Negrette-Guzmán, S. Huerta-Yepe, O. N. Medina-Campos et al., "Sulforaphane attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity: role of mitochondrial protection," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, Article ID 135314, 17 pages, 2013.
- [24] H. Servais, P. Van Der Smissen, G. Thirion et al., "Gentamicin-induced apoptosis in LLC-PK1 cells: involvement of lysosomes and mitochondria," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 206, no. 3, pp. 321–333, 2005.
- [25] A. I. Morales, D. Detaille, M. Prieto et al., "Metformin prevents experimental gentamicin-induced nephropathy by a mitochondria-dependent pathway," *Kidney International*, vol. 77, no. 10, pp. 861–869, 2010.
- [26] J. Chen, H. S. Wong, H. Y. Leung et al., "An ursolic acid-enriched extract of *Cynomorium songaricum* protects against carbon tetrachloride hepatotoxicity and gentamicin nephrotoxicity in rats possibly through a mitochondrial pathway: a comparison with ursolic acid," *Journal of Functional Foods*, vol. 7, no. 1, pp. 330–341, 2014.
- [27] R. Manikandan, M. Beulaja, R. Thiagarajan, A. Priyadarsini, R. Saravanan, and M. Arumugam, "Ameliorative effects of curcumin against renal injuries mediated by inducible nitric oxide synthase and nuclear factor kappa B during gentamicin-induced toxicity in Wistar rats," *European Journal of Pharmacology*, vol. 670, no. 2-3, pp. 578–585, 2011.
- [28] M. Negrette-Guzmán, S. Huerta-Yepe, E. Tapia, and J. Pedraza-Chaverri, "Modulation of mitochondrial functions by the indirect antioxidant sulforaphane: a seemingly contradictory dual role and an integrative hypothesis," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 65, pp. 1078–1089, 2013.
- [29] R. C. Scarpulla, "Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function," *Physiological Reviews*, vol. 88, no. 2, pp. 611–638, 2008.
- [30] H. Servais, Y. Jossin, F. Van Bambeke, P. M. Tulkens, and M.-P. Mingeot-Leclercq, "Gentamicin causes apoptosis at low concentrations in renal LLC-PK 1 cells subjected to electroporation," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 50, no. 4, pp. 1213–1221, 2006.
- [31] P. D. Maldonado, D. Barrera, I. Rivero et al., "Antioxidant S-allylcysteine prevents gentamicin-induced oxidative stress and renal damage," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 35, no. 3, pp. 317–324, 2003.
- [32] E. Martínez-Abundis, N. García, F. Correa, S. Hernández-Reséndiz, J. Pedraza-Chaverri, and C. Zazueta, "Effects of  $\alpha$ -mangostin on mitochondrial energetic metabolism," *Mitochondrion*, vol. 10, no. 2, pp. 151–157, 2010.
- [33] E. Balogun, M. Hoque, P. Gong et al., "Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element," *Biochemical Journal*, vol. 371, no. 3, pp. 887–895, 2003.
- [34] C. A. Piantadosi, M. S. Carraway, A. Babiker, and H. B. Suliman, "Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1," *Circulation Research*, vol. 103, no. 11, pp. 1232–1240, 2008.
- [35] N. C. MacGarvey, H. B. Suliman, R. R. Bartz et al., "Activation of mitochondrial biogenesis by heme oxygenase-1-mediated NF-E2-related factor-2 induction rescues mice from lethal *Staphylococcus aureus* sepsis," *The American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 185, no. 8, pp. 851–861, 2012.
- [36] J. Palomino and J. Pachón, "Aminoglucósidos," *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, vol. 21, no. 2, pp. 105–115, 2003.
- [37] J. Feng, T. Tao, W. Yan, C. S. Chen, and X. Qin, "Curcumin inhibits mitochondrial injury and apoptosis from the early stage in EAE mice," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2014, Article ID 728751, 10 pages, 2014.
- [38] A. M. Sanli, E. Turkoglu, G. Serbes et al., "Effect of curcumin on lipid peroxidation, early ultrastructural findings and neurological recovery after experimental spinal cord contusion injury in rats," *Turkish Neurosurgery*, vol. 22, no. 2, pp. 189–195, 2012.
- [39] P. Srivastava, R. S. Yadav, L. P. Chandravanshi et al., "Unraveling the mechanism of neuroprotection of curcumin in arsenic induced cholinergic dysfunctions in rats," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 279, no. 3, pp. 428–440, 2014.
- [40] J. Pan, H. Li, J.-F. Ma et al., "Curcumin inhibition of JNKs prevents dopaminergic neuronal loss in a mouse model of Parkinson's disease through suppressing mitochondria dysfunction," *Translational Neurodegeneration*, vol. 1, article 16, 2012.
