



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**ESTUDIO DE MECANISMOS DE CITOPROTECCIÓN POR CURCUMINA EN EL DAÑO
NEFROTÓXICO INDUCIDO POR CISPLATINO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. BIBIANA ORTEGA DOMÍNGUEZ

Dr. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

Facultad de Química

Dra. YOLANDA IRASEMA CHIRINO LÓPEZ

Unidad de Biomedicina, FES-Iztacala

Dra. PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Julio 2018



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 se realizó en el laboratorio 209, edificio F, Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM bajo la dirección del Dr. José Pedraza Chaverri.

Se agradece la asesoría del comité tutor conformado por:

Dr. José Pedraza Chaverri, Facultad de Química, UNAM

Dra. Yolanda Irasema Chirino López, Unidad de Biomedicina, FES-Iztacala.

Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

Se agradece a los miembros del jurado por sus comentarios y corrección de tesis:

Presidente: Dra. Ana Cecilia Zazueta Mendizabal

Secretario: Dr. José Pedraza Chaverri

Vocal: Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Vocal: Dra. Patricia García López

Vocal: Dra. Emma Berta Gutiérrez Cirlos Madrid

Se agradece al técnico académico Omar Noel Medina Campos por su asesoría experimental.

Esta tesis fue apoyada por CONACYT 220046 y 252008, PAPIIT IN201713 y IN201316 y PAIP 5000-9105.

INDICE

ABREVIATURAS	5
RESUMEN	8
I. INTRODUCCIÓN	10
1.1. Riñón	10
1.1.1. Insuficiencia renal aguda	10
1.2. Cisplatino	11
1.2.1. Cisplatino e insuficiencia renal aguda	11
1.3. La mitocondria	12
1.3.1. La dinámica mitocondrial	14
1.3.1.1. Fusión mitocondrial	15
1.3.1.2. Fisión mitocondrial	15
1.4. Autofagia	16
1.4.1. Mitofagia	17
1.5. La curcumina	18
1.5.1 La curcumina y su efecto nefroprotector por cisplatino	20
II. JUSTIFICACIÓN	21
III. HIPÓTESIS	21
IV. OBJETIVO	21
V. OBJETIVOS PARTICULARES	21
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	22
6.1. Reactivos	22
6.2. Modelos de estudio	23
6.3. Creatinina y BUN	24
6.4. Glutación peroxidasa (GPx)	24
6.5. Histologías y microscopía electrónica	25
6.6. Aislamiento de mitocondrias	26
6.7. Respiración mitocondrial (oximetría)	26
6.8. Actividad enzimática del complejo respiratorio mitocondrial I	27
6.9. Potencial de membrana mitocondrial	27
6.10. ATP sintasa	28
6.11. Producción de H ₂ O ₂ por la mitocondria	29
6.12. Extracción de proteínas y western blot	29

6.13. Análisis estadístico	30
VII. RESULTADOS	31
7.1. La curcumina disminuye el daño renal inducido por cisplatino	31
7.2. La curcumina recupera el consumo de oxígeno y la fosforilación oxidativa en mitocondrias tratadas con cisplatino	32
7.3. La curcumina mantiene la actividad del complejo I y el potencial transmembranal en mitocondrias tratadas con cisplatino	35
7.4. La curcumina disminuye la producción de H ₂ O ₂ inducido por cisplatino	36
7.5. La curcumina previene el aumento de una proteína involucrada en la fisión mitocondrial y la disminución de una proteína involucrada en fusión inducida por cisplatino.	38
7.6. La curcumina evita el aumento en las proteínas involucradas en el inicio de la mitofagia inducida por cisplatino	42
VIII. DISCUSIÓN	43
IX. CONCLUSIONES	47
X. PERSPECTIVAS	48
XI. REFERENCIAS	49
XII. ANEXO	60

ABREVIATURAS

ADP	Adenosín difosfato.
ADP/O	Adenosín difosfato /oxígeno.
AKI	Insuficiencia renal aguda.
ARE	Elemento de respuesta antioxidante.
ATG	Proteína relacionada con la autofagia.
ATP	Adenosín trifosfato.
BNIP3L	BCL2 interactúa con proteínas tipo 3.
BSA	Albúmina de suero bovino.
BUN	Nitrógeno ureico en sangre.
CCCP	Carbonilcianuro 3-clorofenilhidrazona.
CIS	Cisplatino.
CMC	Carboximetilcelulosa.
CTR1	Transportador de cobre de alta afinidad 1.
CUR	Curcumina.
DCPIP	2,6-diclorofenol indofenol sal sódica.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
DRP1	Proteína parecida a dinamina 1.
DUb	Decil ubiquinona.
ETC	Cadena transportadora de electrones.
FADH₂	Flavín adenín dinucleótido.
FDA	Administración de alimentos y medicamentos.
FIS1	Proteína de fisión mitocondrial 1.
FUNDC1	Proteína 1 que contiene el dominio FUN14.
G6P	Glucosa 6 fosfato.
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
GPx	Glutación peroxidasa.
GR	Glutación reductasa.
GSH	Glutación.
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno.
HRP	Peroxidasa de rábano.

ICR	Índice del control respiratorio.
KIM1	Molécula 1 de daño renal.
LC3	Cadena ligera 3 de la proteína 1 asociada a microtúbulos.
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos.
MEM	Membrana externa mitocondrial.
MFF	Factor de fisión mitocondrial.
MFN	Mitofusina.
MG	Malato-glutamato.
MIM	Membrana interna mitocondrial.
Mit	Mitocondria.
mtDNA	DNA mitocondrial.
mtMP	Potencial de membrana mitocondrial.
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido.
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.
NAG	N-acetil-β-D-glucosaminasa.
NGAL	Lipocalina asociada con la gelatinasa de neutrófilos.
Nrf2	Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide.
O₂^{·-}	Anión superóxido.
·OH	Radical hidroxilo.
OCT2	Transportador 2 de cationes orgánicos.
OPA1	Proteína de la atrofia óptica 1.
OXPHOS	Fosforilación oxidativa.
PDK4	Cinasa 4 de piruvato deshidrogenasa.
Pi	Fósforo inorgánico.
PINK1	Cinasa 1 inducida por el homólogo de la fosfatasa y tensina (PTEN).
PKA	Proteína cinasa A.
PKC	Proteína cinasa C.
PMG	Piruvato, malato y glutamato.
PVDF	Membranas de fluoruro de polivinilideno.
RE	Retículo endoplásmico.
RNA	Ácido ribonucleico.

ROS	Especies reactivas de oxígeno.
SIRT3	Sirtuina 3.
SS	Solución salina.
TOM	Translocasa de la membrana externa.
U	Unidades.
VDAC1	Canal aniónico dependiente de voltaje 1.
VEH	Vehículo.

RESUMEN

El cisplatino es un agente quimioterapéutico usado en el tratamiento de tumores sólidos, sin embargo, su uso es limitado debido a sus efectos secundarios, siendo el principal la insuficiencia renal aguda (AKI). Algunos de los procesos por los cuales causa este daño son: aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), inflamación, apoptosis y autofagia, además de inducir fisión mitocondrial, mitofagia y alteraciones en la bioenergética mitocondrial. Por tal motivo se han llevado a cabo estudios usando compuestos que puedan disminuir este efecto secundario, una estrategia que se ha empleado es el uso de antioxidantes como es el caso de la curcumina, la cual se obtiene del rizoma de la planta *Curcuma longa* L. En estudios previos se ha demostrado que la administración de curcumina puede disminuir las ROS y la apoptosis, además de prevenir daño en las uniones adherentes inducida por cisplatino. Sin embargo, aún no están completamente descritos los mecanismos de nefroprotección por curcumina. En este trabajo nos enfocamos en evaluar los efectos de curcumina sobre el daño inducido por cisplatino en procesos tales como: bioenergética, dinámica mitocondrial y la mitofagia. Se usaron 4 grupos de ratas Wistar (200-250 g) para los experimentos. 1) Vehículo (VEH), 2) cisplatino (CIS), 3) curcumina y cisplatino (CUR+CIS) y 4) curcumina (CUR). El cisplatino se administró en una sola dosis (5 mg/kg) vía intraperitoneal mientras que la curcumina se administró en 3 dosis de 200 mg/kg vía oral: 30 minutos antes de la administración de cisplatino o vehículo y 24 y 48 horas después de la administración de cisplatino o vehículo.

El tratamiento con curcumina previno el daño inducido por cisplatino lo cual se hizo evidente por la disminución de los marcadores renales nitrógeno ureico en sangre (BUN) y creatinina. Las ratas tratadas con cisplatino presentaron una disminución en el consumo de oxígeno inducido por adenosín difosfato (ADP) (estado 3), en el índice del control respiratorio (ICR), en la actividad de adenosín trifosfato (ATP) sintasa, en el potencial de membrana, en la actividad del complejo I, y en el cociente adenosín difosfato/oxígeno (ADP/O). Estas alteraciones se previnieron, con excepción de la actividad de ATP sintasa, con la administración de la curcumina. Además, la curcumina previno el aumento en la producción de

peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en la mitocondria inducido por cisplatino. Por otro lado, el cisplatino también aumentó la proteína de fisión mitocondrial 1 (FIS1), disminuyó la proteína de la atrofia óptica 1 (OPA1) involucrada en fusión mitocondrial y la sirtuina 3 (SIRT3) la cual regula a OPA1, aumentó las lisinas acetiladas (relacionadas a la función de SIRT3) y las proteínas parkin y cinasa 1 inducida por el homólogo de la fosfatasa y tensina (PINK1). Además alteró la morfología mitocondrial (disminuyó el tamaño en la mitocondrias) y presentó un mayor número de vacuolas. La curcumina previno las alteraciones antes mencionadas.

Por lo que concluimos que la curcumina puede prevenir las alteraciones ocasionadas por cisplatino en la bioenergética mitocondrial, producción de H_2O_2 , dinámica mitocondrial, SIRT3, morfología mitocondrial y mitofagia.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Riñón

El riñón es un órgano par con forma de frijol, que se encuentra localizado uno de cada lado de la columna vertebral. La región externa se denomina corteza y la región interna corresponde a la médula (Eaton y Pooler, 2006; Fenton y Praetorius, 2016). Los riñones están constituidos en promedio por casi un millón de nefronas en humanos y aproximadamente 30,000 nefronas en ratas (Fenton y Praetorius, 2016). La nefrona está constituida por el corpúsculo renal (glomérulo y cápsula de Bowman), túbulos proximales y distales, asa de Henle y conducto colector, de los cuales los glomérulos, porciones de los túbulos contorneados proximales y distales, porciones de las asas de Henle y los conductos colectores se encuentran en la corteza renal, y la médula contiene porciones de las asas de Henle y los conductos colectores medulares (Colville y Bassert, 2016; Eaton y Pooler, 2006).

La función del riñón es la filtración, reabsorción y secreción que son llevados a cabo por los diferentes componentes de la nefrona, además de mantener un balance de fluidos y un equilibrio ácido-base, producir hormonas y regular la presión sanguínea (Colville y Bassert, 2016; Eaton y Pooler, 2006). En el glomérulo se produce un ultrafiltrado plasmático; este filtrado pasa al túbulo proximal en el cual se reabsorbe el 80%, esto conlleva un gasto energético alto, por lo cual esta región contiene abundantes mitocondrias comparado con otras regiones de la nefrona (Bhargava y Schnellmann, 2017). En esta región se absorben iones sodio, bicarbonato, cloro, potasio, calcio y fosfatos, además de agua y solutos orgánicos. Mientras que la secreción tubular se lleva a cabo principalmente en los túbulos distales, en los cuales se secretan sustancias como hidrógeno, potasio y amonio (Colville y Bassert, 2016; Eaton y Pooler, 2006).

1.1.1. Insuficiencia renal aguda

La insuficiencia renal aguda (AKI) se caracteriza por la pérdida repentina de la función renal, resultando en la acumulación de productos de desecho metabólico

tales como la urea y creatinina, y desregulación de la homeostasis ácido-base, electrolitos y fluidos (Sharfuddin et al., 2016).

La mayoría de las veces las causas de la AKI son multifactoriales y pueden afectar a ciertas regiones de la nefrona que son más susceptibles a estos daños, algunos de ellos son: daño tubular (hemorragias, cirrosis, sepsis, toxinas endógenas o exógenas como hemoglobina, mioglobina, antibióticos y agentes quimioterapéuticos), daño a túbulo intersticial (nefritis, infecciones e infiltraciones), daño glomerular (inflamación y desórdenes hematológicos), microvascularidad renal (hipertensión, hipercalcemia, fármacos) y daño a arterias (trombosis, traumas, ateroembolismo) y venas (trombosis, traumas) (Sharfuddin et al., 2016). En este trabajo nos enfocamos en la AKI inducida por cisplatino (quimioterapéutico).

1.2. Cisplatino

El cisplatino (*cis*-diaminodicloroplatino II) es un complejo coordinado con platino, usado como quimioterapéutico para el tratamiento de tumores sólidos, como es el caso del cáncer cervical, cabeza, cuello, pulmón, testículos y ovarios (Miller et al., 2010; Ozkok y Edelstein, 2014). El mecanismo de acción del cisplatino es la unión con el ácido desoxirribonucleico (DNA) formando entrecruzamientos inter e intracatenarios, lo que provoca un cambio conformacional, inhibiendo la replicación del DNA y la división celular (Kelland, 2007; Miller et al., 2010). A pesar de su efectividad en la quimioterapia, su principal desventaja son los efectos secundarios, causando principalmente AKI además de inducir ototoxicidad y neurotoxicidad (Ozkok y Edelstein, 2014).

1.2.1. Cisplatino e insuficiencia renal aguda

Los riñones son la principal ruta de excreción del cisplatino; se filtra en el glomérulo y se acumula en la corteza renal, principalmente en los túbulos proximales. La concentración del cisplatino en células del túbulo proximal es cinco veces más alta que la concentración en el plasma (Ozkok y Edelstein, 2014); esta acumulación produce AKI entre el 20-30% de los pacientes a partir de una sola dosis de cisplatino (Miller et al., 2010).

En diversos tipos celulares se ha evaluado que la absorción de cisplatino se ve influida por varios factores como son: la concentración de iones sodio y potasio, el pH, la presencia de agentes reductores (Gately y Howell, 1993) y la activación de cinasas como la proteína cinasa A (PKA) (Mann et al., 1991) y la proteína cinasa C (PKC) (Basu, Teicher, y Lazo 1990). Para ingresar a la célula utiliza transportadores como el de cobre de alta afinidad 1 [CTR1, por sus siglas en inglés] (Kelland, 2007) o el transportador 2 de cationes orgánicos [OCT2 por sus siglas en inglés] (Ciarimboli et al., 2005), sin embargo, se ha descrito que también puede ingresar por difusión pasiva (Eljack et al., 2014). Una vez en el interior de la célula es altamente reactivo uniéndose a moléculas como glutatión, proteínas, DNA y ácido ribonucleico (RNA).

Así, la administración de cisplatino puede promover alteraciones como son: incremento en nitrógeno ureico en sangre (BUN) y creatinina, desregulación de proteínas del ciclo celular, activación de la vía de señalización de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), daño al DNA, aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), inflamación (revisado en Ozkok y Edelstein, 2014), acumulación de metabolitos tales como ácidos grasos (Portilla et al., 2006), incremento en la autofagia (Yang et al., 2008), fisión mitocondrial (Brooks et al., 2009; Morigi et al., 2015) y mitofagia (Zhao et al., 2017), así como alteraciones en la bioenergética mitocondrial (Nowak, 2002; Sugiyama et al., 1989). Entre los mecanismos antes mencionados, la mitocondria es un importante blanco del cisplatino, alterando su homeostasis.

1.3. La mitocondria

Las mitocondrias están constituidas de una doble membrana (la externa y la interna), el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial (van der Laan et al., 2016); es importante para la homeostasis celular, además es donde se genera la mayor parte de la energía de la célula. En la membrana interna mitocondrial (MIM) se localizan los complejos mitocondriales (I-V) en los cuales se produce la fosforilación oxidativa (OXPHOS) que conduce a las síntesis de ATP en el complejo V (Fig. 1) (Apostolova y Victor, 2015; Friedman y Nunnari, 2014; Mimaki et al., 2012; Sena y Chandel, 2012). Al respecto, el **complejo I** [nicotinamida

adenina dinucleótido (NADH): ubiquinona oxidoreductasa], está embebido en la MIM, es un complejo de aproximadamente 980 kDa conformado por varias subunidades, recibe electrones del NADH y está acoplado al bombeo de protones desde la matriz hacia el espacio intermembranal (Mimaki et al., 2012). El **complejo II** (succinato: ubiquinona oxidoreductasa), recibe electrones del succinato, sin embargo no bombea protones. El **complejo III** (ubiquinol: citocromo c oxidoreductasa) está embebido en la MIM, cataliza la transferencia de electrones de la coenzima Q (forma reducida) al citocromo c, este último es un transportador electrónico proteico que puede desplazarse dentro del espacio intermembranal. En el **complejo IV** (citocromo c oxidasa) se cataliza la oxidación del citocromo c con la reducción del oxígeno a agua (Mathews et al., 2013). Por último, el **complejo V** que es una ATPasa reversible, está constituida por dos regiones: F_0 y una F_1 . La región F_0 está embebida en la MIM, tiene un canal por donde pasan los protones a la matriz mitocondrial, este paso produce energía que se aprovecha para impulsar la síntesis de ATP a partir de ADP y fósforo inorgánico (P_i) que es catalizado en la región F_1 (Junge y Nelson, 2015; Mathews et al., 2013). El desacoplamiento de la OXPHOS y la pérdida de potencial de membrana puede desencadenar aumento en la producción de ROS principalmente por los complejos I y III (Zhan et al., 2013).

El cisplatino altera la bioenergética mitocondrial al reducir la actividad y la abundancia de los complejos I-IV de la cadena respiratoria, disminuyendo el consumo de oxígeno y la OXPHOS (Kruidering et al., 1997; Oh et al., 2017; Satoh et al., 2003; Sugiyama et al., 1989); también disminuye la actividad de la F_0F_1 ATPasa y el contenido de ATP en células de túbulo proximal renal (Nowak, 2002). Estas alteraciones disminuyen el potencial de membrana mitocondrial y aumentan la producción de ROS lo que induce alteraciones en la función mitocondrial (Oh et al., 2017; Satoh et al., 2003).

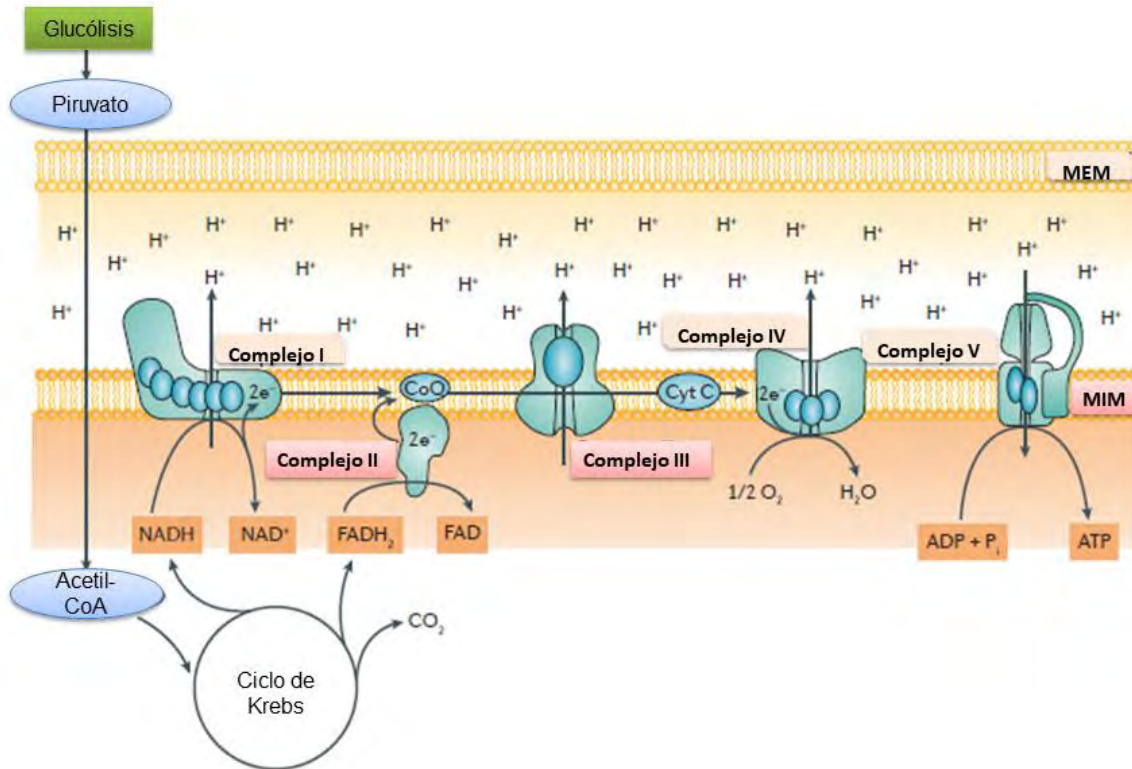


Fig. 1. La cadena transportadora de electrones (ETC). La ETC funciona con equivalentes de NADH y el flavín adenín dinucleótido (FADH₂) que alimentan a los complejos I y II, respectivamente. Los electrones pasan a través de la ETC y son aceptados por el oxígeno en el complejo IV. La transferencia de los electrones impulsa el bombeo de H⁺ por los complejos I, III y IV hacia el espacio intermembranal para mantener el potencial de membrana y la producción de ATP por el complejo V. Tomado y modificado de Bhargava y Schnellmann (2017).

1.3.1. La dinámica mitocondrial

Las mitocondrias son altamente dinámicas, sus cambios morfológicos incluyen fusión y fisión o fragmentación (Fig. 2); un balance entre ambos procesos es importante para la distribución y mantenimiento del DNA mitocondrial (mtDNA). La fusión mitocondrial mantiene un equilibrio de los metabolitos de la matriz y mantiene al mtDNA sin daños. Por otro lado, la fisión participa en la segregación de mitocondrias con un mal funcionamiento ya sea por tener proteínas dañadas, membranas desestabilizadas y daño o mutación en el mtDNA (Anzell et al., 2017). Además, la fisión o fragmentación de las mitocondrias puede inducir la degradación de las mismas por mitofagia (autofagia mitocondrial selectiva).

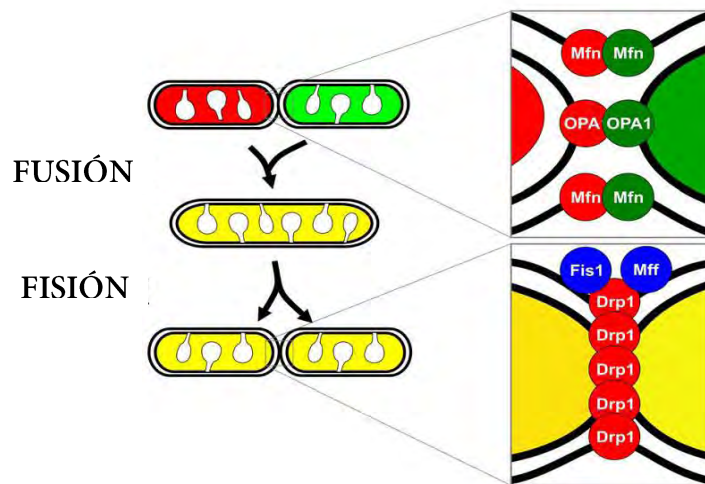


Fig. 2. Dinámica mitocondrial. Se señalan las proteínas de fusión: proteína de atrofia óptica 1 (OPA1), mitofusinas (MFN) y las proteínas de fisión: proteína relacionada a la dinamina 1 (DRP1), proteína de fisión mitocondrial 1 (FIS1) y factor de fisión mitocondrial (MFF). Tomada y modificada de Safulina y Kaasik (2013)

1.3.1.1. Fusión mitocondrial

Las mitofusinas 1 y 2 (MFN1 y MFN2) y la proteína de atrofia óptica 1 (OPA1) son GTPasas tipo dinaminas que participan en la fusión mitocondrial. Las MFN1 y MFN2 tienen como función mediar la fusión de la membrana externa mitocondrial (MEM), además de participar en el mantenimiento de la red mitocondrial (Anzell et al., 2017; Wai y Langer, 2016). Por otro lado, la proteína OPA1 media la fusión de la MIM, tiene 8 isoformas generadas por medio de corte y empalme alternativo y a nivel proteico experimenta cortes proteolíticos en dos sitios: S1 y S2 (Anzell et al., 2017; Nan et al., 2017; Wai y Langer, 2016; Zhan et al., 2013). Debido a estos cortes se produce la proteína OPA1 corta (OPA1-S) derivada de OPA1 larga (OPA1-L), los cuales son producidos por dos peptidasas localizadas en la MIM: OMA1 (corta en S1) y la proteasa i-AAA YME1L que corta en el sitio S2 (Anzell et al., 2017; Wai y Langer, 2016), una acumulación excesiva de OPA1-S causa fragmentación mitocondrial, por lo que OPA1-L es un mecanismo de regulación importante entre la fusión y fisión mitocondrial para preservar la estructura de las redes mitocondriales (Friedman y Nunnari, 2014; Wai y Langer, 2016).

1.3.1.2. Fisión mitocondrial

La proteína parecida a dinamina 1 (DRP1), participa en la fisión mitocondrial, está localizada en el citosol, y al sufrir modificaciones post-traduccionales transloca a la MEM (Nan et al., 2017). Una vez ahí, su unión es favorecida por proteínas unidas a la MEM que actúan como receptores de DRP1, estas proteínas son: la proteína

de fisión mitocondrial (FIS1), el factor de fisión mitocondrial (MFF) y las proteínas de dinámica mitocondrial de 49 y 51 kDa (MiD49 y MiD51), entre estos receptores FIS1 se ha relacionado con el reclutamiento de DRP1 y de modular el ensamble del complejo de fisión mitocondrial (Anzell et al., 2017; Losón et al., 2013). La proteína DRP1 oligomeriza en los sitios de fisión mitocondrial marcados por el retículo endoplásmico (RE), el citoesqueleto de actina facilita el ensamblaje de DRP1 a estructuras multiméricas, una vez en la MEM, la unión de GTP y su hidrólisis promueven cambios en DRP1 lo que resulta en la constricción de la membrana (Roy et al., 2015; Zhan et al., 2013).

Las proteínas que participan en la dinámica mitocondrial experimentan modificaciones post-traduccionales como son fosforilación, desfosforilación, ubiquitinación, sumoilación, nitrosilación y acetilación, entre otras. La proteína SIRT3 es una desacetilasa dependiente de NAD⁺ que se localiza principalmente en la mitocondria, se ha descrito que puede desacetilar a OPA1 para activarlo (Samant et al., 2014), sin embargo también participa en la regulación de la bioenergética mitocondrial al mantener los niveles basales de ATP al asociarse directamente con una subunidad del complejo I y de la ATPasa, esto promueve un aumento en su actividad (Ahn et al., 2008; Wu et al., 2013).

El cisplatino afecta la dinámica mitocondrial, lo cual se ha demostrado en ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* en los cuales induce fisión mitocondrial al aumentar la proteína DRP1 y MFF y promover una mayor fragmentación mitocondrial (Brooks et al., 2009; Morigi et al., 2015), por otro lado, disminuye los niveles de la proteína OPA1 la cual participa en la fusión mitocondrial (Morigi et al., 2015). Además, la administración de cisplatino en ratones provoca una disminución en los niveles de RNA mensajero de SIRT3, esta deficiencia aumenta el daño renal comparado con ratones silvestres, sin embargo el uso de compuestos como el agonista de AMPK o el antioxidante acetyl-L-carnitina inducen un incremento de SIRT3, previniendo la fisión mitocondrial dependiente de DRP1 (Morigi et al., 2015).

1.4. Autofagia

La autofagia es un proceso que lleva a cabo la degradación de proteínas, organelos dañados, además de patógenos localizados en citoplasma (Pattingre

et al., 2008), este proceso ocurre de manera basal en la mayoría de las células, manteniendo su homeostasis (Reggiori et al., 2012). Hay tres tipos de autofagia: la microautofagia, la mediada por chaperonas y la macroautofagia que se denomina sólo como autofagia. Para que se lleve a cabo este proceso requieren proteínas relacionadas con la autofagia (ATG) (Anzell et al., 2017; Pattingre et al., 2008).

1.4.1. Mitofagia

La mitofagia es un tipo de autofagia especializada en degradar mitocondrias dañadas; puede ser inducida cuando hay pérdida o disminución en el potencial de membrana mitocondrial (mtMP), daño al mtDNA y por mal funcionamiento mitocondrial (Anzell et al., 2017; Apostolova y Victor, 2015; Sureshbabu y Bhandari, 2013). Se han identificado diferentes proteínas involucradas en el inicio de la mitofagia: NIX/BCL2 interactúa con proteínas tipo 3 (BNIP3L), proteína 1 que contiene el dominio FUN14 (FUNDC1), cinasa 1 inducida por el homólogo de la fosfatasa y tensina (PTEN) (PINK1)/parkin y BCL2L13 (Bcl-rambo), que de acuerdo a los estímulos se pueden activar, sin embargo las proteínas PINK1 y parkin son las que han sido ampliamente estudiadas e implicadas en la degradación mitocondrial (Durcan y Fon, 2015; McWilliams y Muqit, 2017).

La proteína PINK1 es una cinasa que cuando hay despolarización se acumula en la MEM, promoviendo la fosforilación de parkin que es una ligasa de ubiquitina E3 (Durcan y Fon, 2015; Yamaguchi et al., 2016). Una vez fosforilada parkin puede ubiquitinar proteínas localizadas en la MEM como es el caso de las MFNs y el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC1), entre otras. Estas proteínas ubiquitinadas se unen a la proteína p62, es un adaptador que tiene dominio de unión a proteínas ubiquitinadas y un dominio de unión a cadena ligera 3 de la proteína asociada a microtúbulos (LC3) (Yamaguchi et al., 2016), esta unión promueve la formación del autofagosoma que se fusiona con los lisosomas dando origen a un autofagolisosoma permitiendo la degradación de las mitocondrias dañadas (Fig. 3) (McWilliams y Muqit, 2017).

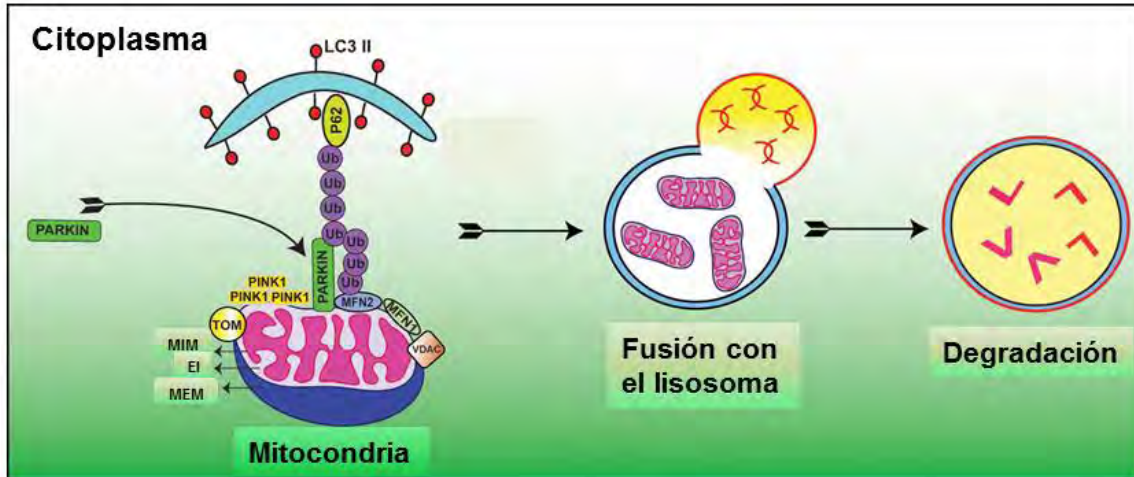


Fig.3. Mitofagia mediada por PINK y parkin. La disminución del potencial de membrana mitocondrial suprime la actividad de TOM y conduce a la acumulación de PINK1 permitiendo la translocación de parkin del citoplasma a la mitocondria donde es activado por PINK1, esto permite que parkin ubiquitine proteínas localizadas en la MEM como MFN y VDAC1. Estas proteínas se unen a P62 y LC3, lo que conlleva a la formación del autofagosomas, unión con el lisosoma y su degradación. MEM: membrana externa mitocondrial, MIM: membrana interna mitocondrial, EI: espacio intermembranal, MFN: mitofusina, VDAC1: canal aniónico dependiente de voltaje 1, LC3: cadena ligera 3 de la proteína1 asociada a microtúbulos, Ub: ubiquitina, TOM: translocasa de la membrana externa. Imagen tomada y modificada de (Sureshbabu y Bhandari, 2013).

Al respecto, células de túbulo proximal renal de humano con bajos niveles de las proteínas PINK1 y parkin tratadas con cisplatino tienen un incremento de apoptosis y una disminución en la viabilidad celular (Zhao et al., 2017), lo que sugiere que la mitofagia tiene un efecto protector en la AKI inducida por cisplatino.

El uso de antioxidantes ha sido una estrategia para disminuir los efectos que produce el cisplatino como el estrés oxidante, producción de ROS y dinámica mitocondrial, entre otros (Morigi et al., 2015; Satoh et al., 2003).

1.5. La curcumina

La curcumina (diferuloilmetano) es el principal componente de la cúrcuma, se obtiene del rizoma de la planta *Curcuma longa* L de la familia Zingiberaceae (Fig. 4), la cual crece en las regiones de la India, China y sureste de Asia. Se ha utilizado en la medicina tradicional China, como condimento (ej. curry), colorante

de comida (E-100) y en cosméticos (Shehzad y Lee, 2013; Trujillo et al., 2013). Estructuralmente está compuesta de dos grupos metoxi, dos hidroxifenol conectados por un puente dicetona α - β -insaturados (Fig. 4.), esta estructura se ha relacionado con su función anti proliferativa y anti inflamatoria (Trujillo et al., 2013).

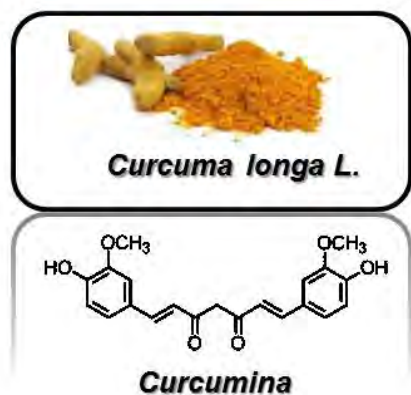


Fig. 4. La curcumina es un polifenol derivado de la *Curcuma longa L.*

La cúrcuma es un polvo de color amarillo-naranja insoluble en agua, contiene del 3-5% de curcuminoides de los cuales el 50-70% es curcumina (Esatbeyoglu et al., 2012; Trujillo et al., 2013). El uso de curcumina se aprobó por la administración de alimentos y medicamentos (FDA) y por la Organización de Alimentos y Agricultura de las Naciones Unidas (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (WHO). Además, su baja toxicidad se evaluó en humanos en los cuales se administraron dosis hasta de 12 g vía oral, teniendo diarrea como efecto colateral (Esatbeyoglu et al., 2012; Lao et al., 2006). Sin embargo, su principal desventaja es su poca biodisponibilidad, principalmente por una baja absorción intestinal, rápido metabolismo en el hígado y eliminación sistémica (Esatbeyoglu et al., 2012; Rezaee et al., 2017).

Algunas de las propiedades de la curcumina que se han demostrado son: anti-inflamatoria, anti-cancerígena, anti-artrítico, y neuro, cardio y nefroprotectora (Rezaee et al., 2017; Trujillo et al., 2013). Como antioxidante bifuncional se ha evaluado que puede actuar directamente atrapando ROS [ej. anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo ($\cdot OH$), y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), entre otros] (Trujillo et al., 2016; Trujillo et al., 2013) y como antioxidante indirecto activa la vía Keap1/factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Keap1/Nrf2)/ elemento de respuesta antioxidante (ARE) induciendo proteínas citoprotectoras y

antioxidantes (ej. superóxido dismutasa, catalasa, y glutatión reductasa, entre otras) (Trujillo et al., 2013).

Los efectos de la curcumina pueden deberse a que afecta vías de señalización, al interactuar con proteínas y modularlas (las induce o inhibe) como son: cinasas (Ej. proteína cinasa C), factores de transcripción (Ej. factor nuclear- κ B), mediadores inflamatorios (Ej. factor de necrosis tumoral α), histonas acetiltransferasas (Ej. P300/CBP), histonas deacetilasas (Ej. HDAC8), DNA y RNA entre otras moléculas (Gupta et al., 2011; Zhou et al., 2011).

1.5.1 La curcumina y su efecto nefroprotector por cisplatino

Se han realizado estudios *in vivo* para evaluar el efecto de la curcumina ante el daño ocasionado por el cisplatino. Se ha encontrado que tiene un efecto nefroprotector al disminuir los marcadores de daño renal BUN, creatinina, molécula 1 de daño renal (KIM1), N-acetil- β -D-glucosaminasa (NAG) y lipocalina asociada con la gelatinasa de neutrófilos (NGAL). Además, disminuye los niveles de peroxidación lipídica (niveles de malondialdehído) y de la nitración de proteína (niveles de 3-nitrotirosina). La curcumina también previene la disminución de las enzimas antioxidantes: catalasa, glutatión reductasa y del factor transcripcional Nrf2 inducido por cisplatino. Por otro lado, disminuye la apoptosis (caspasa 3 activa), previene la fibrosis renal al disminuir las proteínas factor de crecimiento transformante beta (TGF β 1) y colágenos I y IV, y la pérdida de uniones adherentes y de las uniones estrechas inducidas por cisplatino (Topcu-Tarladacalisir et al., 2016; Trujillo et al., 2016). Además, la curcumina disminuye proteínas proinflamatorias (factor de necrosis tumoral α , interleucinas 1 β , 6, 8 y 10) inducidas por cisplatino en AKI (Kumar et al., 2017b; Topcu-Tarladacalisir et al., 2016). En estudios usando mitocondrias aisladas de riñón, la curcumina disminuye la peroxidación lipídica y los niveles de proteínas carboniladas y previene la disminución de la actividad de catalasa inducidos por cisplatino (Waseem et al., 2013).

II. JUSTIFICACIÓN

Aunque se han llevado a cabo estudios acerca del efecto protector de la curcumina por daño renal inducido por cisplatino, aún no se ha detallado si puede modular procesos como la mitofagia y la dinámica mitocondrial en riñón, además de prevenir alteraciones en la bioenergética mitocondrial y si estos están involucrados en el efecto nefroprotector de curcumina en el daño por el cisplatino.

III. HIPÓTESIS

El efecto protector de la curcumina en el daño renal inducido por cisplatino estará dado por la reducción de las alteraciones mitocondriales y la regulación de la dinámica mitocondrial.

IV. OBJETIVO

Determinar si la curcumina previene las alteraciones en la bioenergética y fisión mitocondrial en daño renal inducido por cisplatino.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar en ratas tratadas con cisplatino y curcumina:

1. La función y estructura renal usando pruebas bioquímicas e histológicas.
2. La bioenergética mitocondrial y producción de H_2O_2 en mitocondrias aisladas.
3. Los marcadores de dinámica mitocondrial (FIS1, OPA1 y MFN1) en mitocondrias aisladas.
4. Los marcadores de mitofagia (PINK1 y parkin) en mitocondrias aisladas.
5. La ultraestructura mitocondrial.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Reactivos

Los siguientes reactivos se obtuvieron de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA): Curcumina Cat. C1386 lote # SLBN7214V pureza del 78% determinado por HPLC, cisplatino Cat. P4394 lote # MKBV344KV), glutatión (GSH), azida de sodio, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), NADH, taurina, ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazino etanosulfónico (HEPES), sacarosa, cloruro de magnesio ($MgCl_2$), safranina O, ácido lactobiónico, antimicina A de *Streptomyces*, hexocinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, ADP, peroxidasa de rábano (HRP), carboximetilcelulosa (CMC), D-manitol, glucosa, Amplex Red, carbonil cianuro 3-clorofenilhidrazona (CCCP), 2,6-diclorofenolindofenol sal sódica hidratada (DCPIP), decil ubiquinona (DUB), albúmina de suero bovino (BSA) libre de ácidos grasos, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), ácido glutámico, percoll, rotenona, malato de sodio, succinato de sodio dibásico, dodecil sulfato de sodio (SDS), anti-VDAC1, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), ácido etilenglicol tetraacético (EGTA), 4-nonil-fenil-polietilenglicol (NP-40), Tris base, desoxicolato de sodio, piruvato de sodio, inhibidor de proteasas y oligomicina. De JT Baker (Center Valley, PA, EUA) se compraron: ácido etilendiaminotetraacético disódico (Na_2EDTA), cloruro de sodio ($NaCl$), fluoruro de sodio (NaF), ortovanado de sodio (Na_3VO_4), tween 20, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y fosfato monopotásico (KH_2PO_4). El cianuro de potasio (KCN) se adquirió de Mallinckrodt AR (St. Louis, MO, EUA). El pentobarbital de sodio se compró de Sedalpharma (Edo. México, México).

Los anticuerpos anti-OPA1, anti-FIS1, anti-PINK1, anti-SIRT3, anti-MFN1 se obtuvieron de la compañía Santa Cruz (Dallas, TX, EUA). Los anticuerpos anti-lisinas acetiladas, anti conejo y anti cabra se compraron de la compañía Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EUA). El anticuerpo anti-parkin se adquirió de Abcam (Cambridge, MA, EUA). El marcador de peso molecular proteico preteñido CSL-BBL se adquirió de Cleaver Scientific Ltd (Warwickshire, Reino Unido). Las membranas de fluoruro de polivinilideno PVDF Immobilon-P se adquirió de

Millipore (Billerica, MA, EUA). El sustrato de la HRP quimioluminiscente ECL se obtuvo de Bio-Rad (Hercules, CA, EUA). La resina epóxica EMbed 812 se adquirió de Electron Microscopy Science (Hatfield, PA, EUA).

6.2. Modelos de estudio

Los experimentos con animales se realizaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y el Comité de Ética Local (FQ / CICUAL / 069/13). Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso corporal inicial de 200-250 g, se mantuvieron con ciclos 12/12 h luz/ oscuridad a $22\pm 1^{\circ}\text{C}$. Los animales recibieron agua y alimento *ad libitum*. Se estudiaron cuatro grupos de ratas: (1) Las ratas del grupo vehículo (VEH) se administraron por vía oral con CMC al 0,05% y con solución salina isotónica vía intraperitoneal (i.p.). (2) Las ratas del grupo cisplatino (CIS) se administraron vía i.p. con una sola dosis de cisplatino (5 mg/kg) disuelto en solución salina isotónica. (3) Las ratas del grupo de la curcumina más cisplatino (CUR + CIS) se trataron con curcumina (200 mg/kg/día) suspendida en CMC al 0,05% vía oral durante 3 días consecutivos y con cisplatino (5 mg/kg). (4) Las ratas del grupo curcumina (CUR) se trataron con curcumina (200 mg/kg/ día) durante 3 días consecutivos (Fig. 5). Las dosis de cisplatino y curcumina se eligieron de acuerdo a un estudio previo de nuestro laboratorio (Trujillo et al., 2016). Las ratas se sacrificaron 72 horas después de la inyección de cisplatino.

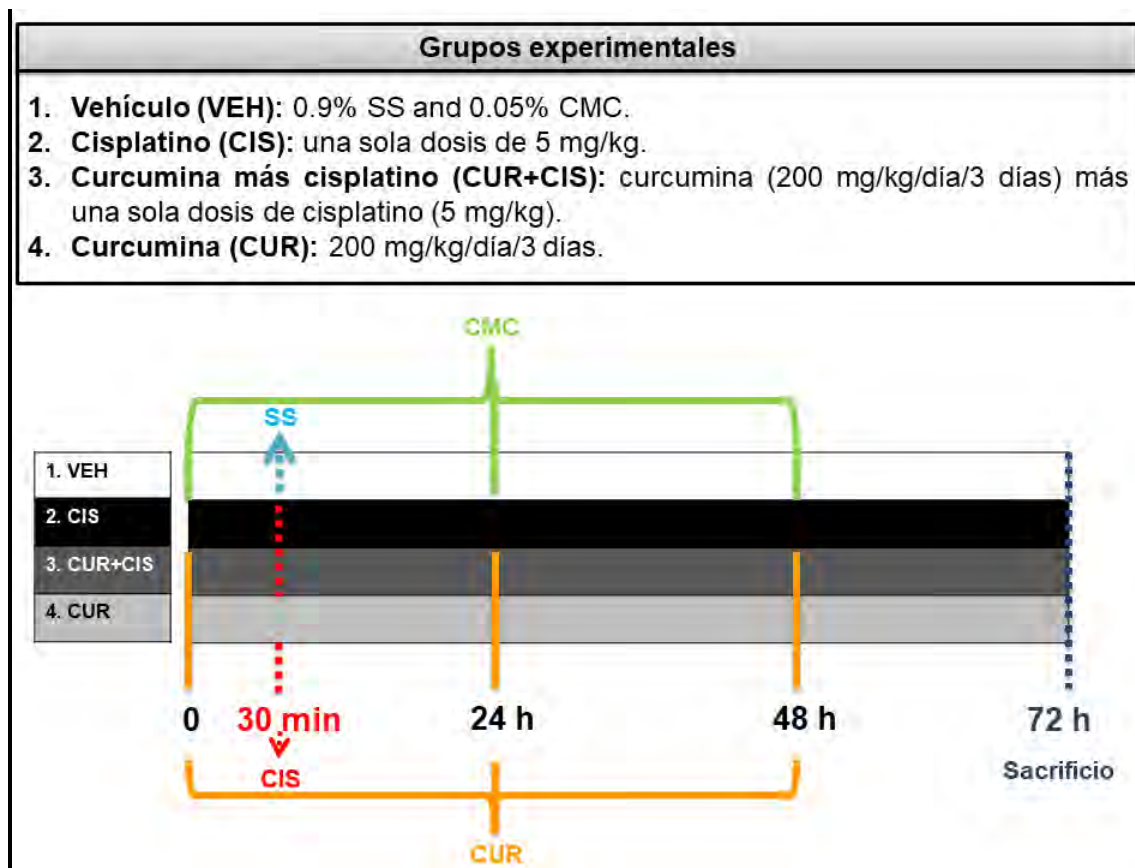


Fig. 5. Esquema experimental. La administración de curcumina fue vía oral, mientras que la del cisplatino fue vía intraperitoneal. SS: Solución salina; CMC: carboximetil celulosa.

6.3. Creatinina y BUN

Como marcadores de daño renal se determinó la concentración de creatinina en plasma y de nitrógeno ureico en sangre (BUN) en plasma, usando el analizador automático clínico ILab 300 Plus (Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, USA).

6.4. Glutación peroxidasa (GPx)

Su actividad se midió siguiendo la desaparición del NADPH en una reacción acoplada a la glutación reductasa (GR) (Fig. 6, Lawrence y Burk, 1976). Para esto se preparó una mezcla de reacción (EDTA 1 mM, azida de sodio 1 mM, GSH 1 mM, NADPH 0.2 mM y GR 1 U/ml en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.4). Se realizó una dilución 1:20 del plasma, posteriormente se colocaron 35 µl del plasma o del blanco en una placa de 96 pozos y se adicionaron 300 µL de mezcla de reacción y el ensayo se inició por la adición de 25 µL de una solución 1.25 mM de

H₂O₂. Las lecturas se realizaron cada minuto por 3 minutos a una absorbancia de 340 nm, los datos se expresaron como U/ml.