- [41] M. Abdul-Hamid and N. Moustafa, "Protective effect of curcumin on histopathology and ultrastructure of pancreas in the alloxan treated rats for induction of diabetes," *The Journal of Basic & Applied Zoology*, vol. 66, no. 4, pp. 169–179, 2013.
- [42] J.-J. Kuo, H.-H. Chang, T.-H. Tsai, and T.-Y. Lee, "Curcumin ameliorates mitochondrial dysfunction associated with inhibition of gluconeogenesis in free fatty acid-mediated hepatic lipooapoptosis," *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 30, no. 3, pp. 643–649, 2012.
- [43] L. Gibellini, E. Bianchini, S. De Biasi, M. Nasi, A. Cossarizza, and M. Pinti, "527209," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2015, Article ID 527209, 13 pages, 2015.
- [44] M. D. Brand and D. G. Nicholls, "Assessing mitochondrial dysfunction in cells," *Biochemical Journal*, vol. 435, no. 2, pp. 297–312, 2011.
- [45] C. F. Simmons Jr., R. T. Bogusky, and H. D. Humes, "Inhibitory effects of gentamicin on renal mitochondrial oxidative phosphorylation," *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 214, no. 3, pp. 709–715, 1980.

- [46] J. M. Weinberg and H. D. Humes, "Mechanisms of gentamicin induced dysfunction of renal cortical mitochondria. I. Effects of mitochondrial respiration," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 205, no. 1, pp. 222–231, 1980.
- [47] J. M. Weinberg, P. G. Harding, and H. D. Humes, "Mechanisms of gentamicin-induced dysfunction of renal cortical mitochondria. II. Effects on mitochondrial monovalent cation transport," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 205, no. 1, pp. 232–239, 1980.
- [48] H. Raza, A. John, E. M. Brown, S. Benedict, and A. Kamal, "Alterations in mitochondrial respiratory functions, redox metabolism and apoptosis by oxidant 4-hydroxynonenal and antioxidants curcumin and melatonin in PC12 cells," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 226, no. 2, pp. 161–168, 2008.
- [49] B. D. Sahu, S. Tatireddy, M. Koneru et al., "Naringin ameliorates gentamicin-induced nephrotoxicity and associated mitochondrial dysfunction, apoptosis and inflammation in rats: possible mechanism of nephroprotection," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 277, no. 1, pp. 8–20, 2014.
- [50] L. M. Mela-Riker, L. L. Widener, D. C. Houghton, and W. M. Bennett, "Renal mitochondrial integrity during continuous gentamicin treatment," *Biochemical Pharmacology*, vol. 35, no. 6, pp. 979–984, 1986.
- [51] C.-L. Yang, X.-H. Du, and Y.-X. Han, "Renal cortical mitochondria are the source of oxygen free radicals enhanced by gentamicin," *Renal Failure*, vol. 17, no. 1, pp. 21–26, 1995.
- [52] C. E. Guerrero-Beltrán, M. Calderón-Oliver, E. Martínez-Abundis et al., "Protective effect of sulforaphane against cisplatin-induced mitochondrial alterations and impairment in the activity of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 and  $\gamma$  glutamyl cysteine ligase: studies in mitochondria isolated from rat kidney and in LLC-PK1 cells," *Toxicology Letters*, vol. 199, no. 1, pp. 80–92, 2010.
- [53] A. P. Halestrap, G. P. McStay, and S. J. Clarke, "The permeability transition pore complex: another view," *Biochimie*, vol. 84, no. 2-3, pp. 153–166, 2002.
- [54] M. Crompton, "The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death," *The Biochemical Journal*, vol. 341, part 2, pp. 233–249, 1999.
- [55] S. Orrenius, "Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death," *Drug Metabolism Reviews*, vol. 39, no. 2-3, pp. 443–455, 2007.
- [56] A. Rasola and P. Bernardi, "Mitochondrial permeability transition in  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent apoptosis and necrosis," *Cell Calcium*, vol. 50, no. 3, pp. 222–233, 2011.
- [57] N. Dehne, U. Rauen, H. De Groot, and J. Lautermann, "Involvement of the mitochondrial permeability transition in gentamicin ototoxicity," *Hearing Research*, vol. 169, no. 1-2, pp. 47–55, 2002.
- [58] A. Muthuraman, S. K. Singla, A. Rana, A. Singh, and S. Sood, "Reno-protective role of flunarizine (mitochondrial permeability transition pore inactivator) against gentamicin induced nephrotoxicity in rats," *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, vol. 131, no. 3, pp. 437–443, 2011.