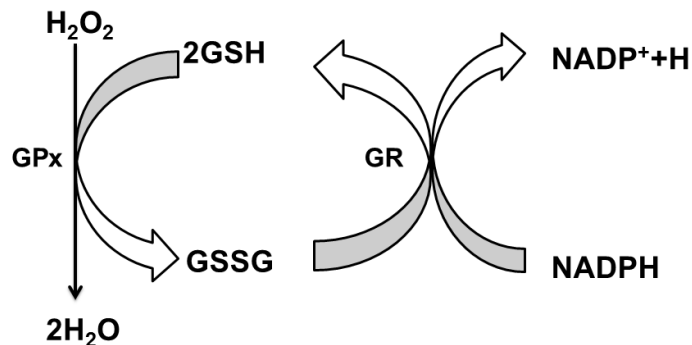


Fig. 6. Reacción de la glutatión peroxidasa. La GPx reduce el H₂O₂, consumiendo GSH, el cual se regenera por medio de GR a partir de GSSG, en este proceso se consume NADPH. GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado H₂O₂: peróxido de hidrógeno, H₂O: agua, GPx: glutatión peroxidasa, GR: glutatión reductasa, NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

6.5. Histologías y microscopía electrónica

Las histologías se realizaron de acuerdo a un estudio previo (Aparicio-Trejo et al., 2016). Los riñones se lavaron por perfusión con una solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) a pH 7.4, posteriormente se perfundieron en una solución de paraformaldehído al 4% pH 7.2.

Para realizar las histologías se cortó la corteza renal en pequeños fragmentos, se deshidrataron y se embebieron en parafina. Se tiñeron secciones delgadas de 4 μm con hematoxilina y eosina y se examinaron al microscopio de luz Leica a un aumento de 400X.

Para la microscopía electrónica se utilizaron fragmentos de corteza renal y se fijaron por inmersión en glutaraldehído al 2.5% disuelto en medio de cacodilato 0.15 M, pH 7.2, post fijado en OsO₄ al 1%, se deshidrataron en diferentes concentraciones de etanol y se embebieron en resina epóxica (EMBED 812). Se obtuvieron secciones ultradelgadas con el microtomo Leica EM UC7, se realizó el contraste con acetato de uranilo al 2% y citrato de plomo, y se examinaron con el

microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai G2 Espiritu (Hillsboro, Oregón, USA).

6.6. Aislamiento de mitocondrias

Se obtuvieron los riñones y se les retiró la cápsula. Todo el procedimiento se realizó a 4°C de la manera descrita previamente (Aparicio-Trejo et al., 2016; Fernandez-Rojas et al., 2015; Granados-Castro et al., 2016). Se cortó y se separó la corteza renal, que se colocó en 2 ml de la solución de medio de aislamiento "A" (D-manitol 225 mM, sacarosa 75 mM, EDTA 1 mM, HEPES 11 mM, BSA al 0.05%, pH = 7.4) y se homogeneizó. El homogenado se centrifugó durante 5 minutos, después se recolectó el sobrenadante y se centrifugó por 10 minutos a 7,200 g. El botón resultante se resuspendió en percoll al 12% preparado con medio de aislamiento "A". Dicha solución se colocó cuidadosamente sobre una cama de 1.5 ml de percoll al 24% preparado con el medio de aislamiento "A", generándose 2 fases, se centrifugó a 9,000 g durante 15 min sin freno. Finalmente se obtuvo una fracción enriquecida con mitocondrias (parte inferior) que se resuspendió en medio de aislamiento sin BSA ni EDTA (medio "B") y se centrifugó a 7,200 g durante 5 min para lavar la fracción mitocondrial. El botón resultante se resuspendió en 100 µl de medio de aislamiento B. La proteína se cuantificó por el método de Lowry.

6.7. Respiración mitocondrial (oximetría)

La determinación del consumo mitocondrial de O₂ se realizó utilizando un microelectrodo de tipo Clark en agitación y temperatura constante de 37°C (Strathkelvin Instruments, Motherwell, NL, Escocia) como previamente se describió (Fernandez-Rojas et al., 2015). Los aislados mitocondriales (15 a 30 µg de proteína total) se cargaron en la cámara con 100 µl de medio de respiración (manitol 220 mM, sacarosa 70 mM, KH₂PO₄ 10 mM, MgCl₂ 5 mM y BSA libre de ácidos grasos al 0.1%, pH= 7.2). La cadena de transporte de electrones se inició por adición de los sustratos respiratorios succinato 10 mM con rotenona (1 µg/ml) para inhibir el complejo I o con una mezcla de glutamato 10 mM y malato de sodio 10 mM. La respiración en el estado 3 se estimuló por la adición de ADP 200 µM. Para inducir la respiración desacoplada se empleó CCCP 10 µM. Las velocidades de respiración se expresaron en ng-átomos de oxígeno/minutos/mg de proteína

(ng atm/min/mg). El índice del control respiratorio (ICR) se calculó con la fórmula estado 3/estado 4.

6.8. Actividad enzimática del complejo respiratorio mitocondrial I

La medición de la actividad del complejo I está basada en la capacidad del complejo I en oxidar NADH mientras reduce DUb a DUbH₂, que es oxidado por el DCPIP el cual absorbe a 600 nm (Fig. 7), se realizó la medición de la manera descrita previamente (Aparicio-Trejo et al., 2016).

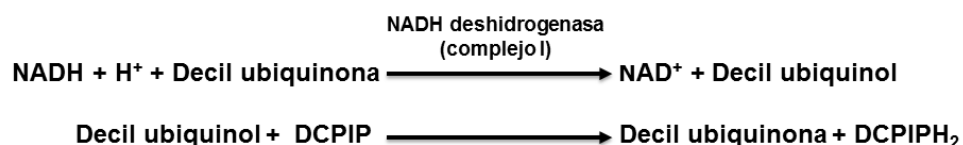


Fig. 7. Medición de la actividad del complejo I por medio de 2,6-diclorofenol indofenol sal sódica (DCPIP).

Las mitocondrias aisladas se rompieron por ciclos de congelamiento y descongelamiento. Se utilizaron 24 µg de proteína mitocondria que se añadieron a una solución de fosfato de potasio (pH 7.4) con BSA (3.5 mg/ml), DCPIP 67 µM, antimicina A 1 µM, NADH 0.2 mM y KCN 0.2 mM. Se añadió rotenona 12 µM en pozos paralelos para inhibir complejo I y se determinó la actividad no enzimática. La mezcla se incubó por 5 minutos a 37°C y se realizó una cinética, tomando lecturas cada 30 segundos por 2 minutos a 600 nm. La reacción se inició por la adición de DUb 3.12 mM y se evaluó la absorbancia cada 30 segundos por 3 min. Todas las mediciones se realizaron a 37°C usando el lector de microplacas (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA). La actividad (A) se calcula de la siguiente manera:

$$A = (\Delta \text{Abs}/\text{min})(1000) / (\text{mg prot}^* \epsilon \text{DCPIP})$$

Siendo ϵDCPIP el coeficiente de extinción molar del DCPIP = 19.1 mM⁻¹ cm⁻¹

6.9. Potencial de membrana mitocondrial

La evaluación de los cambios en el potencial de la membrana mitocondrial se realizó de manera indirecta utilizando los cambios en la fluorescencia a 485-590

nm del colorante catiónico safranina O (10 μ M); se realizó protocolo como se describió previamente (Krumschnabel et al., 2014). La reacción se llevó a cabo con 115 μ g mitocondrias aisladas en fresco las cuales se añadieron a medio de respiración, se determinaron los cambios en la fluorescencia utilizando el equipo O2k-Fluormometer (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). Como sustrato se usó malato-glutamato o succinato, para el desacoplamiento mitocondrial se utilizó CCCP 2.5 μ M.

6.10. ATP sintasa

La actividad de la ATP sintasa se evaluó midiendo la reducción de NADP⁺ a 340 nm en una reacción acoplada a la actividad de la hexocinasa y la G6PDH (Fig. 8.), se realizó de la manera descrita previamente (Fernandez-Rojas et al., 2015; Granados-Castro et al., 2016).

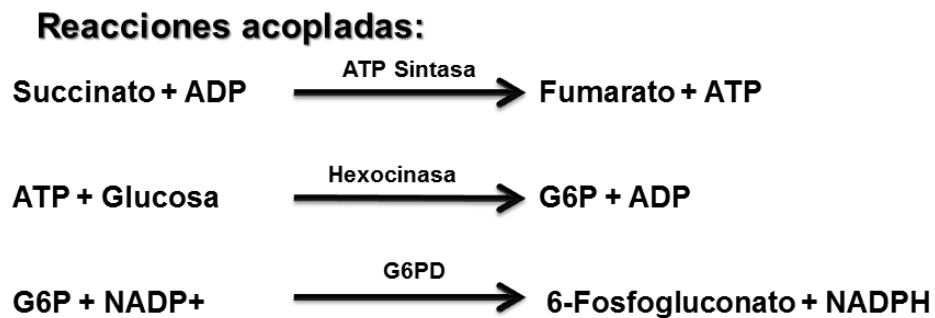


Fig. 8. Reacciones acopladas para evaluar la actividad de ATP sintasa de manera indirecta. G6P: glucosa 6 fosfato, G6PD: glucosa 6 fosfato deshidrogenasa.

En cada pozo se colocaron 190 μ l del medio ATP (hexocinasa 9 U/ml, glucosa 2 M, succinato 0.7 M, G6PDH 2.3 U/ml y NADP⁺ 1.8 mM en medio de respiración). Se realizó una cinética basal (sin adición de ADP) y se midió por 3 minutos, la reacción se inició con ADP 1.2 mM y se midió cada 30 s por 3 min, se utilizó oligomicina 20 μ M como inhibidor específico y se siguió la cinética con oligomicina por 3 min cada 30 s. Las mediciones se realizaron a 37°C usando el lector de microplacas Synergy-Biotek. La actividad de la enzima total se calculó como la actividad sin inhibidor menos la actividad enzimática con inhibidor presente. La actividad de la enzima se calculó como:

$$A = (\Delta \text{Abs}/\text{min})(1000) / (\text{mg prot}^* \epsilon \text{NADPH})$$

Siendo ϵNADPH el coeficiente de extinción molar del NADPH = $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

6.11. Producción de H₂O₂ por la mitocondria

Para determinar la producción de H₂O₂ mitocondrial se utilizó la técnica basada en la oxidación del Amplex Red en presencia de H₂O₂ para producir resorufina, compuesto cuya fluorescencia puede ser seguida a una longitud de 530-590 nm (Makrecka-Kuka et al., 2015). Para realizar la determinación se utilizó el amortiguador miR06 pH 7.2 (EDTA 0.5 mM, MgCl₂ 3 mM, ácido lactobiónico 60 mM, taurina 20 mM, HEPES 20 mM, sacarosa 110 mM, BSA libre de ácidos grasos al 1%, Amplex Red 10 μM y HRP 0.5 U/ml). Se realizó una titulación con diferentes concentraciones de H₂O₂. Después de calibrar, se adicionaron las mitocondrias aisladas en fresco y se realizó la medición de la producción basal de H₂O₂. Para la producción de H₂O₂ en estado 4 se utilizó glutamato de sodio 10 mM, malato de sodio 10 mM y piruvato de sodio 10 mM (PMG) que son sustratos del complejo I (estado 4 CI-linked). Después, se añadió ADP a saturación (2.5 mM) para mantener la OXPHOS, así se determinó la producción de H₂O₂ en estado 3 con sustratos para complejo I (estado 3 CI-linked). Posteriormente se añadió succinato de sodio 10 mM para determinar la producción en estado 3 complejo I más complejo II (estado 3 CI+CII-Linked). Finalmente, se agregó oligomicina 2.5 μM para determinar la producción en el estado 4o con sustratos para complejo I y II (estado 4o CI+CII). La producción de H₂O₂ atribuida al complejo II en estado 3 se calculó de la siguiente manera: (estado 3 CI+CII-Linked)-(estado 3 CI-linked). Las unidades se expresaron en picomol/segundo por miligramo de proteína (pmol/s*mg de proteína).

6.12. Extracción de proteínas y western blot

El lisado de las mitocondrias se realizó con amortiguador de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) 1X: Tris 50 mM, pH 8.0, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, EGTA 1 mM, NaF 5 mM, Na₃VO₄ 1 mM, PMSF 1 mM, inhibidores de proteasas, desoxicolato de sodio al 0.5%, SDS al 0.1%, NP-40 al 1%) (Molina-Jijon et al., 2016). Se sonicaron las muestras 3 veces por 5 segundos, para

posteriormente centrifugarse a 14,000 g por 15 minutos. Los extractos proteicos se cuantificaron por Lowry.

Al extracto proteico se le añadió Laemmli y se hirvieron, posteriormente se llevó a cabo la electroforesis usando geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 10 y 15%, se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas se incubaron toda la noche con los anticuerpos específicos contra OPA1 (1:1,000), MFN1 (1:1,500), PINK1, lisinas acetiladas y SIRT3 (1:5,000) y FIS1, parkin y VDAC1 (dilución 1:2,000), posteriormente se incubaron con anticuerpos secundarios acoplados a la enzima peroxidasa (dilución 1:2,000 ó 1:10,000) que se detectó empleando el ensayo de quimioluminiscencia (Amersham ECL™ prime Western blotting detection reagent, GE health care, lifescience, Chicago, IL, EUA). Las densitometrías se realizaron con el software Image Studio Lite Ver 5.2 y con el software Image J.

6.13. Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media \pm el error estándar de la media (SEM). Los valores $p < 0.05$ se consideraron significativos. Se realizaron los análisis estadísticos con el programa GraphPad Prism 5, se empleó la prueba ANOVA de una vía seguido de una prueba Tukey.

VII. RESULTADOS

7.1. La curcumina disminuye el daño renal inducido por cisplatino

Se evaluaron en plasma los niveles de BUN, creatinina y la actividad de GPx como marcadores de daño renal. El daño renal inducido por cisplatino se hizo evidente por el aumento de creatinina (Figura 9A) y BUN (Figura 9B); este aumento fue prevenido por la administración de curcumina. Sin embargo no hubo cambio significativo en los niveles de GPx en plasma ya sea con cisplatino o tratamiento con curcumina (Figura 9C).

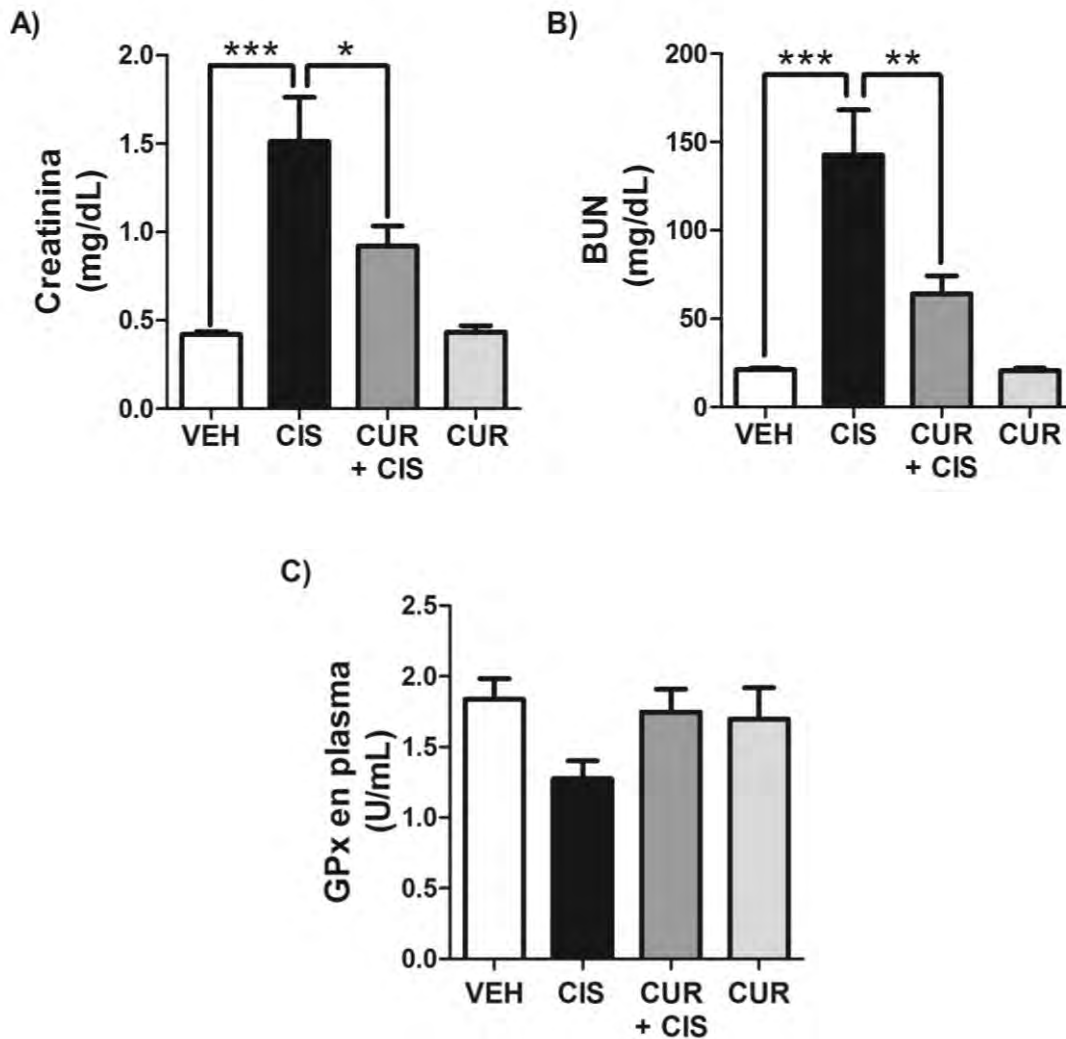


Fig. 9. Función renal. (A) Creatinina, (B) BUN y (C) GPx en plasma. Se utilizaron 200 mg/kg de curcumina vía intragástrica y 5 mg/kg de cisplatino vía

intraperitoneal. U: unidades. Los datos se presentan como la media \pm SEM, n=5-6. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Los estudios histológicos de los riñones de rata tratadas con cisplatino (Fig. 10, panel inferior izquierdo) en comparación con el grupo VEH (Fig. 10, panel superior izquierda) revelaron células epiteliales del túbulo proximal con pronunciada hinchazón, además con marcadas vacuolizaciones citoplasmáticas (señalados con un asterisco), algunas células necróticas y restos celulares en el lumen tubular. En contraste, los riñones del grupo CUR+CIS presentaron túbulos con células con mínimas vacuolizaciones (señaladas con una flecha), sin células necróticas evidentes (Fig. 10, panel inferior derecho). El grupo CUR (Fig. 10, panel superior derecho) no presentaron ninguna anomalía en el corte histológico. Estos resultados nos confirman el efecto protector de la curcumina sobre el daño renal producido por cisplatino.

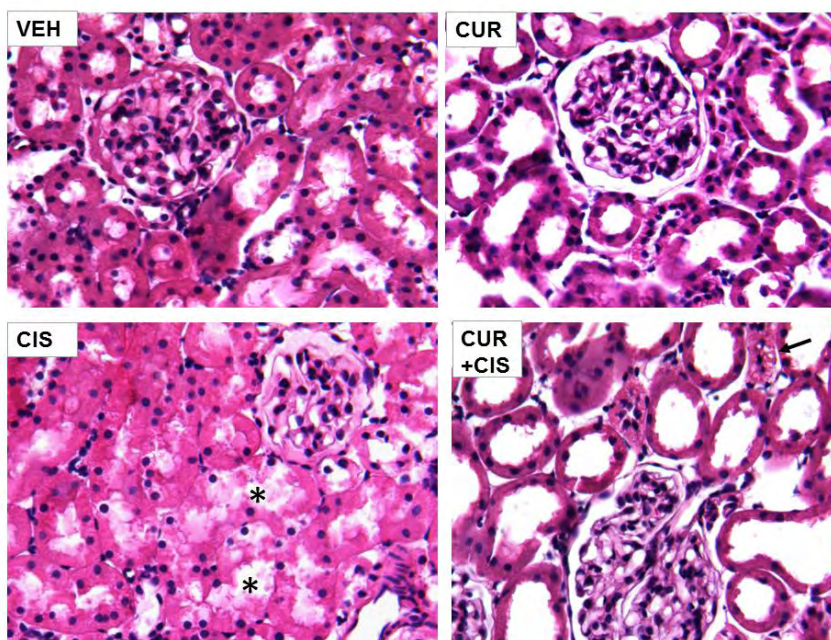


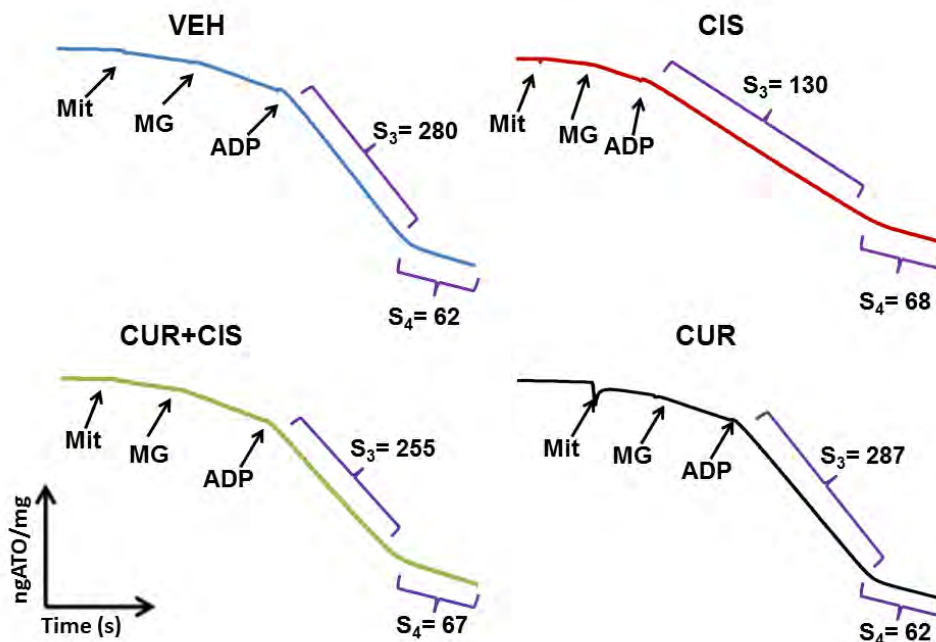
Fig. 10. Micrografías representativas de histologías de corteza de riñón. Tinción de hematoxilina/eosina. 400X.

7.2. La curcumina recupera el consumo de oxígeno y la fosforilación oxidativa en mitocondrias tratadas con cisplatino

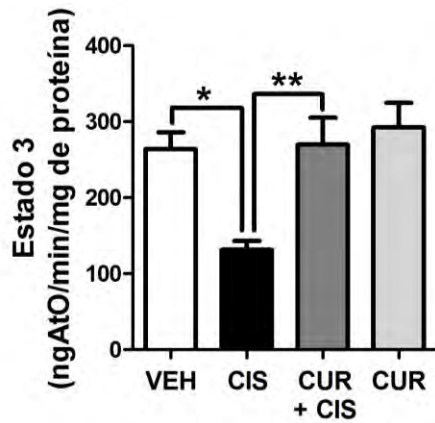
Para evaluar el efecto de cisplatino sobre la bioenergética mitocondrial se evaluó el consumo de oxígeno mitocondrial. Las gráficas representativas del consumo de oxígeno mitocondrial usando malato-glutamato (MG) como sustrato se presentan

en la Fig. 11A. El tratamiento con cisplatino disminuyó el consumo de oxígeno en el estado 3 (Fig. 11B), mientras que el estado 4 no presentó cambios (Fig. 11C). El ICR (Fig. 11D) y la relación ADP/O (Fig. 11E) disminuyeron, lo que sugiere que la capacidad OXPHOS está comprometida en el grupo CIS. Al evaluar la respiración desacoplada usando CCCP, observamos que en el grupo CIS hubo una disminución, sin embargo esta no fue significativa (Fig. 11F). Estas alteraciones fueron contrarrestadas con el tratamiento con curcumina, sugiriendo que puede mantener la capacidad OXPHOS. Finalmente, estos parámetros no cambiaron en el grupo CUR. También se evaluó el consumo de oxígeno usando como sustrato succinato más rotenona, se encontró que el cisplatino induce un incremento en el estado 4 y disminuye el ICR (Tabla 1). Sin embargo curcumina no atenuó estas alteraciones.

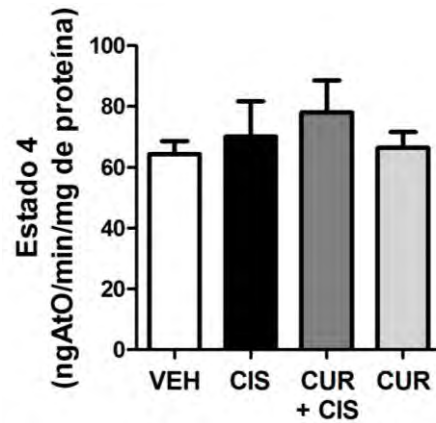
A)



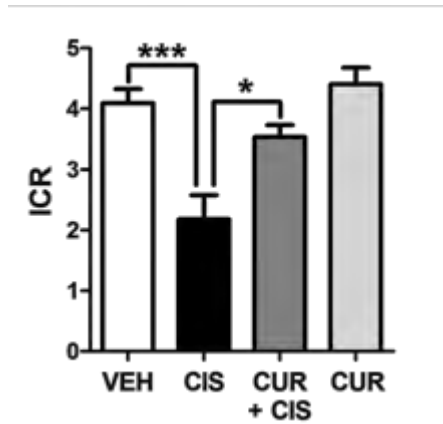
B)



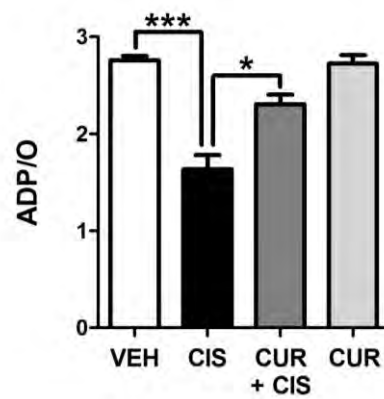
C)



D)



E)



F)

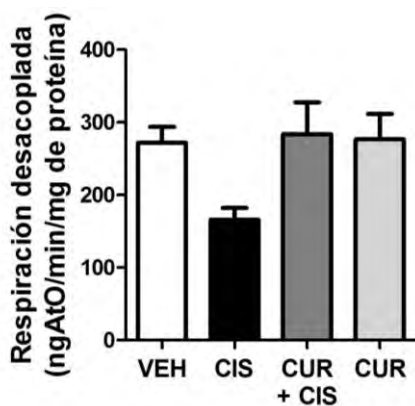


Fig. 11. Consumo de oxígeno mitocondrial utilizando como sustrato malato-glutamato. (A) Trazos representativos del consumo de oxígeno. Mitocondria (Mit), malato-glutamato (MG), adenosín difosfato (ADP). (B) Estado 3. (C) Estado 4. (D) Índice de control respiratorio (ICR). (E) Proporción ADP/oxígeno (ADP/O). (F)

Respiración desacoplada con carbonilcianuro 3-clorofenilhidrazona (CCCP). Los datos se presentan como la media±SEM, n=6-7. *p<0.05, **p<0.01; ***p<0.001.

Tabla 1. Consumo de oxígeno mitocondrial usando succinato como sustrato.				
	VEH	CIS	CUR+CIS	CUR
Estado 3	355.80±33.88	386.30±22.54	340.50±34.59	377.30±26.61
Estado 4	90.50±9.12	125.70±7.52*	101.30±10.55	93.86±6.69
ICR	3.94±0.10	3.15±0.27*	3.40±0.20	4.03±0.15
Respiración desacoplada	400.00±42.99	425.30±27.38	385.70±50.73	387.30±47.29
ADP/O	1.89±0.04	1.61±0.11	1.69±0.08	1.89±0.05

Consumo de oxígeno mitocondrial (estados 3 y 4 y respiración desacoplada en ngAtO/min/mg de proteína). Índice del control respiratorio (ICR). Adenosín difosfato/oxígeno (ADP/O). Media±SEM, n=6-7. *p<0.05 vs. VEH.

7.3. La curcumina mantiene la actividad del complejo I y el potencial transmembranal en mitocondrias tratadas con cisplatino

Debido a que las alteraciones en el consumo de oxígeno se encontraron mayormente cuando se alimentó el complejo I, se evaluó su actividad. Se encontró que el cisplatino indujo una disminución en la actividad del complejo I, sin embargo la curcumina previno esta disminución (Fig. 12A). Para confirmar el efecto de cisplatino en la capacidad OXPHOS, se evaluó la actividad de la ATP sintasa y del mtMP usando MG como sustrato. El tratamiento con cisplatino disminuyó la actividad de la ATP sintasa y del mtMP, sin embargo el tratamiento con curcumina evitó la disminución en el mtMP (Fig. 12B), aunque no previno la disminución en la actividad de la ATP sintasa (Fig. 12C). En el grupo CUR no hubo cambios significativos en estos parámetros. El mtMP también se evaluó con el sustrato succinato sin embargo no hubo cambios en ninguno de los tratamientos (Fig. 12D).

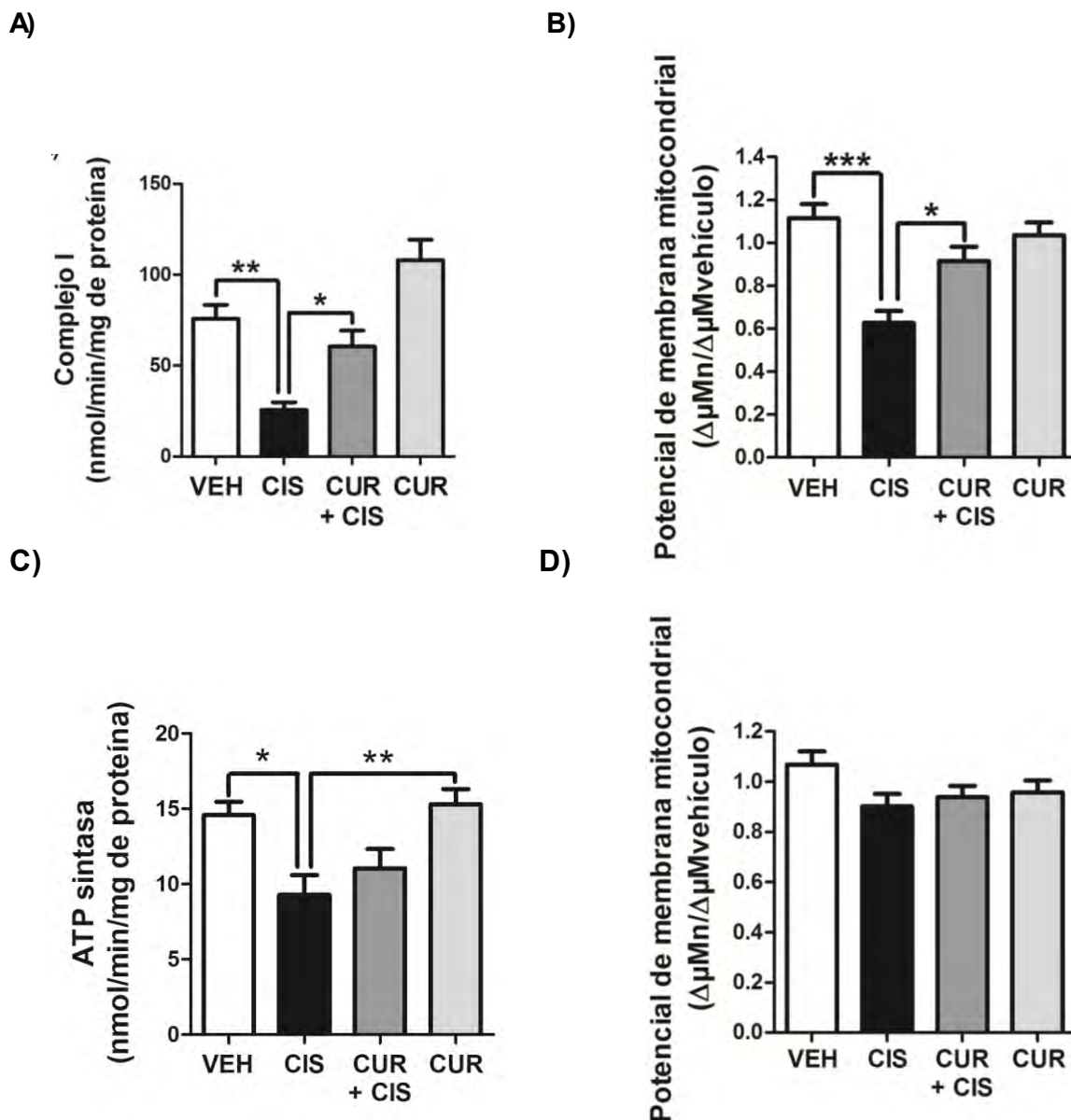


Fig. 12. La curcumina previene la disminución en la actividad del complejo I y del mtMP provocadas por cisplatino. (A) Actividad del complejo I. (B) Potencial de membrana mitocondrial utilizando malato-glutamato como sustrato (C). Actividad de la ATP sintasa. (D) Potencial de membrana mitocondrial usando succinato como sustrato. Los datos se presentan como la media±SEM, n=5-6. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

7.4. La curcumina disminuye la producción de H₂O₂ inducido por cisplatino

Debido a que el cisplatino altera la bioenergética mitocondrial, se decidió analizar si estas alteraciones provocaban un aumento de ROS, específicamente sobre la producción de H₂O₂. En la Fig. 13A se presentan trazos representativos de la producción de H₂O₂ en los grupos experimentales VEH (azul) y CIS (marrón), y en

la Fig. 13B se presenta CIS (marrón) y CUR+CIS (verde) en la Fig. 13B, los datos cuantitativos se presentan en la figura 14. El tratamiento con cisplatino indujo la producción de H₂O₂ en casi todas las condiciones: basal (sin adición de sustrato, Fig. 14A), PMG (estado 4 CI, Fig. 14B), PMG más ADP (estado 3 CI, Fig. 14C.), PMG más ADP y succinato (estado 3 CI+CII, Fig. 14D), y cuando usamos oligomicina para inhibir la ATP sintasa (estado 4 CI+CII, Fig. 14E), sin embargo no hubo cambios significativos en la producción de H₂O₂ en el estado 3 CII (Fig.14F). Todos estos incrementos se previnieron cuando las ratas se trataron con curcumina. El grupo CUR no presentó cambios.

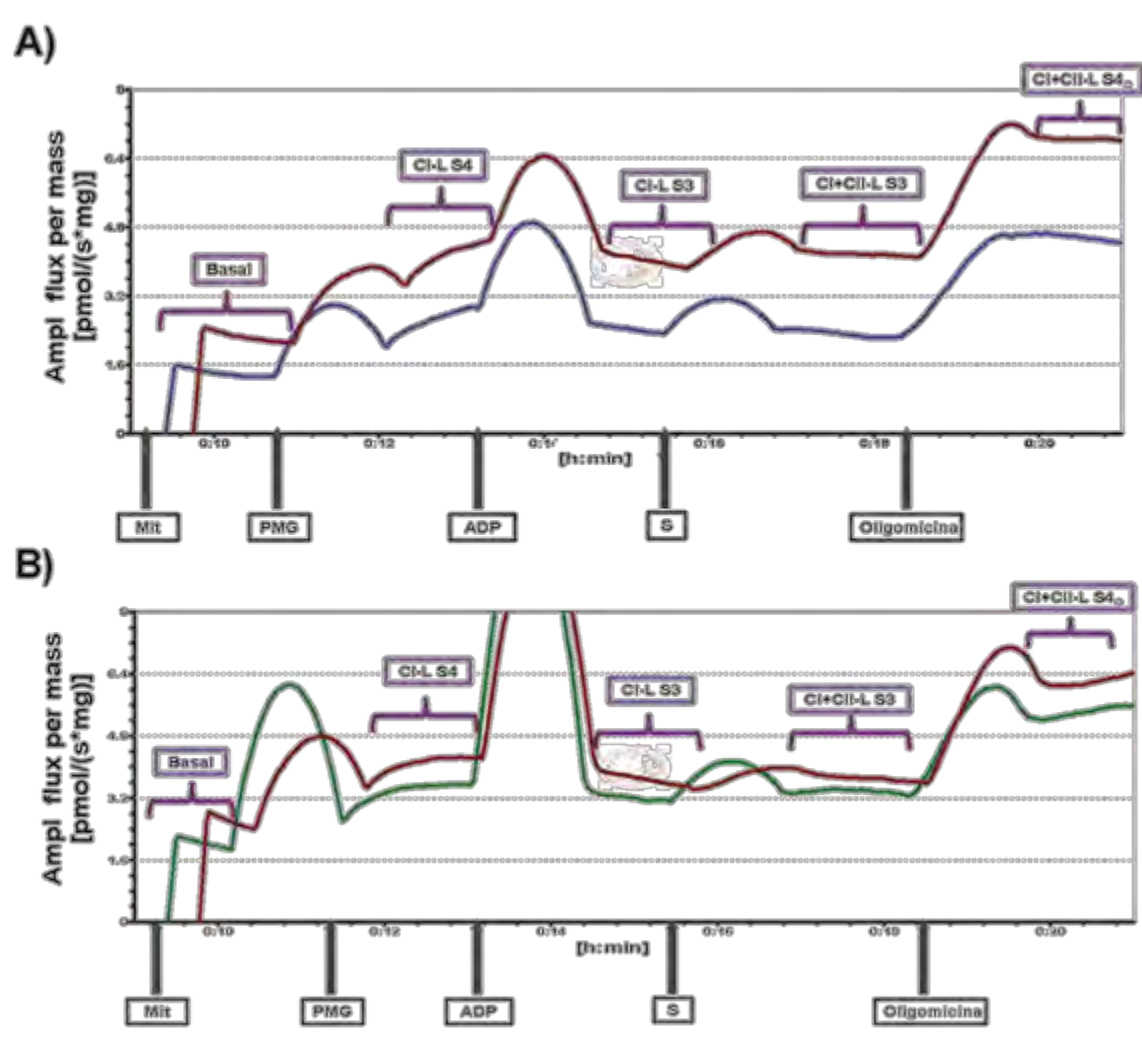


Fig. 13. Producción de peróxido de hidrógeno en los diferentes estados respiratorios. Comparación entre los grupos (A) VEH (azul) y CIS (marrón) y en (B) entre CIS (marrón) y CUR+CIS (verde). Las mitocondrias (mit), el piruvato, el malato y glutamato (PMG), el adenosín difosfato (ADP), el succinato (S), y la oligomicina (inhibidor de la ATP sintasa) se adicionaron secuencialmente. Se uso la sonda Amplex Red. Basal, estado 3 complejo I (CI-L S3), estado 4 complejo I (CI-LS4), estado 3 complejo I+complejo II (CI+CII-L S3), estado 4 complejo I+complejo II-oligomicina (CI+CII-L S4o).

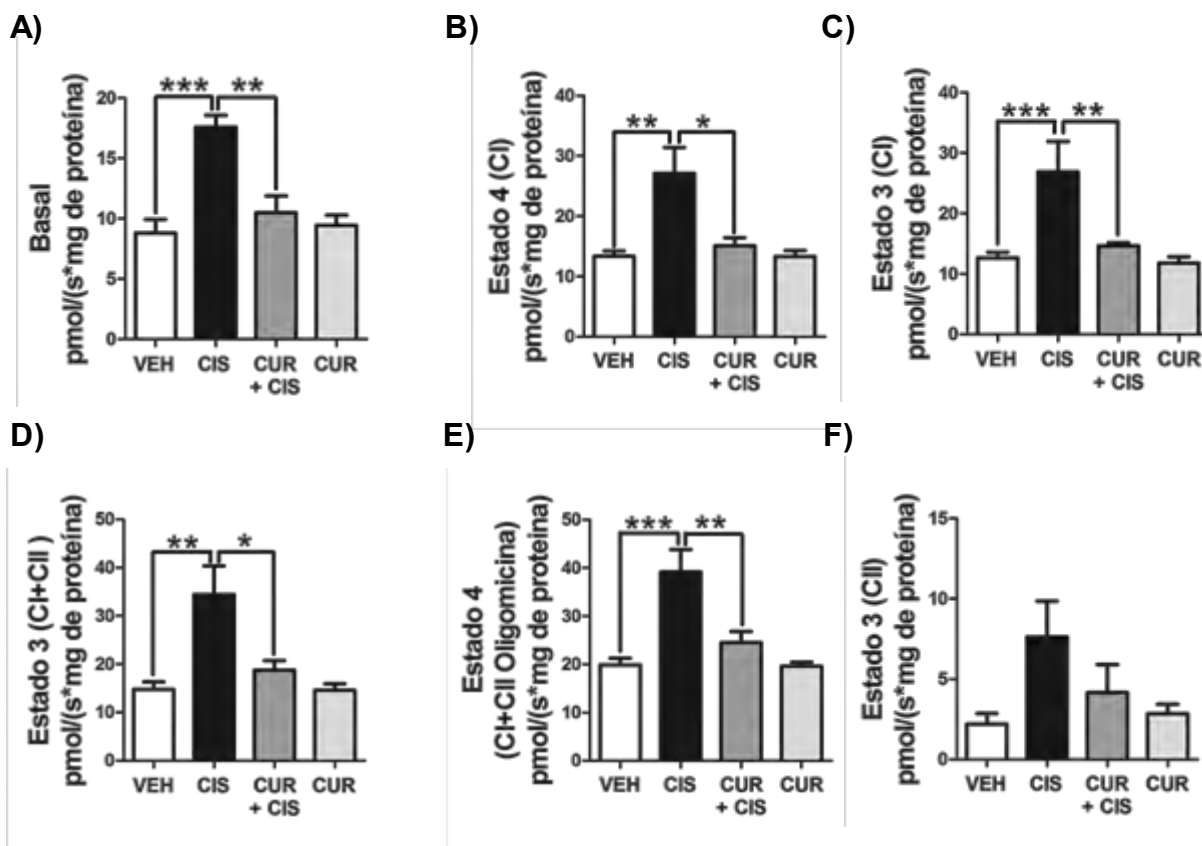


Fig. 14. Producción de peróxido de hidrógeno. Se utilizó Amplex Red como sonda para medir la producción de peróxido de hidrógeno. Los datos se presentan como la media±SEM, n=6. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

7.5. La curcumina previene el aumento de una proteína involucrada en la fisión mitocondrial y la disminución de una proteína involucrada en fusión inducida por cisplatino.

Para establecer si la alteración en el funcionamiento mitocondrial puede estar alterando procesos tales como la dinámica mitocondrial, realizamos western blot de mitocondrias aisladas de corteza renal, para evaluar la abundancia de algunas proteínas implicadas en la dinámica mitocondrial tales como FIS1 (implicada en el

proceso de fisión), OPA1 y MFN1 (implicadas en el proceso de fusión). En la Fig. 15A se observa que el CIS indujo una disminución de OPA1, pero no de los niveles de MFN1 (Fig. 15B). La proteína FIS1 incrementó con el tratamiento de cisplatino (Fig. 15C), sugiriendo un desplazamiento de la dinámica mitocondrial hacia fisión. El tratamiento con curcumina previno la disminución en la proteína OPA1 y el aumento en FIS1. En el grupo de CUR no hubo cambios exceptuando en MFN1, en el cual se presentó un incremento de esta proteína.

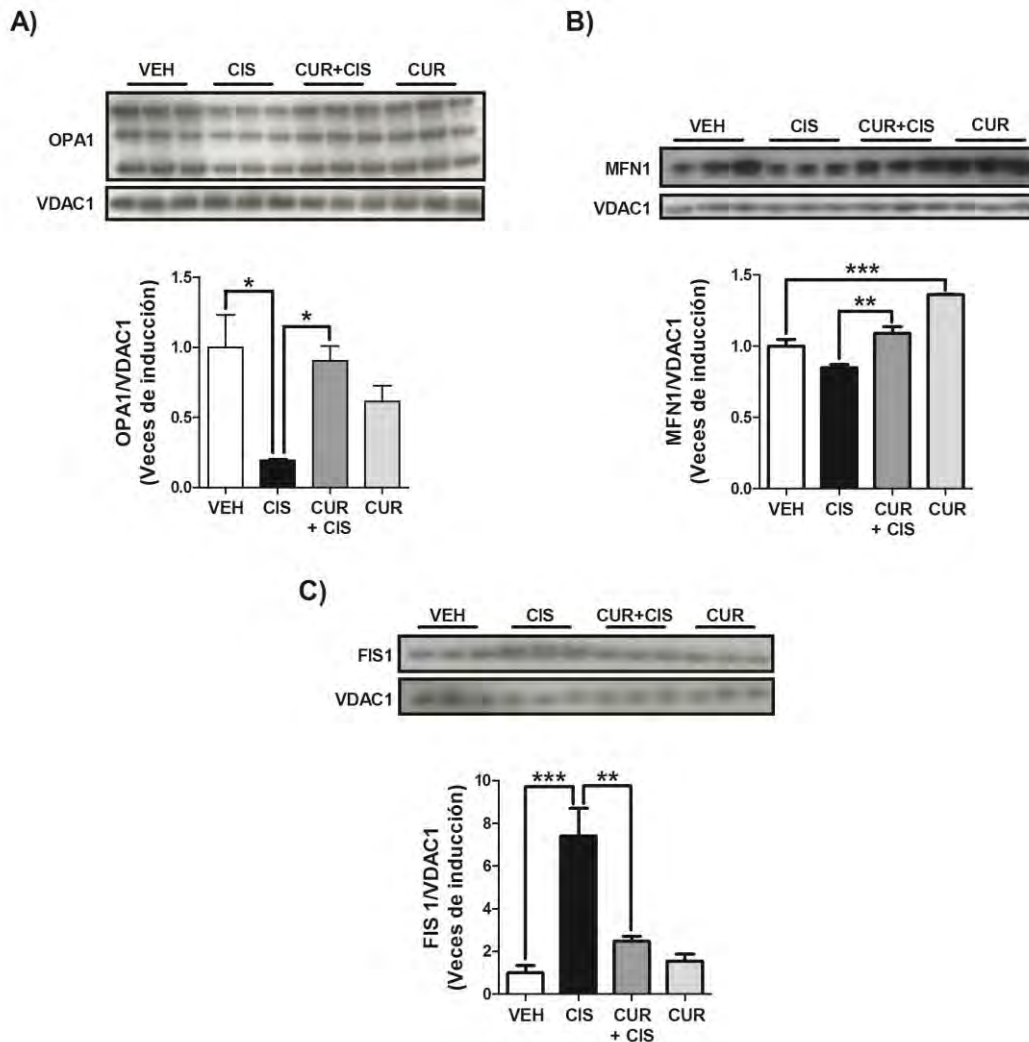


Fig.15. La curcumina previene la disminución de un marcador de fusión (OPA 1) y el aumento de un marcador de fisión (FIS1) inducida por cisplatino. Se realizó western blot y densitometrías de las proteínas involucradas en fusión (A) OPA1, (B) MFN1 y de la proteína implicada en fisión (C) (FIS1), como control de carga se utilizó el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC1). Los datos se presentan como la media±SEM, n=3. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Además, el tratamiento con cisplatino disminuyó la proteína SIRT3 (Fig. 16A y 16B) e incrementó las lisinas acetiladas (Fig. 16A y 16C), esto último sugiere que SIRT3 tiene una menor actividad de desacetilasa. El tratamiento con curcumina previno esta disminución en la proteína SIRT3 y disminuyó los niveles de lisinas acetiladas.

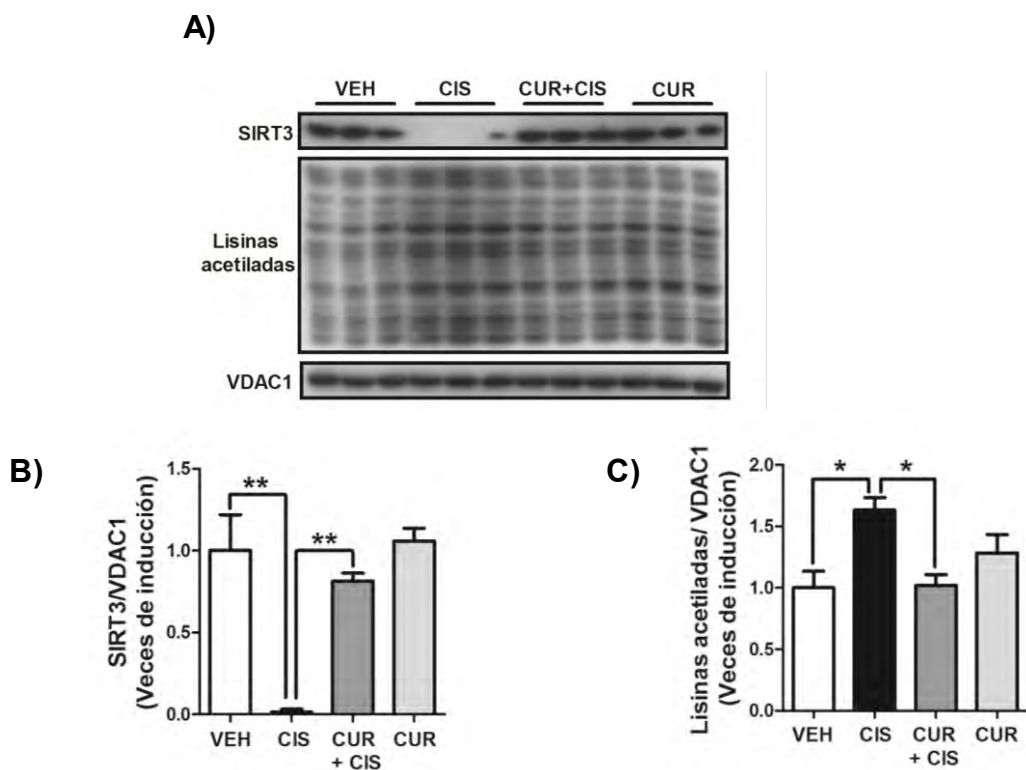


Fig. 16. La curcumina previene la disminución en la proteína SIRT3 y el aumento de lisinas acetiladas. (A) Western blot y densitometría de (B) SIRT3 y de (C) lisinas acetiladas, como control de carga se utilizó el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC1). Los datos se presentan como la media \pm SEM, n=3. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Para evaluar la ultraestructura mitocondrial se realizaron cortes del riñón de los cuatro grupos y se realizó microscopia electrónica; en el grupo VEH se observó que las células y mitocondrias del túbulo proximal tiene apariencia normal (Fig. 17, panel superior izquierdo). El grupo CUR no presentó ningún cambio en la ultraestructura mitocondrial ni en otro organelo celular (Fig.17, panel superior izquierdo). En el grupo CIS, se observaron anomalías mitocondriales en las células del túbulo proximal, además de ruptura de las crestas, fisión y cuerpos

autofágicos (Fig. 17, paneles medios). Estas anomalías fueron menos evidentes en el grupo CUR+CIS (Fig. 17, paneles inferiores).

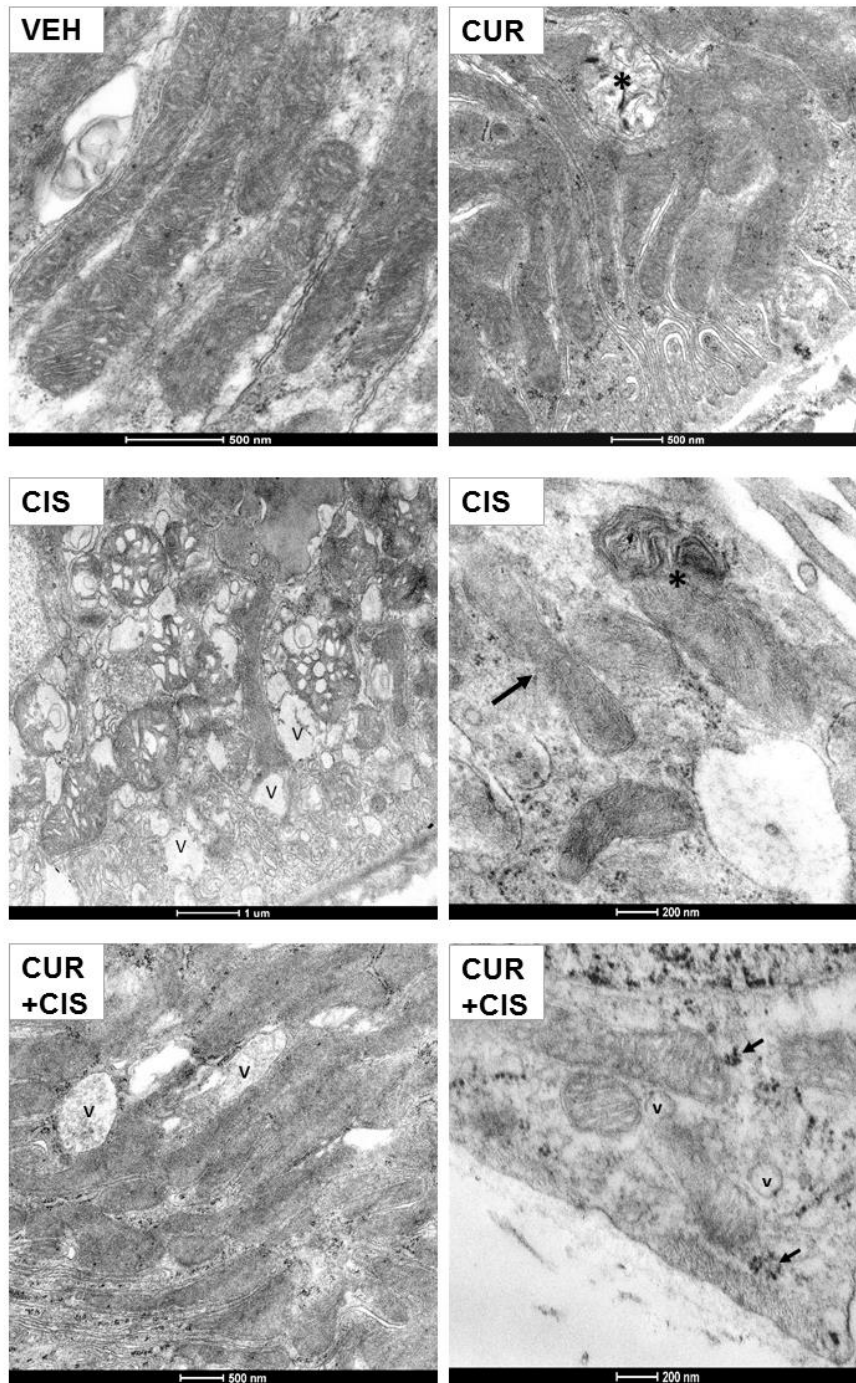


Fig. 17. Micrograffías representativas de microscopia electrónica convencional. Imagen representativa por grupo. Panel superior izquierdo: grupo vehículo (VEH), en el panel superior derecho, grupo curcumina (CUR), se muestra una vacuola de doble membrana que corresponde a un autofagosoma (asterisco). Panel medio

izquierdo, grupo cisplatino (CIS), hay numerosas mitocondrias con sus crestas rotas y alrededor vacuolas vacías (V) delimitadas por una delgada membrana. En el panel medio derecho, grupo cisplatino (CIS), es un acercamiento de la micrografía anterior, hay un mitofagosoma (asterisco), y una mitocondria alargada con la parte de en medio en constricción sugiriendo fisión mitocondrial (flecha). En el panel inferior izquierdo, grupo curcumina+cisplatino (CUR+CIS), se presentan algunas vacuolas vacías (V). En el panel inferior derecho se presenta un acercamiento de la micrografía del panel anterior, hay pequeñas vacuolas (V) y numerosos ribosomas (flechas).

7.6. La curcumina evita el aumento en las proteínas involucradas en el inicio de la mitofagia inducida por cisplatino

Las alteraciones mitocondriales (la bioenergética y la dinámica mitocondrial) que se presentaron por la administración de cisplatino, sugerían que la mitofagia se estuviera activando para contrarrestarlas, por lo que evaluamos la presencia de las proteínas PINK1 y parkin. El cisplatino aumentó la expresión de las proteínas PINK1 (Fig. 18A) y parkin (Fig. 18B), y el tratamiento con curcumina evitó este aumento. Este resultado sugiere que se indujo la mitofagia lo cual es consistente con los resultados de microscopía electrónica en los cuales se observaron fagosomas.

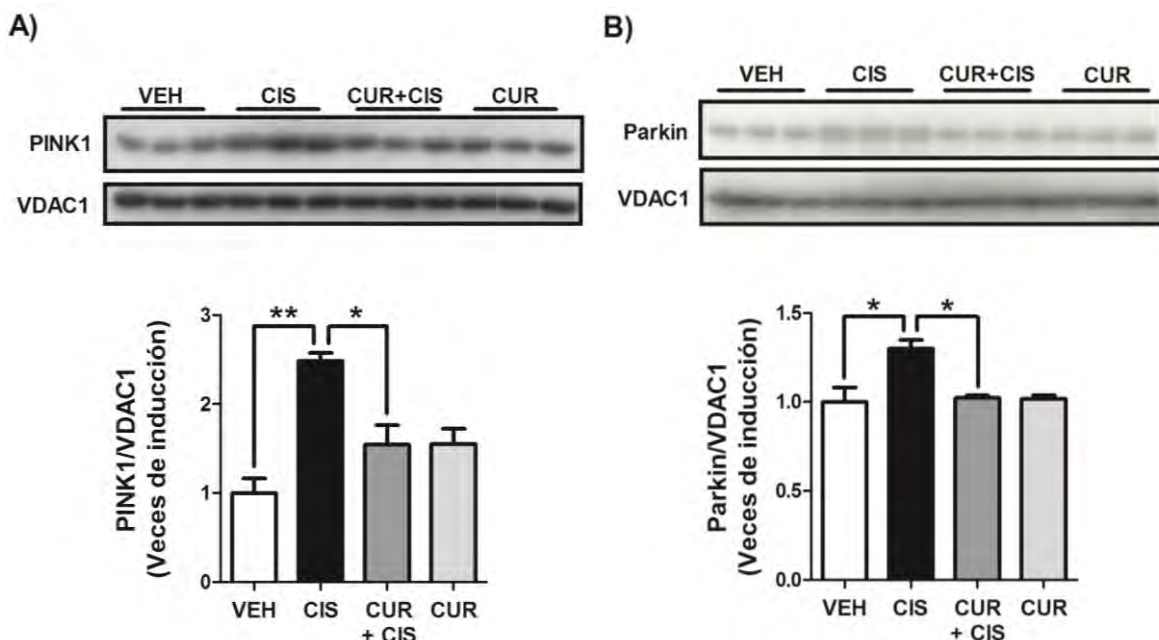


Fig. 18. La curcumina atenúa la mitofagia inducida por cisplatino. Western blot y densitometrias de (A) PINK1 y (B) parkin, como control de carga se utilizó el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC1). Los datos se presentan como la media±SEM, n=3. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

VIII. DISCUSIÓN

La mitocondria es un importante blanco de daño en enfermedades renales (Aparicio-Trejo et al., 2016; Hallan y Sharma, 2016; Molina-Jijón et al., 2011), un inductor de AKI es el cisplatino. Por otro lado, la curcumina es un antioxidante que presenta efectos nefroprotectores al disminuir estrés oxidante, (Joyce Trujillo et al., 2016), peroxidación lípidica (Ugur et al., 2015; Waseem et al., 2013) entre otros mecanismos. Además, la curcumina puede disminuir daño mitocondrial observado en otros modelos de estudio (Soto-Urquieta et al., 2014; Tapia et al., 2014; Trujillo et al., 2014; Waseem et al., 2013). En este estudio, se determinó que aunque el cisplatino induce AKI y alteraciones en la bioenergética y dinámica mitocondrial, y en la mitofagia, el tratamiento con curcumina atenúa estas alteraciones.

Se encontró que el cisplatino induce alteraciones bioenergéticas mitocondriales que se asociaron con una disminución en el consumo de oxígeno mitocondrial cuando el MG se utilizó como sustrato. Estas alteraciones (disminución del estado 3, de la relación ADP/O y del ICR) se centraron en parámetros relacionados con OXPHOS, lo anterior sugiere que su capacidad de producción de ATP mitocondrial está afectada, lo cual fue apoyado por una reducción en la actividad de ATP sintasa y una disminución en el mtMP cuando el sistema transportador de electrones se alimentó con MG. La reducción en la actividad del complejo I fue en parte responsable de estos cambios. En concordancia con nuestros resultados, Kruidering et al., (1997) demostraron que el cisplatino, a altas concentraciones (50 a 500 μM), induce una disminución en la actividad de los complejos I a IV en las células tubulares proximales porcinas. Además, estas alteraciones se han asociado a la disminución del consumo de oxígeno (Nowak, 2002; Sugiyama et al., 1989), contenido de ATP (Nowak, 2002) y mtMP (Choi et al., 2015; Kruidering et al., 1997; Morigi et al., 2015). Estas alteraciones pueden relacionarse con la cinasa 4 de piruvato deshidrogenasa (PDK4), una enzima de matriz mitocondrial, ya que en un estudio *in vivo* (en ratones C57BL6) se demostró que cuando se induce AKI por cisplatino (20 mg/kg) aumenta PDK4, tanto a nivel de mensajero como de proteína. Además, esto se asoció con una baja en el consumo de oxígeno y en el mtMP, y con una disminución en la abundancia de los complejos

mitocondriales I, IV y V y de la actividad de la citocromo c oxidasa. Sin embargo, la deficiencia de PDK4, atenúa la AKI inducida por cisplatino, se restablece la abundancia de los complejos mitocondriales y con ello el consumo de oxígeno y del mtMP (Oh et al., 2017).

La curcumina fue capaz de disminuir el desacoplamiento mitocondrial por el cisplatino (la caída en el estado 3 y de la relación ADP/O), sin embargo el cisplatino no afectó al estado 4., esto nos sugiere que estaría previniendo la disminución en la fosforilación oxidativa inducida por el cisplatino. Además, la curcumina atenuó el daño en la actividad del complejo I inducido por cisplatino. Estos datos se correlacionan con estudios previos usando curcumina en otros modelos experimentales de AKI, en los cuales disminuyeron las alteraciones en la respiración mitocondrial (Molina-Jijon et al., 2011; Tapia et al., 2014).

El desacoplamiento de las mitocondrias puede promover estrés oxidante, al haber un aumento en la fuga de electrones del ETC, produciéndose un aumento de ROS mitocondrial. En este contexto, se encontró que el cisplatino aumenta la producción mitocondrial de H₂O₂ en casi todas las condiciones utilizadas excepto en el estado 3 CII esto último podría deberse en parte a nuestros resultados donde mostramos que el cisplatino afecta principalmente al CI. Por otro lado el aumento de H₂O₂ se previno al administrar curcumina. Lo anterior podría explicarse parcialmente debido a su actividad atrapadora de ROS, entre ellas H₂O₂ (Trujillo et al., 2016), y al hecho de que previene el desacoplamiento mitocondrial .

Las alteraciones en la bioenergética mitocondrial y en el potencial de membrana mitocondrial puede contribuir al desbalance en la dinámica mitocondrial (Aparicio-Trejo et al., 2016; Jones et al., 2017; Morigi et al., 2015), al respecto cuando se trata con cisplatino puede aumentar la expresión de la proteína DRP1, una despolarización mitocondrial e inducir una mayor fragmentación mitocondrial (Brooks et al., 2009; Morigi et al., 2015). Al respecto, nosotros encontramos que el cisplatino aumenta la proteína FIS1 y cambia la ultraestructura mitocondrial, a su vez disminuye la proteína OPA1 (involucrada en fusión mitocondrial), esto nos sugiere que la dinámica mitocondrial se está desplazando hacia la fisión. Sin

embargo, la administración de curcumina evita el aumento de FIS1 y la disminución de OPA1, y previene cambios en la ultraestructura mitocondrial. En concordancia con nuestros resultados, la curcumina puede disminuir la fisión mitocondrial en la nefrotoxicidad inducida por maleato (Molina-Jijon et al., 2016). Aunque la curcumina no recuperó los niveles proteicos de MFN1, si hubo un aumento de ellos en el grupo CUR, lo que nos pareció interesante ya que se ha descrito que otros antioxidantes como el sulforafano (O'Mealey et al., 2017) y el resveratrol (Robb et al., 2017) aumentan la fusión mitocondrial lo que podría sugerir su involucramiento en los efectos benéficos de estos antioxidantes. Esto sugiere que el tratamiento con curcumina podría también ser capaz de aumentar la fusión mitocondrial, sin embargo se requieren más estudios al respecto.

La proteína SIRT3 desacetila a OPA1 para activarlo, lo que permite que haya un aumento en la fusión mitocondrial (Samant et al., 2014). Por otro lado, también es importante SIRT3 al mantener los niveles de ATP por desacetilación y activación del complejo I (Ahn et al., 2008) y de la ATP sintasa (Wu et al., 2013). El cisplatino disminuyó el RNA mensajero de SIRT3 y aumentó los niveles de lisinas acetiladas en ratones. Además, en ratones deficientes de SIRT3 el tratamiento con cisplatino muestra una menor supervivencia comparado con un silvestre y cuando se recuperan los niveles de SIRT3 se observan efectos nefroprotectores (Morigi et al., 2015). En concordancia con estos resultados, en nuestro modelo de AKI observamos una disminución de SIRT3 y un aumento en los niveles de lisinas acetiladas (que puede ser secundaria a la menor actividad de SIRT3). La administración de curcumina impide estas alteraciones (la disminución de la proteína SIRT3 y el aumento de la lisina acetilada) y pudiera estar asociado con su efecto protector.

Por otro lado, encontramos que el cisplatino incrementó PINK1 y parkin (proteínas relacionadas a mitofagia). En los estudios de ultraestructura mitocondrial se observan numerosos autofagosomas en las células de epitelio de túbulo proximales, estos resultados nos sugieren una inducción de mitofagia. La administración de curcumina evita el aumento de las proteínas de mitofagia y disminuye los autofagosomas. En concordancia con nuestros datos, Zhao et al.,

(2017) mostraron que el cisplatino aumenta las proteínas PINK1 y parkin e induce mitofagia en células de túbulo proximal renal de humano. Además, al disminuir las proteína PINK1 y parkin (usando RNA de interferencia) la disfunción mitocondrial empeora al haber una mayor disminución del potencial de membrana y el contenido de ATP en tratamiento con cisplatino, asimismo hay un mayor porcentaje de células en apoptosis y decrece la viabilidad celular, lo que sugiere que la mitofagia puede tener un efecto protector en el daño por cisplatino (Zhao et al., 2017).

El cisplatino induce alteraciones en la bioenergética mitocondrial y en el balance redox, los mecanismos incluidos son: disminución en el estado 3, en ICR, en ADP/O, en la actividad del complejo I y el mtMP llevando a un aumento en la producción de H₂O₂. La disfunción mitocondrial en el OXPHOS junto con el estrés oxidante y la despolarización mitocondrial permite un incremento en la fisión mitocondrial al incrementar FIS1 y disminuir OPA1. Además, disminuyó la proteína SIRT3 y su actividad, así favoreciendo la fisión mitocondrial. El incremento en la fisión y la despolarización también promovieron el incremento de PINK1 y parkin sugiriendo una inducción de mitofagia como un mecanismo de remoción de mitocondrias dañadas. Sin embargo la curcumina pudo disminuir estas alteraciones (Fig. 19). En conclusión, la curcumina tiene un efecto nefroprotector contra daño por cisplatino, al disminuir las alteraciones en la bioenergética y dinámica mitocondrial, esto puede ser importante para su uso en conjunto con la quimioterapia, al respecto se ha sugerido que la curcumina no afecta la actividad del cisplatino como agente quimioterapéutico (Fetoni et al., 2015), y en algunos tipos de cáncer puede actuar de forma sinérgica con los efectos del cisplatino (Kumar et al., 2017a; Park et al., 2016; Zou et al., 2018), sin embargo es necesario realizar más estudios al respecto.

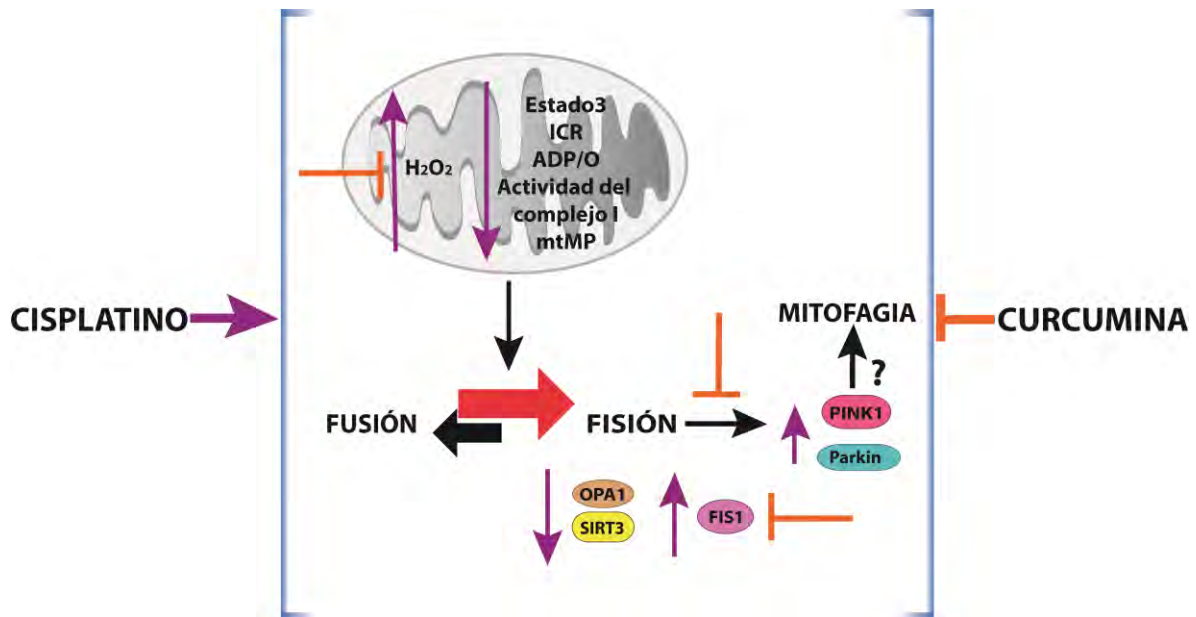


Fig. 19. Esquema integrativo de los efectos de curcumina sobre alteraciones mitocondriales en AKI inducida por cisplatino en este trabajo. La flecha moradas corresponden a los efectos producidos por cisplatino, la flecha roja corresponde a que el cisplatino favorece la fisión mitocondrial. La barra de inhibición (naranja) indica los efectos de curcumina sobre las alteraciones de cisplatino.

IX. CONCLUSIONES

La curcumina previene las alteraciones inducidas por cisplatino en la bioenergética mitocondrial y en FIS1 y OPA1 proteínas implicadas en la dinámica mitocondrial.

X. PERSPECTIVAS

Aunque observamos cambios en la dinámica mitocondrial en presencia de cisplatino y estos se previnieron con curcumina, se puede evaluar otras proteínas importantes como DRP1, MNF2 además se puede realizar inmunofluorescencias para localizar estas proteínas con los diferentes tratamientos.

En el contexto de la dinámica mitocondrial, evaluar si promueve modificaciones post-traduccionales como la nitrosilación en estas proteínas y evaluar su importancia en el desarrollo de AKI y/o en la nefroprotección.

Además de las proteínas parkin y PINK que se evaluaron en este trabajo se necesita evaluar con mayor detalle si se recluta la maquinaria para que se lleve a cabo la degradación de las mitocondrias, por lo que se debería evaluar proteínas de autofagia como LC3, el complejo ATG5-12, al igual que utilizar inhibidores de la misma.

XI. REFERENCIAS

- Ahn, B.H., Kim, H.S., Song, S., Lee, I.H., Liu, J., Vassilopoulos, A., Deng, C.X., Finkel, T., 2008. A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 14447–14452. doi:0803790105 [pii]10.1073/pnas.0803790105
- Anzell, A.R., Maizy, R., Przyklenk, K., Sanderson, T.H., 2017. Mitochondrial Quality Control and Disease: Insights into Ischemia-Reperfusion Injury. *Mol Neurobiol*. doi:10.1007/s12035-017-0503-910.1007/s12035-017-0503-9 [pii]
- Aparicio-Trejo, O.E., Tapia, E., Molina-Jijon, E., Medina-Campos, O.N., Macias-Ruvalcaba, N.A., Leon-Contreras, J.C., Hernandez-Pando, R., Garcia-Arroyo, F.E., Cristobal, M., Sanchez-Lozada, L.G., Pedraza-Chaverri, J., 2016. Curcumin prevents mitochondrial dynamics disturbances in early 5/6 nephrectomy: Relation to oxidative stress and mitochondrial bioenergetics. *Biofactors*. doi:10.1002/biof.1338
- Apostolova, N., Victor, V.M., 2015. Molecular strategies for targeting antioxidants to mitochondria: therapeutic implications. *Antioxid Redox Signal* 22, 686–729. doi:10.1089/ars.2014.5952
- Basu, A., Teicher, B.A., Lazo, J.S., 1990. Involvement of Protein Kinase C in Phorbol Ester-induced Sensitization of HeLa Cells to cis-Diamminedichloroplatinum(II)*. *J. Biol. Chem.* 265, 8451–8457.
- Bhargava, P., Schnellmann, R.G., 2017. Mitochondrial energetics in the kidney. *Nat. Rev. Nephrol.* doi:10.1038/nrneph.2017.107
- Brooks, C., Wei, Q., Cho, S., Dong, Z., 2009. Regulation of mitochondrial dynamics in acute kidney injury in cell culture and rodent models 119, 1275–1285. doi:10.1172/JCI37829DS1
- Brooks, C., Wei, Q., Cho, S.G., Dong, Z., 2009. Regulation of mitochondrial

dynamics in acute kidney injury in cell culture and rodent models. *J Clin Invest* 119, 1275–1285. doi:37829 [pii]10.1172/JCI37829

Choi, Y.M., Kim, H.K.J.M.S., Shim, W., Anwar, M.A., Kwon, J.W., Kwon, H.K., Kim, H.K.J.M.S., Jeong, H., Kim, H.K.J.M.S., Hwang, D., Kim, H.K.J.M.S., Choi, S., 2015. Mechanism of Cisplatin-Induced Cytotoxicity Is Correlated to Impaired Metabolism Due to Mitochondrial ROS Generation. *PLoS One* 10, e0135083. doi:10.1371/journal.pone.0135083 PONE-D-15-11027 [pii]

Ciarimboli, G., Ludwig, T., Lang, D., Pavensta, H., Koepsell, H., Jaehde, U., Zisowsky, J., Schlatter, E., 2005. Cisplatin Nephrotoxicity Is Critically Mediated via the Human Organic Cation Transporter 2 167, 1477–1484.

Colville, T., Bassert, J.M., 2016. *Clinical Anatomy and Physiology for Veterinary Technicians*, Third. ed. Elsevier.

Durcan, T.M., Fon, E.A., 2015. The three 'P's of mitophagy: PARKIN, PINK1, and post-translational modifications. *Genes Dev* 29, 989–999. doi:29/10/989 [pii]10.1101/gad.262758.115

Eaton, D.C., Pooler, J.P., 2006. *Fisiología renal de Vander*, Sexta. ed. Mc Graw-Hill Interamericana.

Eljack, N.D., Ma, H.-Y.M., Drucker, J., Shen, C., Hambley, T.W., New, E.J., Friedrich, T., Clarke, R.J., 2014. Mechanisms of cell uptake and toxicity of the anticancer drug cisplatin. *Metallomics* 6, 2126–33. doi:10.1039/c4mt00238e

Esatbeyoglu, T., Huebbe, P., Ernst, I.M.A., Chin, D., Wagner, A.E., Rimbach, G., 2012. Curcumin-From Molecule to Biological Function. *Angew. Chemie Int. Ed.* 51, 5308–5332. doi:10.1002/anie.201107724

Fenton, R.A., Praetorius, J., 2016. Anatomy of the Kidney, en: Brenner and Rector's *The Kidney*. Elsevier, pp. 42–82.

Fernandez-Rojas, B., Rodriguez-Rangel, D.S., Granados-Castro, L.F., Negrette-Guzman, M., Leon-Contreras, J.C., Hernandez-Pando, R., Molina-Jijon, E.,

- Reyes, J.L., Zazueta, C., Pedraza-Chaverri, J., 2015. C-phycocyanin prevents cisplatin-induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Mol Cell Biochem* 406, 183–197. doi:10.1007/s11010-015-2436-9
- Fetoni, A.R., Paciello, F., Mezzogori, D., Rolesi, R., Eramo, S.L.M., Paludetti, G., Troiani, D., 2015. Molecular targets for anticancer redox chemotherapy and cisplatin-induced ototoxicity: the role of curcumin on pSTAT3 and Nrf-2 signalling. *Br. J. Cancer* 113, 1434–1444. doi:10.1038/bjc.2015.359
- Friedman, J.R., Nunnari, J., 2014. Mitochondrial form and function. *Nature* 505, 335–343. doi:nature12985 [pii]10.1038/nature12985
- Gately, D.P., Howell, S.B., 1993. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *Br. J. Cancer* 67, 1171–6.
- Granados-Castro, L.F., Rodriguez-Rangel, D.S., Fernandez-Rojas, B., Leon-Contreras, J.C., Hernandez-Pando, R., Medina-Campos, O.N., Eugenio-Perez, D., Pinzon, E., Pedraza-Chaverri, J., 2016. Curcumin prevents paracetamol-induced liver mitochondrial alterations. *J Pharm Pharmacol* 68, 245–256. doi:10.1111/jphp.12501
- Gupta, S.C., Prasad, S., Kim, J.H., Patchva, S., Webb, L.J., Priyadarsini, I.K., Aggarwal, B.B., 2011. Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies. *Nat. Prod. Rep.* 28, 1937. doi:10.1039/c1np00051a
- Hallan, S., Sharma, K., 2016. The Role of Mitochondria in Diabetic Kidney Disease. *Curr. Diab. Rep.* 1–9. doi:10.1007/s11892-016-0748-0
- Jones, E., Gaytan, N., Garcia, I., Herrera, A., Ramos, M., Agarwala, D., Rana, M., Innis-Whitehouse, W., Schuenzel, E., Gilkerson, R., 2017. A threshold of transmembrane potential is required for mitochondrial dynamic balance mediated by DRP1 and OMA1. *Cell Mol Life Sci* 74, 1347–1363. doi:10.1007/s00018-016-2421-9. doi:10.1007/s00018-016-2421-9 [pii]
- Junge, W., Nelson, N., 2015. ATP Synthase. *Annu. Rev. Biochem.* 84, 631–657.

doi:10.1146/annurev-biochem-060614-034124

Kelland, L., 2007. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 7, 573–584. doi:nrc2167 [pii]10.1038/nrc2167

Kruidering, M., Van de Water, B., de Heer, E., Mulder, G.J., Nagelkerke, J.F., 1997. Cisplatin-induced nephrotoxicity in porcine proximal tubular cells: mitochondrial dysfunction by inhibition of complexes I to IV of the respiratory chain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280, 638–649.

Krumschnabel, G., Eigentler, A., Fasching, M., Gnaiger, E., 2014. Use of safranin for the assessment of mitochondrial membrane potential by high-resolution respirometry and fluorometry. *Methods Enzym.* 542, 163–181. doi:B978-0-12-416618-9.00009-1 [pii]10.1016/B978-0-12-416618-9.00009-1

Kumar, P., Barua, C.C., Sulakhiya, K., Sharma, R.K., 2017a. Curcumin Ameliorates Cisplatin-Induced Nephrotoxicity and Potentiates Its Anticancer Activity in SD Rats: Potential Role of Curcumin in Breast Cancer Chemotherapy. *Front Pharmacol* 8, 132. doi:10.3389/fphar.2017.00132

Kumar, P., Sulakhiya, K., Barua, C.C., Mundhe, N., 2017b. TNF-alpha, IL-6 and IL-10 expressions, responsible for disparity in action of curcumin against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Mol Cell Biochem.* doi:10.1007/s11010-017-2981-510.1007/s11010-017-2981-5 [pii]

Lao, C.D., Ruffin, M.T., Normolle, D., Heath, D.D., Murray, S.I., Bailey, J.M., Boggs, M.E., Crowell, J., Rock, C.L., Brenner, D.E., 2006. Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC Complement. Altern. Med.* 6, 10. doi:10.1186/1472-6882-6-10

Lawrence, R.A., Burk, R.F., 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 952–958. doi:10.1016/0006-291X(76)90747-6

Losón, O.C., Song, Z., Chen, H., Chan, D.C., 2013. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51

- mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Mol. Biol. Cell* 24, 659–667. doi:10.1091/mbc.E12-10-0721
- Makrecka-Kuka, M., Krumschnabel, G., Gnaiger, E., 2015. High-Resolution Respirometry for Simultaneous Measurement of Oxygen and Hydrogen Peroxide Fluxes in Permeabilized Cells, Tissue Homogenate and Isolated Mitochondria. *Biomolecules* 5, 1319–1338. doi:biom5031319 [pii]10.3390/biom5031319
- Mann, S.C., Andrews, P.A., Howell, S.B., 1991. Modulation of cis-diamminedichloroplatinum(II) accumulation and sensitivity by forskolin and 3-isobutyl-1-methylxanthine in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells. *Int. J. cancer* 48, 866–72.
- Mathews, C.K., Van Holde, K.E., Appling, D.R., Anthony-Cahill, S.J., 2013. *Bioquímica*, Cuarta. ed. Pearson.
- McWilliams, T.G., Muqit, M.M., 2017. PINK1 and Parkin: emerging themes in mitochondrial homeostasis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 45, 83–91. doi:10.1016/j.ceb.2017.03.013
- Miller, R.P., Tadagavadi, R.K., Ramesh, G., Reeves, W.B., 2010. Mechanisms of Cisplatin Nephrotoxicity 2490–2518. doi:10.3390/toxins2112490
- Mimaki, M., Wang, X., McKenzie, M., Thorburn, D.R., Ryan, M.T., 2012. Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenergetics* 1817, 851–862. doi:10.1016/j.bbabbio.2011.08.010
- Molina-Jijon, E., Aparicio-Trejo, O.E., Rodriguez-Munoz, R., Leon-Contreras, J.C., Del Carmen Cardenas-Aguayo, M., Medina-Campos, O.N., Tapia, E., Sanchez-Lozada, L.G., Hernandez-Pando, R., Reyes, J.L., Arreola-Mendoza, L., Pedraza-Chaverri, J., 2016. The nephroprotection exerted by curcumin in maleate-induced renal damage is associated with decreased mitochondrial fission and autophagy. *Biofactors* 42, 686–702. doi:10.1002/biof.1313

- Molina-Jijon, E., Tapia, E., Zazueta, C., El Hafidi, M., Zatarain-Barron, Z.L., Hernandez-Pando, R., Medina-Campos, O.N., Zarco-Marquez, G., Torres, I., Pedraza-Chaverri, J., 2011. Curcumin prevents Cr(VI)-induced renal oxidant damage by a mitochondrial pathway. *Free Radic Biol Med* 51, 1543–1557. doi:S0891-5849(11)00471-0 [pii]10.1016/j.freeradbiomed.2011.07.018
- Morigi, M., Perico, L., Rota, C., Longaretti, L., Conti, S., Rottoli, D., Novelli, R., Remuzzi, G., Benigni, A., 2015. Sirtuin 3-dependent mitochondrial dynamic improvements protect against acute kidney injury. *J. Clin. Invest.* 125, 715–26. doi:10.1172/JCI77632
- Nan, J., Zhu, W., Rahman, M.S., Liu, M., Li, D., Su, S., Zhang, N., Hu, X., Yu, H., Gupta, M.P., Wang, J., 2017. Molecular regulation of mitochondrial dynamics in cardiac disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1864, 1260–1273. doi:10.1016/j.bbamcr.2017.03.006
- Nowak, G., 2002. Protein kinase C-alpha and ERK1/2 mediate mitochondrial dysfunction, decreases in active Na⁺ transport, and cisplatin-induced apoptosis in renal cells. *J Biol Chem* 277, 43377–43388. doi:10.1074/jbc.M206373200M206373200 [pii]
- O'Mealey, G.B., Berry, W.L., Plafker, S.M., 2017. Sulforaphane is a Nrf2-independent inhibitor of mitochondrial fission. *Redox Biol* 11, 103–110. doi:S2213-2317(16)30275-0 [pii]10.1016/j.redox.2016.11.007
- Oh, C.J., Ha, C.M., Choi, Y.K., Park, S., Choe, M.S., Jeoung, N.H., Huh, Y.H., Kim, H.J., Kweon, H.S., Lee, J.M., Lee, S.J., Jeon, J.H., Harris, R.A., Park, K.G., Lee, I.K., 2017. Pyruvate dehydrogenase kinase 4 deficiency attenuates cisplatin-induced acute kidney injury. *Kidney Int* 91, 880–895. doi:S0085-2538(16)30610-X [pii]10.1016/j.kint.2016.10.011
- Ozkok, A., Edelstein, C.L., 2014. Pathophysiology of cisplatin-induced acute kidney injury. *Biomed Res Int* 2014, 967826. doi:10.1155/2014/967826
- Park, B.H., Lim, J.E., Jeon, H.G., Seo, S.I., Lee, H.M., Choi, H.Y., Jeon, S.S.,

- Jeong, B.C., 2016. Curcumin potentiates antitumor activity of cisplatin in bladder cancer cell lines via ROS-mediated activation of ERK1/2. *Oncotarget* 7, 63870–63886. doi:11563 [pii]10.18632/oncotarget.11563
- Pattingre, S., Espert, L., Biard-Piechaczyk, M., Codogno, P., 2008. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. *Biochimie* 90, 313–323. doi:10.1016/j.biochi.2007.08.014
- Portilla, D., Li, S., Nagothu, K.K., Megyesi, J., Kaissling, B., Schnackenberg, L., Safirstein, R.L., Beger, R.D., 2006. Metabolomic study of cisplatin-induced nephrotoxicity. *Kidney Int.* 69, 2194–204. doi:10.1038/sj.ki.5000433
- Reggiori, F., Komatsu, M., Finley, K., Simonsen, A., 2012. Autophagy: More than a nonselective pathway. *Int. J. Cell Biol.* 2012. doi:10.1155/2012/219625
- Rezaee, R., Momtazi, A.A., Monemi, A., Sahebkar, A., 2017. Curcumin: A potentially powerful tool to reverse cisplatin-induced toxicity. *Pharmacol Res* 117, 218–227. doi:S1043-6618(16)31079-9 [pii]10.1016/j.phrs.2016.12.037
- Robb, E.L., Moradi, F., Maddalena, L.A., Valente, A.J., Fonseca, J., Stuart, J.A., 2017. Resveratrol stimulates mitochondrial fusion by a mechanism requiring mitofusin-2. *Biochem Biophys Res Commun* 485, 249–254. doi:S0006-291X(17)30393-5 [pii]10.1016/j.bbrc.2017.02.102
- Roy, M., Reddy, P.H., Iijima, M., Sesaki, H., 2015. Mitochondrial division and fusion in metabolism. *Curr. Opin. Cell Biol.* 33, 111–8. doi:10.1016/j.ceb.2015.02.001
- Safiulina, D., Kaasik, A., 2013. Energetic and dynamic: how mitochondria meet neuronal energy demands. *PLoS Biol.* 11, e1001755. doi:10.1371/journal.pbio.1001755
- Samant, S. a, Zhang, H.J., Hong, Z., Pillai, V.B., Sundaresan, N.R., Wolfgeher, D., Archer, S.L., Chan, D.C., Gupta, M.P., 2014. SIRT3 deacetylates and activates OPA1 to regulate mitochondrial dynamics during stress. *Mol. Cell.*

Biol. 34, 807–19. doi:10.1128/MCB.01483-13

Satoh, M., Kashihara, N., Fujimoto, S., 2003. A novel free radical scavenger, edarabone, protects against cisplatin-induced acute renal damage in vitro and in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305, 1183–1190. doi:10.1124/jpet.102.047522.oxygen

Sena, L.A., Chandel, N.S., 2012. Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Mol. Cell* 48, 158–167. doi:10.1016/j.molcel.2012.09.025

Sharfuddin, A.A., Weisbord, S.D., Palevsky, P.M., Molitoris, B.A., 2016. Acute kidney injury, en: *Brenner and Rector's The Kidney*. Elsevier, pp. 958–1011.

Shehzad, A., Lee, Y.S., 2013. Molecular mechanisms of curcumin action: Signal transduction. *BioFactors* 39, 27–36. doi:10.1002/biof.1065

Soto-Urquieta, M.G., López-Briones, S., Pérez-Vázquez, V., Saavedra-Molina, A., González-Hernández, G. a., Ramírez-Emiliano, J., 2014. Curcumin restores mitochondrial functions and decreases lipid peroxidation in liver and kidneys of diabetic db/db mice. *Biol. Res.* 47, 74. doi:10.1186/0717-6287-47-74

Sugiyama, S., Hayakawa, M., Kato, T., Hanaki, Y., Shimizu, K., Ozawa, T., 1989. Adverse effects of anti-tumor drug, cisplatin, on rat kidney mitochondria: disturbances in glutathione peroxidase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 159, 1121–1127. doi:0006-291X(89)92225-0 [pii]

Sureshbabu, A., Bhandari, V., 2013. Targeting mitochondrial dysfunction in lung diseases: Emphasis on mitophagy. *Front. Physiol.* 4 DEC, 1–8. doi:10.3389/fphys.2013.00384

Tapia, E., Sánchez-Lozada, L.G., García-Niño, W.R., García, E., Cerecedo, a, García-Arroyo, F.E., Osorio, H., Arellano, a, Cristóbal-García, M., Loredó, M.L., Molina-Jijón, E., Hernández-Damián, J., Negrette-Guzmán, M., Zazueta, C., Huerta-Yepez, S., Reyes, J.L., Madero, M., Pedraza-Chaverrí, J., 2014. Curcumin prevents maleate-induced nephrotoxicity: Relation to hemodynamic

alterations, oxidative stress, mitochondrial oxygen consumption and activity of respiratory complex I. *Free Radic. Res.* 48, 1342–54. doi:10.3109/10715762.2014.954109

Topcu-Tarladacalisir, Y., Sapmaz-Metin, M., Karaca, T., 2016. Curcumin counteracts cisplatin-induced nephrotoxicity by preventing renal tubular cell apoptosis. *Ren Fail* 38, 1741–1748. doi:10.1080/0886022X.2016.1229996

Trujillo, J., Chirino, Y.I., Molina-Jijón, E., Andérica-Romero, A.C., Tapia, E., Pedraza-Chaverri, J., 2013. Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings. *Redox Biol.* 1, 448–456. doi:10.1016/j.redox.2013.09.003

Trujillo, J., Chirino, Y.I., Molina-Jijón, E., Andérica-Romero, A.C., Tapia, E., Pedraza-Chaverri, J., 2013. Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings. *Redox Biol.* 1, 448–456. doi:10.1016/j.redox.2013.09.003 S2213-2317(13)00067-0 [pii]

Trujillo, J., Granados-Castro, L.F., Zazueta, C., Andérica-Romero, A.C., Chirino, Y.I., Pedraza-Chaverri, J., 2014. Mitochondria as a target in the therapeutic properties of curcumin. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. 347, 873–884. doi:10.1002/ardp.201400266

Trujillo, J., Molina-Jijón, E., Medina-Campos, O.N., Rodríguez-Munoz, R., Reyes, J.L., Loredó, M.L., Barrera-Oviedo, D., Pinzón, E., Rodríguez-Rangel, D.S., Pedraza-Chaverri, J., 2016. Curcumin prevents cisplatin-induced decrease in the tight and adherens junctions: relation to oxidative stress. *Food Funct.* doi:10.1039/c5fo00624d

Trujillo, J., Molina-Jijón, E., Medina-Campos, O.N., Rodríguez-Muñoz, R., Reyes, J.L., Loredó, M.L., Barrera-Oviedo, D., Pinzón, E., Rodríguez-Rangel, D.S., Pedraza-Chaverri, J., 2016. Curcumin prevents cisplatin-induced decrease in the tight and adherens junctions: relation to oxidative stress. *Food Funct.* doi:10.1039/C5FO00624D

- Ugur, S., Ulu, R., Dogukan, A., Gurel, A., Yigit, I.P., Gozel, N., Aygen, B., Ilhan, N., 2015. The renoprotective effect of curcumin in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Ren Fail* 37, 332–336. doi:10.3109/0886022X.2014.986005
- van der Laan, M., Horvath, S.E., Pfanner, N., 2016. Mitochondrial contact site and cristae organizing system. *Curr. Opin. Cell Biol.* 41, 33–42. doi:10.1016/j.ceb.2016.03.013
- Wai, T., Langer, T., 2016. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol. Metab.* xx, 1–13. doi:10.1016/j.tem.2015.12.001
- Waseem, M., Kaushik, P., Parvez, S., 2013. Mitochondria-mediated mitigatory role of curcumin in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Cell Biochem. Funct.* 31, 678–684. doi:10.1002/cbf.2955
- Wu, Y.T., Lee, H.C., Liao, C.C., Wei, Y.H., 2013. Regulation of mitochondrial F(o)F(1)ATPase activity by Sirt3-catalyzed deacetylation and its deficiency in human cells harboring 4977bp deletion of mitochondrial DNA. *Biochim Biophys Acta* 1832, 216–227. doi:S0925-4439(12)00224-4 [pii]10.1016/j.bbadis.2012.10.002
- Yamaguchi, O., Murakawa, T., Nishida, K., Otsu, K., 2016. Journal of Molecular and Cellular Cardiology Receptor-mediated mitophagy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1–7. doi:10.1016/j.yjmcc.2016.03.010
- Yang, C., Kaushal, V., Shah, S. V, Kaushal, G.P., 2008. Autophagy is associated with apoptosis in cisplatin injury to renal tubular epithelial cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 294, F777–F787. doi:10.1152/ajprenal.00590.2007
- Zhan, M., Brooks, C., Liu, F., Sun, L., Dong, Z., 2013. Mitochondrial dynamics: regulatory mechanisms and emerging role in renal pathophysiology. *Kidney Int* 83, 568–581. doi:S0085-2538(15)55790-6 [pii]10.1038/ki.2012.441
- Zhao, C., Chen, Z., Xu, X., An, X., Duan, S., Huang, Z., Zhang, C., Wu, L., Zhang, B., Zhang, A., Xing, C., Yuan, Y., 2017. Pink1/Parkin-mediated mitophagy play

a protective role in cisplatin induced renal tubular epithelial cells injury. *Exp Cell Res* 350, 390–397. doi:S0014-4827(16)30430-X [pii]10.1016/j.yexcr.2016.12.015

Zhou, H., Beevers, C.S., Huang, S., 2011. Targets of curcumin. *Curr. Drug Targets* 12, 332–347.

Zou, J., Zhu, L., Jiang, X., Wang, Y., Wang, Y., Wang, X., Chen, B., 2018. Curcumin increases breast cancer cell sensitivity to cisplatin by decreasing FEN1 expression. *Oncotarget* 9, 11268–11278. doi:10.18632/oncotarget.24109

**XII. ANEXO
ARTÍCULO PUBLICADO**



Curcumin prevents cisplatin-induced renal alterations in mitochondrial bioenergetics and dynamic



Bibiana Ortega-Domínguez^a, Omar Emiliano Aparicio-Trejo^a,
Fernando E. García-Arroyo^b, Juan Carlos León-Contreras^c, Edilia Tapia^b,
Eduardo Molina-Jijón^a, Rogelio Hernández-Pando^c, Laura Gabriela Sánchez-Lozada^b,
Diana Barrera-Oviedo^d, José Pedraza-Chaverri^{a,*}

^a Department of Biology, Faculty of Chemistry, National Autonomous University of Mexico (UNAM), Mexico City 04510, Mexico

^b Department of Nephrology and Laboratory of Renal Pathophysiology, National Institute of Cardiology "Ignacio Chávez", Mexico City 14080, Mexico

^c Experimental Pathology Section, National Institute of Medical Sciences and Nutrition "Salvador Zubirán", Mexico City 14000, Mexico

^d Department of Pharmacology Faculty of Medicine, National Autonomous University of Mexico (UNAM), Mexico City 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 June 2017

Received in revised form

6 July 2017

Accepted 7 July 2017

Available online 8 July 2017

Keywords:

Curcumin

Cisplatin

Kidney

Mitochondria

Bioenergetics

ABSTRACT

Cisplatin is widely used as chemotherapeutic agent for treatment of diverse types of cancer, however, acute kidney injury (AKI) is an important side effect of this treatment. Diverse mechanisms have been involved in cisplatin-induced AKI, such as oxidative stress, apoptosis and mitochondrial damage. On the other hand, curcumin is a polyphenol extracted from the rhizome of *Curcuma longa* L. Previous studies have shown that curcumin protects against the cisplatin-induced AKI; however, it is unknown whether curcumin can reduce alterations in mitochondrial bioenergetics and dynamic in this model. It was found that curcumin prevents cisplatin-induced: (a) AKI and (b) alterations in the following mitochondrial parameters: bioenergetics, ultrastructure, hydrogen peroxide production and dynamic. In fact, curcumin prevented the increase of mitochondrial fission 1 protein (FIS1), the decrease of optic atrophy 1 protein (OPA1) and the decrease of NAD⁺-dependent deacetylase sirtuin-3 (SIRT3), a mitochondrial dynamic regulator as well as the increase in the mitophagy associated proteins parkin and phosphatase and tensin homologue (PTEN)-induced putative kinase protein 1 (PINK1). In conclusion, the protective effect of curcumin in cisplatin-induced AKI was associated with the prevention of the alterations in mitochondrial bioenergetics, ultrastructure, redox balance, dynamic, and SIRT3 levels.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cisplatin (*cis*-diamminedichloroplatinum) is a chemotherapeutic agent, widely used in treatment of several cancers such as ovarian and breast, among others. However, its use is limited by its side effects, such as acute kidney injury (AKI), in which cisplatin affects mainly proximal tubular cells (Miller et al., 2010; Ozkok and Edelstein, 2014). Several mechanisms have been proposed to be involved in cisplatin-induced AKI, among them, oxidative stress [triggered by an increase in reactive oxygen species (ROS) production], inflammation, deoxyribonucleic acid (DNA) damage and apoptosis (Nowak, 2002; Pan et al., 2014; Trujillo et al., 2016).

Moreover, recent studies have suggested that an important target of cisplatin in AKI is the mitochondria. Since mitochondrial homeostasis is essential for the maintenance of renal function (Aparicio-Trejo et al., 2017; Morigi et al., 2015; Pedraza-Chaverri et al., 2016; Zhan et al., 2013), bioenergetics alterations such as decreased adenosine triphosphate (ATP) synthase activity, changes in mitochondrial membrane potential (mtMP) (Kruidering et al., 1997; Nowak, 2002) and in the activity of respiratory complexes and higher mitochondrial ROS production have been related to the progression of AKI (Kruidering et al., 1997; Oh et al., 2017; Sugiyama et al., 1989).

Mitochondrial ATP production by the oxidative phosphorylation (OXPHOS) system is tightly coordinated with the dynamic of this organelle, favoring fission or fusion depending on the energy demands in the cell, in order to maintain the energetic homeostasis (Anzell et al., 2017). Mitochondrial fusion is regulated by the

* Corresponding author.

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

protein mitofusin 1 (MFN1), implicated in mitochondrial outer membrane fusion, and by optic atrophy 1 (OPA1) protein, that participates in mitochondrial inner membrane fusion (Friedman and Nunnari, 2014; Zhan et al., 2013). Further, nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)⁺-dependent deacetylase sirtuin-3 (SIRT3) can regulate mitochondrial dynamic by deacetylation and activation of OPA1 (Samant et al., 2014). In this regard, it has been shown that Sirt3^{-/-} deficient mice treated with cisplatin have more severe AKI than wild type mice, thus suggesting that SIRT3 protein may exert a protective effect in cisplatin-induced renal damage (Morigi et al., 2015).

On the other hand, the fission process is regulated by the dynamin-related protein 1 (DRP1) and mitochondrial fission 1 protein (FIS1) (Zhan et al., 2013). FIS1 is also necessary for the removal of dysfunctional mitochondria by a selective autophagy process known as mitophagy (Gomes and Scorrano, 2008). Mitophagy is also regulated by phosphatase and tensin homologue (PTEN)-induced putative kinase 1 (PINK1), a serine/threonine kinase that together with the E3-ubiquitin ligase parkin promotes mitochondrial degradation. As a matter of fact, PINK1 is accumulated in depolarized mitochondria, inducing parkin translocation from the cytosol to the mitochondria, which promotes the phosphorylation of the latter (Durcan and Fon, 2015), leading to parkin-induced ubiquitination of fusion proteins, such as MFN1 and MFN2, which increases their degradation and induces the recruitment of the autophagy machinery for mitochondria degradation (Apostolova and Victor, 2015; Durcan and Fon, 2015). In this context, it has been reported that cisplatin can induce mitophagy in the renal proximal tubular cell line HK-2 (Zhao et al., 2017).

On the other hand, curcumin (diferuloylmethane) is the major active component of the plant *Curcuma longa* L., which is broadly used in India and Southeastern Asia as a spice (Liu et al., 2005). Curcumin can act as a bifunctional antioxidant as well as an anti-inflammatory agent (Liu et al., 2016; Rezaee et al., 2017; Trujillo et al., 2016; Yang et al., 2009). Curcumin is able to exert a nephroprotective effect against cisplatin-induced renal damage. This effect has been related to its capacity to prevent cisplatin-induced oxidative stress, inflammation, decrease in tight junction proteins and apoptosis (Kuhad et al., 2007; Kumar et al., 2017; Sahin et al., 2014; Topcu-Tarladacalisir et al., 2016; Trujillo et al., 2016). It has been reported that curcumin is able to decrease mitochondrial oxidative stress (Waseem et al., 2013), however, the mechanisms associated to this effect have not been evaluated in cisplatin-induced AKI.

The aim of this study was to evaluate mitochondrial-related mechanisms involved in the protective effect of curcumin in cisplatin-induced AKI, by assessing the following parameters: bioenergetics, ultrastructure, hydrogen peroxide (H₂O₂) production, dynamic, SIRT3 protein levels, and mitophagy.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Curcumin (Cat. no. C1386, Lot number SLBN7214V, purity 78%), cisplatin (Cat. no. P4394, Lot #MKBV344KV) and rabbit anti-voltage-dependent anion selective channel 1 (VDAC1) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Polyclonal antibodies against optic atrophy 1 (OPA1), mitochondrial fission 1 protein (FIS1), mitofusin 1 (MFN1), SIRT3 and PINK1 were purchased from Santa Cruz Biotech, Inc. (Dallas, TX, USA). The anti-acetylated lysine and secondary anti-rabbit and anti-goat antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) and anti-parkin antibody was purchased from Abcam (Cambridge, MA, USA). All other chemicals were reagent grade and

commercially available.

2.2. Experimental design

Animal experiments were performed in accordance with the guidelines of the Mexican Official Norm for Care and Use of Laboratory Animals (NOM-062-ZOO-1999) and the Local Ethics Committee (FQ/CICUAL/069/13). Male Wistar rats, with an initial body weight of 200–250 g, were housed with 12/12 h light/dark cycles at 22 ± 1 °C. Animals received water and food *ad libitum*. Four groups of rats were studied: (1) Rats of the vehicle group (VEH) were administered 0.05% carboxymethylcellulose (CMC) via oral gavage and injected 0.9% saline solution intraperitoneally (i.p.). (2) Rats of the cisplatin group (CIS) were i.p. injected with a single dose of cisplatin (5 mg/kg) dissolved in sterile saline solution. (3) Rats of the curcumin plus cisplatin group (CUR + CIS) were treated, via oral gavage, during 3 consecutive days with curcumin (200 mg/kg/day) suspended in 0.05% CMC and with cisplatin (5 mg/kg) 30 min after the first dose of curcumin, and (4) Rats of the curcumin group (CUR) were treated only with curcumin (200 mg/kg/day) during 3 consecutive days. Fig. 1 shows a diagram of the experimental design. The doses of cisplatin and curcumin were chosen according to a previous report (Trujillo et al., 2016). Rats were sacrificed at 72 h after cisplatin injection.

2.3. Biochemical parameters

Seventy-two hours after cisplatin injection, animals were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg), blood was obtained by cardiac puncture and plasma was separated. Plasma creatinine and blood urea nitrogen (BUN) were measured with automated clinical chemistry analyzer ILab 300 Plus (Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, USA).

2.4. Morphological studies

Morphological studies in hematoxylin and eosin stained slides were performed as previously described (Aparicio-Trejo et al., 2017). For electron-microscopy studies, small kidney cortex tissue fragments were fixed and processed as described before (Molina-Jijon et al., 2016) and examined with the FEI Technai G2 Spirit transmission electron microscope (Hillsboro, OR, USA).

2.5. Mitochondrial bioenergetics studies

2.5.1. Isolation of mitochondria from renal cortex

Mitochondria were isolated using a differential centrifugation with Percoll[®] gradient protocol as described before (Fernández-Rojas et al., 2015; Granados-Castro et al., 2016; Aparicio-Trejo et al., 2017).

2.5.2. Mitochondrial oxygen consumption

Evaluation of mitochondrial oxygen consumption was performed using a Clark-type microelectrode (Strathkelvin Instruments, Motherwell, North Lanarkshire, Scotland) at 37 °C according to a previous report (Fernández-Rojas et al., 2015). Respiratory state 3, respiratory state 4 and uncoupled respiration were measured and respiratory control index (RCI, state 3/state 4) and adenosine diphosphate/oxygen (ADP/O) ratio were calculated.

2.5.3. Enzymatic activity of mitochondrial respiratory complex I

Complex I activity was performed as previously reported (Aparicio-Trejo et al., 2017). It was based on the capacity of complex I to oxidize nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) while reducing decylubiquinone (Dub) to DubH₂, which is then oxidized

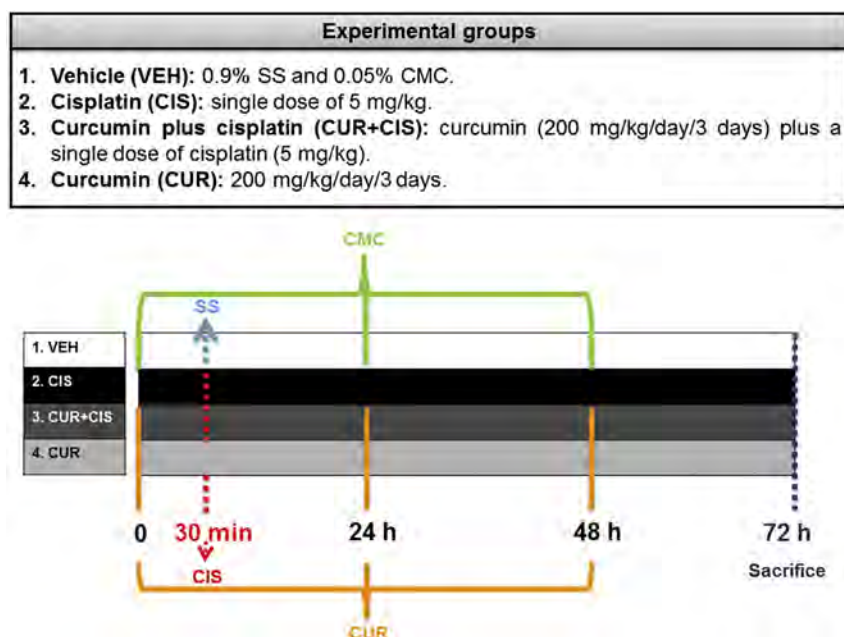


Fig. 1. Experimental design. Four groups of male Wistar rats were used in this study. Curcumin and 0.05% carboxymethyl cellulose (CMC) were administered via oral gavage and cisplatin and 0.9% saline solution (SS) were injected intraperitoneally.

by dichlorophenolindophenol (DCPIP), whose oxidized form absorbs at 600 nm.

2.5.4. Adenosine triphosphate (ATP) synthesis assay

It was performed according to previous works (Fernández-Rojas et al., 2015; Granados-Castro et al., 2016). ATP was quantified by measuring at 340 nm reduced nicotinamide dinucleotide phosphate (NADPH) produced by the coupled enzyme reactions catalyzed by hexokinase and glucose 6-phosphate dehydrogenase.

2.5.5. mtMP

mtMP alterations were measured as previously reported (Krumshabel et al., 2014). The changes in safranin fluorescence were used as indicator of changes in mtMP.

2.6. Mitochondrial H₂O₂ production

Mitochondrial H₂O₂ generation was measured as previously described (Makrecka-Kuka et al., 2015). Amplex red fluorescence was measured with an O2k-Fluorometer (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). Isolated mitochondria were loaded in the MiRO6 buffer, which has the following composition: 110 mM sucrose, 0.5 mM ethylenediaminetetraacetic (EDTA), 3 acid mM MgCl₂, 60 mM K-lactobionate, 20 mM taurine, 20 mM 4-(2-hydroxyethyl)21-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 10 μM amplex red, 0.5 U/ml horseradish peroxidase (HRP) and 1 g/L bovine serum albumin (BSA), pH 7.4. A calibration curve was employed to ensure the linearity of the assay. After calibration curve, isolated mitochondria were loaded and the rate of H₂O₂ production was measured (basal production). The rate of H₂O₂ production in State 4 feeding by complex I (State 4 CI-Linked) was measured using 10 mM of sodium pyruvate plus 10 mM sodium malate and 10 mM sodium glutamate (PMG). Then, ADP was added to saturation (2.5 mM) for the determination of the rate of H₂O₂ production in State 3 (State 3 CI-Linked). Later, 10 mM sodium succinate was added to determine the rate of production in State 3 feeding by complex I plus complex II (State 3 CI + CII-Linked). Finally, 2.5 μM oligomycin was added to determine the rate of

production in State 4 (State 4^o CI + CII-Linked). The production rate attributable to complex II in State 3 was calculated according to the following formula: (State 3 CI + CII-Linked) - (State 3 CI-Linked).

2.7. Extraction of total proteins for Western blots assays

For total protein extraction, mitochondria were suspended in 300 μL of radioimmunoprecipitation (RIPA) buffer according to a previous report (Molina-Jijon et al., 2016). Total proteins were quantified by the Lowry method.

2.8. Western blots analyses

Western blot analyses were performed as previously described (Molina-Jijon et al., 2016). Proteins were separated on 10% or 15% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrilamide gel electrophoresis (PAGE). Proteins were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Nonspecific protein binding was blocked by incubation with 5% non-fat dry milk in Tris buffered saline, 0.1% Tween 20 (TBS-T 1x), for 1 h at room temperature. Membranes were incubated overnight at 4 °C with the appropriate primary antibodies against OPA1 (1:1000), MFN1 (1:1500), PINK1, acetylated lysine and SIRT3 (1:5000) and parkin, FIS1 and VDAC1 (1:2000). Thereafter, membranes were incubated with peroxidase-conjugated secondary anti-rabbit or anti goat antibodies (1:2000–10,000) for 1 h, after washing; immunoblots were developed using Clarity Western ECL Substrate Chemiluminescence. Densitometry of protein bands was performed with ImageJ or Image Studio Lite.

2.9. Data analyses

Results are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). Multiple comparisons among groups were performed with one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey posttest. $p < 0.05$ was considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Curcumin prevents cisplatin-induced renal function damage

Cisplatin increased creatinine (Fig. 2A) and BUN (Fig. 2B) levels; these increments were ameliorated by the curcumin treatment (Fig. 2). These parameters were unchanged in the CUR group (Fig. 2).

3.2. Curcumin protects against cisplatin-induced renal histological damage

In comparison with the VEH group (Fig. 3A), the histological sections of kidneys from cisplatin-treated animals showed pronounced swelling of the epithelial cells from convoluted proximal tubules with extensive cytoplasmic vacuolization, as well as some

detached necrotic cells and cellular debris in the tubular lumen (Fig. 3C). In contrast, kidney from the CUR + CIS group showed occasional tubules with cells showing minimal cytoplasmic vacuolization without evident necrotic cells (Fig. 3D). Animals from the CUR group did not show any kidney histological abnormality (Fig. 3B).

3.3. Curcumin counteracts cisplatin-induced mitochondrial bioenergetics alterations

Fig. 4A shows the representative graphs of mitochondrial oxygen consumption using malate-glutamate as substrate. Cisplatin treatment decreased state 3 (Fig. 4B), whereas state 4 (Fig. 4C) was unchanged. Further, the RCI (Fig. 4D) and the ADP/O ratio (Fig. 4E) decreased, thus suggesting that OXPHOS capacity is compromised in the CIS group. Uncoupled respiration was evaluated with

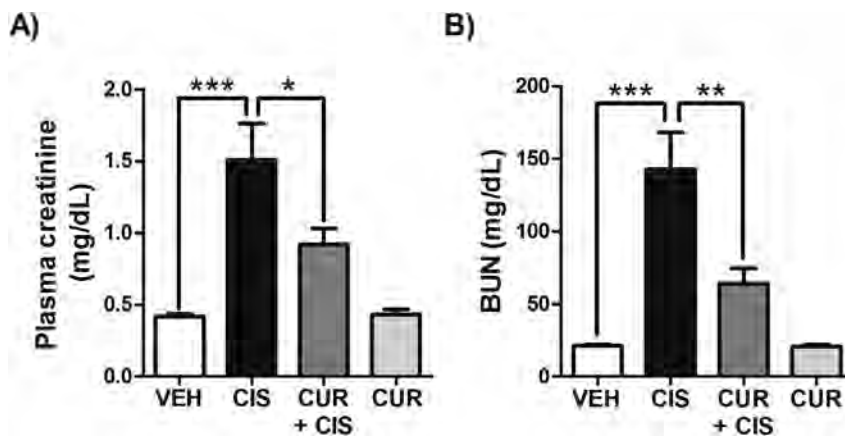


Fig. 2. Renal function parameters. (A) Creatinine and (B) Blood urea nitrogen (BUN) in plasma in the four groups of rats. Data are presented as mean \pm SEM, $n = 5-6$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

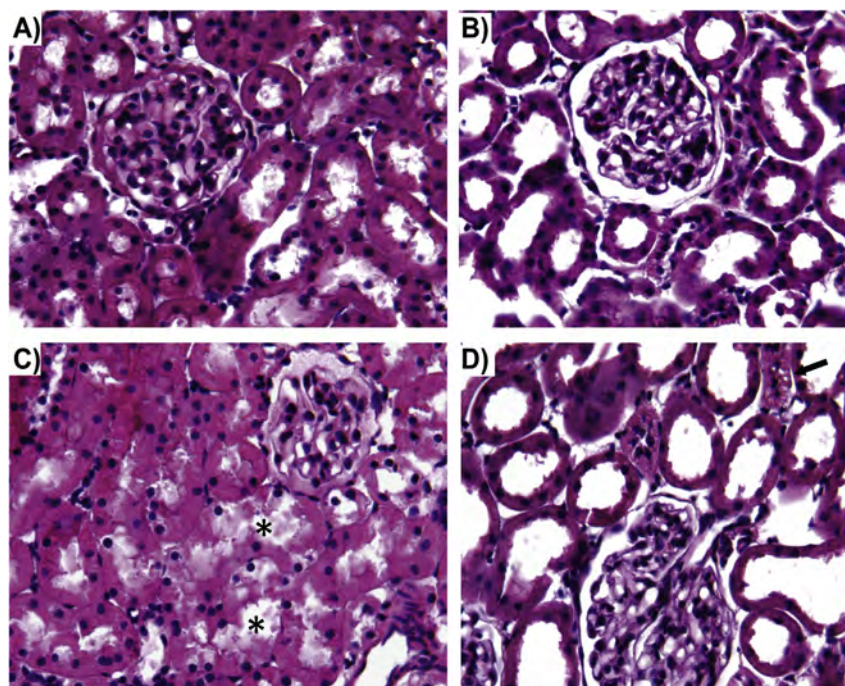


Fig. 3. Representative micrographs of the kidney cortex in the different experimental groups. (A) Vehicle (VEH) group. (B) Curcumin (CUR) group. (C) Cisplatin (CIS) group. Extensive cytoplasmic vacuolization and necrotic cellular debris in the lumen are seen (asterisks). (D) CUR + CIS group. Occasional tubules show cells with mild vacuolization are seen (arrow). Hematoxylin/eosin, 400 \times .

carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP, Fig. 4F); although it was observed that cisplatin decreases uncoupled respiration, this reduction was not statistically significant. The

above-described alterations were partially counteracted by curcumin treatment, suggesting that this compound was able to restore the OXPHOS capacity. Finally, these parameters were unchanged in

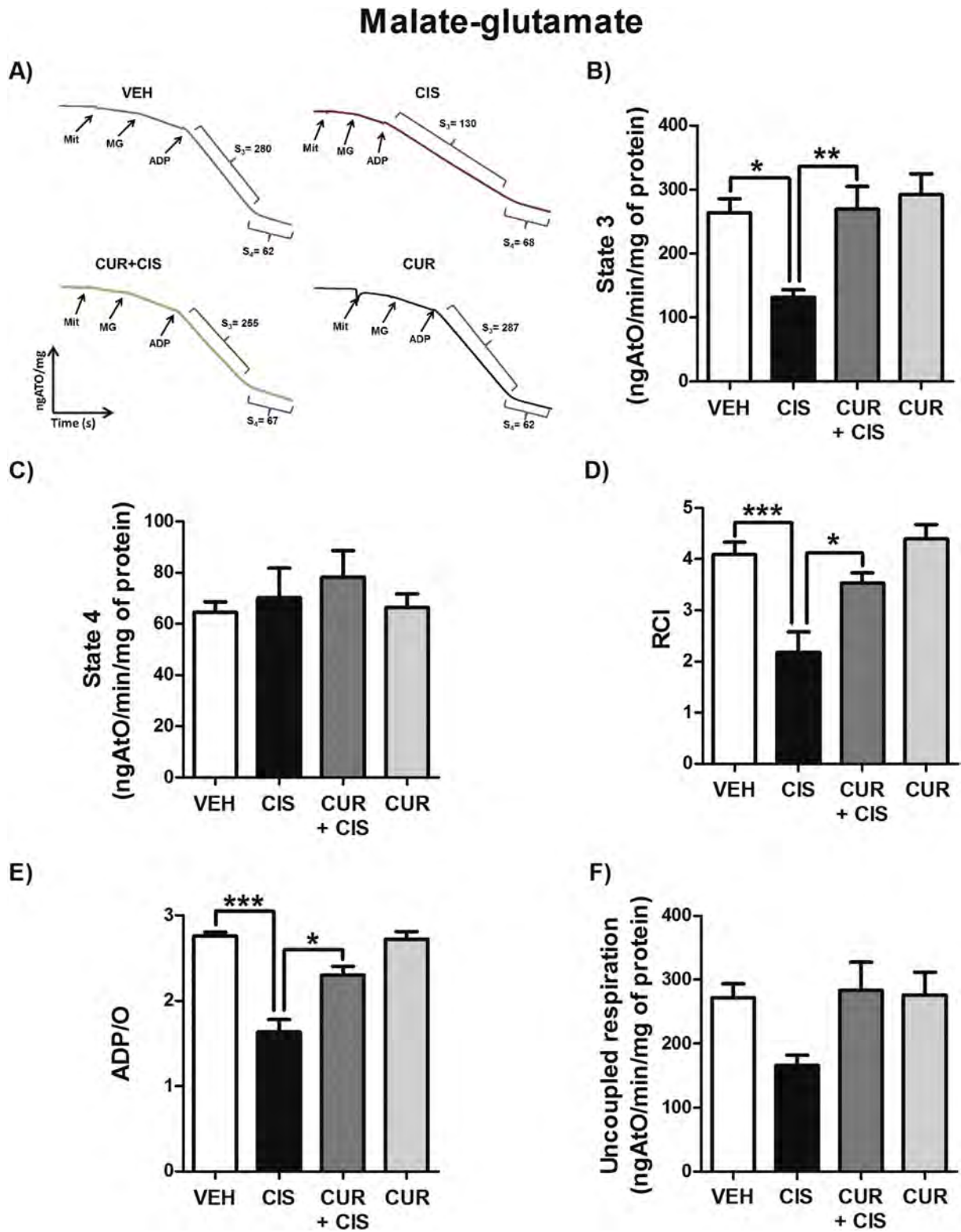


Fig. 4. Mitochondrial oxygen consumption using malate-glutamate as substrate. (A) Representative tracings of oxygen consumption using malate-glutamate as substrate in the four groups of rats. Mitochondria (Mit), malate-glutamate (MG), adenosine diphosphate (ADP), state 3 (S₃) and state 4 (S₄). (B) State 3, (C) State 4, (D) Respiratory control index (RCI), (E) ADP/oxygen ratio (ADP/O) and (F) Uncoupled respiration with carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP). Data are presented as mean ± SEM, n = 6–7. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

the CUR group (Fig. 4). On the other hand, using succinate plus rotenone, it was found that cisplatin induces an increase in state 4 and a decrease in RCI (Table 1). However, curcumin was not able to attenuate these alterations.

Table 1
Mitochondrial oxygen consumption using succinate as substrate.

	VEH	CIS	CUR + CIS	CUR
State 3	355.8 ± 33.88	386.3 ± 22.54	340.5 ± 34.59	377.3 ± 26.61
State 4	90.50 ± 9.12	125.7 ± 7.52*	101.3 ± 10.55	93.86 ± 6.69
RCI	3.94 ± 0.10	3.15 ± 0.27*	3.40 ± 0.20	4.03 ± 0.15
Uncoupled respiration	400.0 ± 42.99	425.3 ± 27.38	385.7 ± 50.73	387.3 ± 47.29
ADP/O	1.89 ± 0.04	1.61 ± 0.11	1.69 ± 0.08	1.89 ± 0.05

Mitochondrial oxygen consumption (state 3, state 4 and uncoupled respiration in ngAtO/min/mg of protein). RCI: respiratory control index, ADP/O: adenosine diphosphate/oxygen. Four groups of rats: VEH: vehicle, CIS: cisplatin, CUR + CIS: curcumin + cisplatin, CUR: curcumin. Data are mean ± SEM, n = 6–7. * p < 0.05 respect to vehicle.

Since the higher alterations were found in the complex I feeding respiration (using malate-glutamate as respiratory substrates), the activity of the mitochondrial complex I was explored. Cisplatin induced a decrease in complex I activity, which was prevented by curcumin treatment (Fig. 5A).

To confirm the effect of cisplatin on the mitochondrial OXPHOS capacity, the ATP synthase activity (complex V; Fig. 5B) and the mtMP using malate-glutamate (Fig. 5C) were evaluated. ATP synthase activity as well as mtMP decreased in the CIS group. Interestingly, curcumin treatment could prevent the mtMP lowering (Fig. 5C) but it was unable to prevent the decrease in ATP synthase activity (Fig. 5B). Finally, these parameters were not modified in the CUR group. No significant changes were observed in the mtMP when succinate was used as substrate (data not show).

3.4. Curcumin decreases cisplatin-induced mitochondrial H₂O₂ production

Fig. 6 shows representative tracings of H₂O₂ production in the

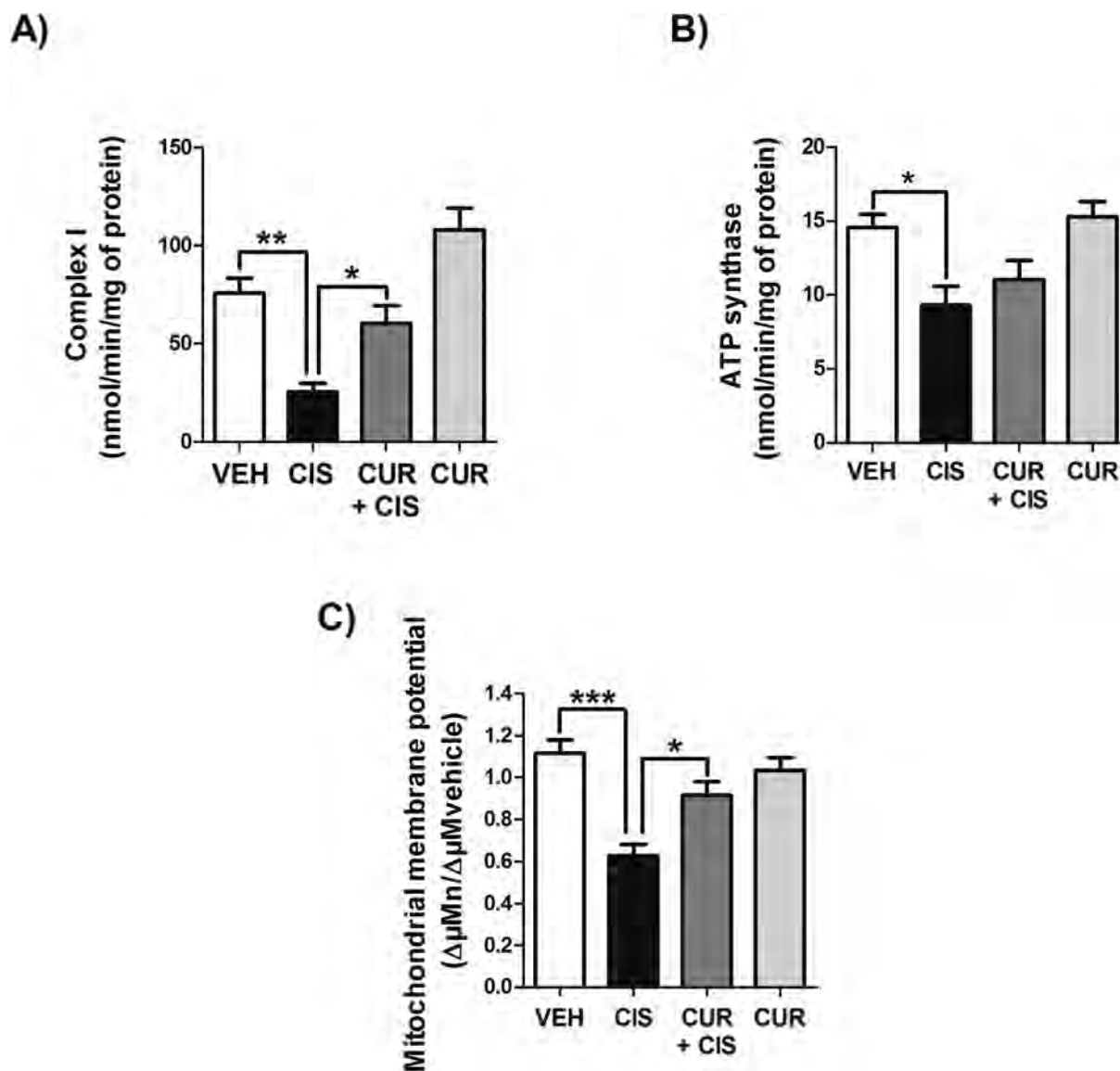


Fig. 5. Curcumin improves activity of complex I and mitochondrial membrane potential (mtMP) alterations induced by cisplatin. (A) Complex I activity, (B) Adenosine triphosphate (ATP) synthase activity, (C) mtMP. All assays were performed in mitochondria isolated from renal cortex. Data are presented as mean ± SEM, n = 5–6. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

different experimental groups [VEH (blue) and CIS (maroon) groups in Fig. 6A, and CIS (maroon) and CUR + CIS (green) groups in Fig. 6B]. Cisplatin treatment induced H_2O_2 production in almost all the studied conditions: basal (without substrate addition), PMG (State 4 CI-Linked), PMG plus ADP (State 3 CI-Linked), PMG plus ADP and succinate (State 3 CI + CII-Linked), and when oligomycin was used to inhibit ATP synthase (State 4 CI + CII-Linked) (Table 2). No significant changes in H_2O_2 production were observed in State 3 CII-Linked respiration (Table 2). All of the observed increments were prevented by curcumin treatment (CUR + CIS group, Table 2); also the H_2O_2 production was not modified in the CUR group in comparison with the VEH group.

3.5. Curcumin ameliorates the cisplatin-induced alterations in mitochondrial dynamic

In order to explore mitochondrial dynamic, mitochondrial

fusion proteins MFN1 and OPA1 levels, as well as fission protein FIS1 levels were evaluated by Western blot, in isolated mitochondria. Cisplatin decreased mitochondrial levels of OPA1 (Fig. 7A), however MFN1 levels (Fig. 7B) were unchanged. Moreover, FIS1 protein levels increased in the CIS group (Fig. 7C), suggesting a shift to mitochondrial fission. On the other hand, curcumin treatment was able to prevent cisplatin-induced increase in FIS1 levels (Fig. 7C) and decrease in OPA1 levels (Fig. 7A–B). Interestingly, MFN1 levels increased in the CUR group.

Cisplatin treatment decreased SIRT3 levels and increased acetylated lysine levels (Fig. 8A–B), suggesting also a decrease in SIRT3 activity (Fig. 8C). Curcumin treatment was able to attenuate these alterations (Fig. 8). These parameters were unaltered in the CUR group.

To evaluate whether mitochondrial morphology was altered by cisplatin treatment, kidney sections were examined by scanned electron microscopy (Fig. 9A–F). Normal ultrastructure appearance

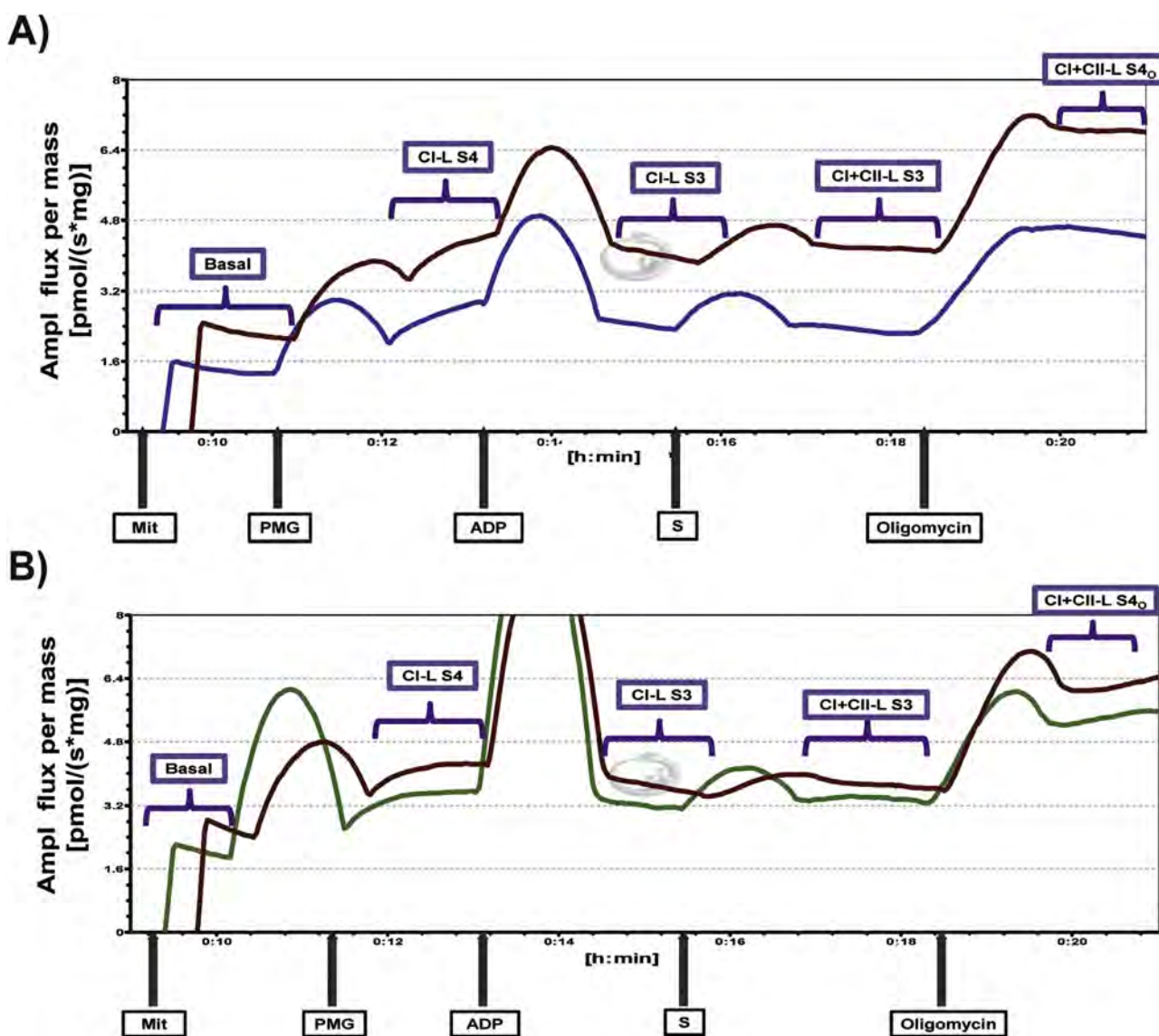


Fig. 6. Mitochondrial production of hydrogen peroxide (H_2O_2) in different respiratory states. Comparison between the groups (A) vehicle (VEH, blue) and cisplatin (CIS, maroon) and (B) Cisplatin (CIS, maroon) and curcumin + cisplatin (CUR + CIS, green). Mitochondria (Mit), pyruvate, malate and glutamate (PMG), adenosine diphosphate (ADP), succinate (S) and oligomycin (an ATP synthase inhibitor) were added sequentially. Amplex red was used as a fluorometric probe. Basal, State 3 Complex I-Linked (CI-L S3), State 4 Complex I-Linked (CI-L S4), State 3 Complex I + Complex II-Linked (CI + CII-L S3), State 4 Complex I + Complex II-Linked oligomycin (CI + CII-L S4o). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 2
Curcumin decreases cisplatin-induced hydrogen peroxide production.

		VEH	CIS	CUR + CIS	CUR
State 3	Basal	8.80 ± 1.14	17.60 ± 0.98***	10.50 ± 1.39 ⁺⁺	9.44 ± 0.85
	CI-Linked	12.63 ± 0.94	26.83 ± 5.08***	14.65 ± 0.51 ⁺⁺	11.78 ± 1.04
	CII-Linked	2.20 ± 0.67	7.62 ± 2.25	4.16 ± 1.75	2.86 ± 0.58
State 4	CI + CII-Linked	14.83 ± 1.50	34.45 ± 5.96**	18.80 ± 1.94 ⁺	14.64 ± 1.30
	CI-Linked	13.35 ± 0.91	27.10 ± 4.31**	15.12 ± 1.32 ⁺	13.30 ± 1.02
	CI + CII-Linked (Oligomycin)	19.91 ± 1.36	39.13 ± 4.67***	24.48 ± 2.32 ⁺⁺	19.59 ± 0.86

Amplex red reagent was used to measure H₂O₂ production in pmol/(s*mg of protein). Four groups of rats: VEH: Vehicle, CIS: cisplatin, CUR + CIS: curcumin + cisplatin, CUR: curcumin. Data are mean ± SEM, n = 6. **p < 0.01, ***p < 0.001 respect to vehicle, + p < 0.05, ++p < 0.01 respect to cisplatin.

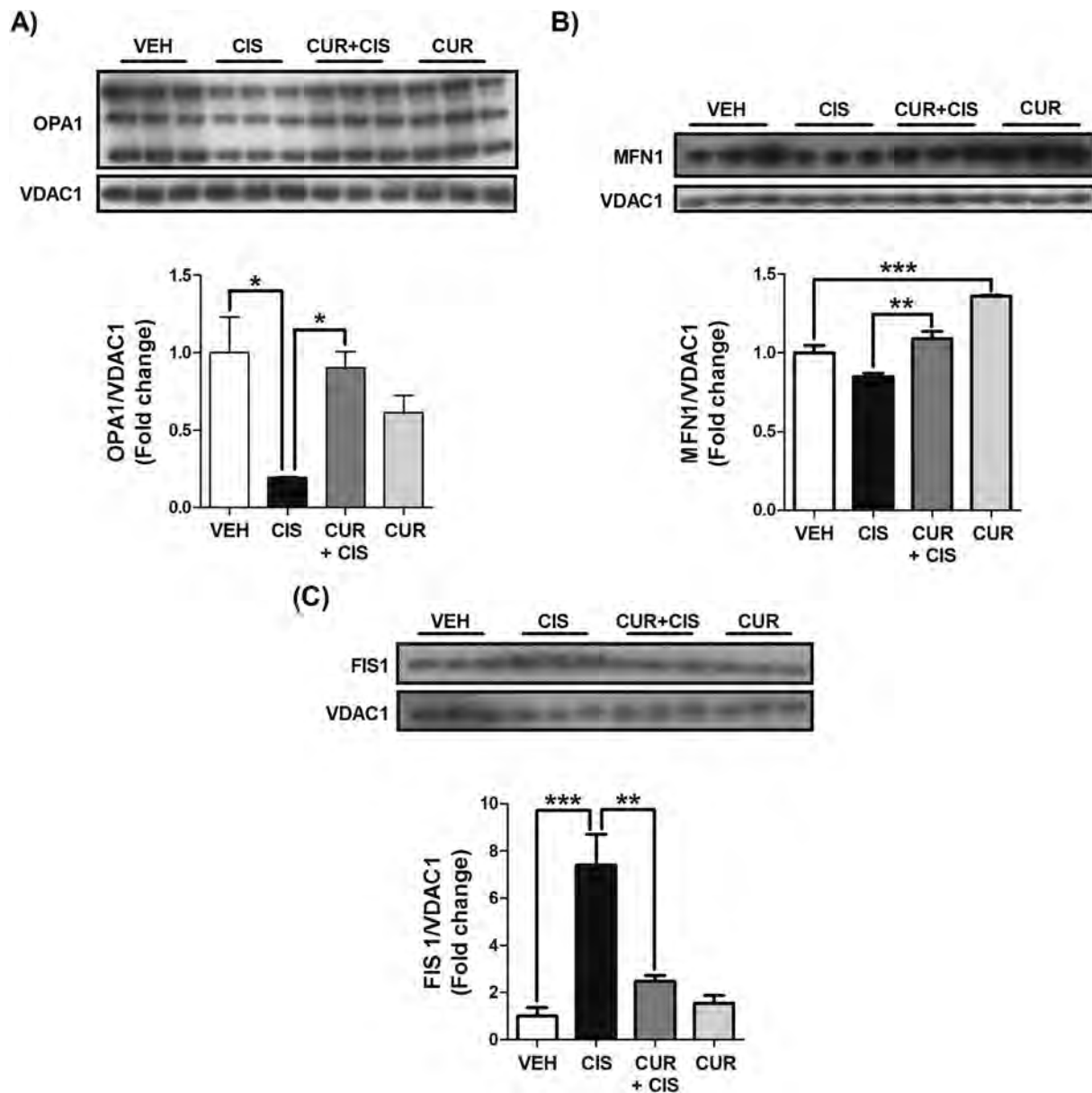


Fig. 7. Curcumin decreases mitochondrial fission and restores mitochondrial fusion induced by cisplatin. Western blot and their densitometry of the proteins involved in mitochondrial fusion: (A) Optic atrophy 1 (OPA1) and (B) Mitofusin 1 (MFN1) and fission: (C) Mitochondrial fission 1 protein (FIS1). Voltage-dependent anion selective channel 1 (VDAC1) was used as mitochondrial loading control. Data are presented as mean ± SEM, n = 3. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

of epithelial cell from convoluted proximal tubule, showing numerous normal mitochondria are evident in the VEH group (Fig. 9A). The CUR group did not show any significant ultrastructural damage in mitochondria or other cellular organelle (Fig. 9B).

In the CIS group, the ultrastructural study showed extensive mitochondrial abnormalities in the epithelial cells from cortical proximal convoluted tubules, such as swelling, rupture of cristae, fission and autophagic bodies (Fig. 9C–D). These abnormalities

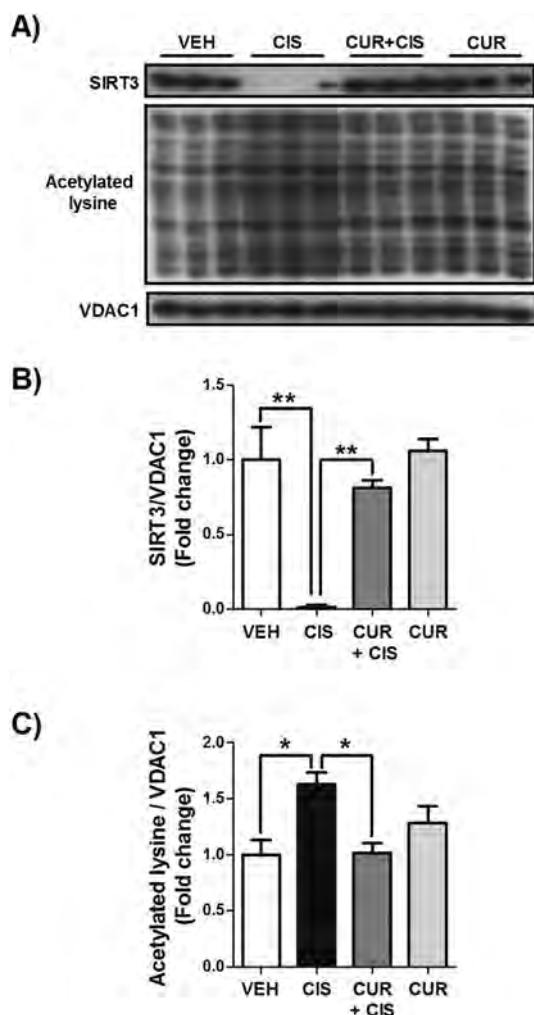


Fig. 8. Curcumin prevents cisplatin-induced decrease in nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺)-dependent deacetylase sirtuin-3 (SIRT3) levels and increase in lysine acetylated levels. (A) Western blot performed in mitochondria isolated of renal cortex and densitometry of (B) SIRT3 and (C) acetylated lysine. Voltage-dependent anion selective channel 1 (VDAC1) was used as mitochondrial loading control. Data are presented as mean \pm SEM, n = 3. *p < 0.05, **p < 0.01.

were less evident in the CUR + CIS group, clearly indicating an efficient activity of curcumin in the prevention of these mitochondrial abnormalities (Fig. 9E–F). The cytoplasm showed diverse size vacuoles surrounded by free ribosomes (Fig. 9F).

3.6. Curcumin prevents cisplatin-induced increase in levels of the mitophagy-associated proteins PINK1 and parkin

Cisplatin treatment increased the expression of PINK1 and parkin and curcumin treatment prevented this increment in the CUR + CIS group (Fig. 10A–B).

4. Discussion

In agreement with previous studies, it was found that curcumin administration prevents cisplatin-induced AKI (Kuhad et al., 2007; Sahin et al., 2014; Trujillo et al., 2016). Cisplatin is a chemotherapeutic agent widely used in several types of cancer, however, AKI is induced as a collateral effect of cisplatin therapy. On the other hand, mitochondrial homeostasis is essential for maintaining renal function and alterations in mitochondrial bioenergetics have been

associated with several kidney diseases. Due to the above-mentioned findings, mitochondria have been recently studied as one of the main targets of cisplatin-induced nephrotoxicity. In this study was found that cisplatin induces mitochondrial bioenergetics alterations, which were associated with a decrease in the mitochondrial oxygen consumption when malate-glutamate was used as substrate; these alterations (decrease in state 3, in ADP/O ratio and in RCI) were related to OXPHOS, suggesting that mitochondrial ATP production capacity is affected. This was supported by the decrease in the ATP synthase activity and mtMP when the electron transport chain (ETC) was fed with malate-glutamate. The reduction in complex I activity may partially explain these changes.

In agreement with our results, Kruidering et al. (1997) have shown that exposure to cisplatin, from 50 to 500 μ M, decreases the activity of complexes I to IV in porcine proximal tubular cells. It has also been reported that exposure to cisplatin decreases oxygen consumption (Nowak, 2002; Sugiyama et al., 1989), ATP levels (Nowak, 2002) and mtMP (Choi et al., 2015; Kruidering et al., 1997; Morigi et al., 2015). These alterations are associated to oxidative stress (Trujillo et al., 2016; Waseem et al., 2013), which may be induced by the increase in mitochondrial H₂O₂ production, that may lead to mitochondrial DNA damage (Garrido et al., 2008). Furthermore, it was recently shown (Oh et al., 2017), that increased levels of pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) are associated with cisplatin-induced AKI and with the decrease in the following mitochondrial parameters: oxygen consumption, mtMP, respiratory complexes I, IV and V, and cytochrome c oxidase activity. The abovementioned alterations were prevented by the deficiency or inhibition of PDK4 (Oh et al., 2017).

On the other hand, our results showed that curcumin was able to significantly attenuate cisplatin-induced bioenergetics alterations (decrease in RCI, state 3, ADP/O ratio and complex I activity). This is in agreement with the previously reported capacity of curcumin to decrease mitochondrial respiration alterations in other AKI experimental models (Molina-Jijon et al., 2011; Tapia et al., 2014).

The uncoupling of mitochondria can promote oxidative stress by the increase in the leak of electrons in the ETC, which leads to higher ROS production. In this context, our results showed both uncoupled mitochondria and higher mitochondrial H₂O₂ production in the CIS group, which were prevented by curcumin administration. In addition, it has been previously reported that cisplatin decreases catalase at both mRNA expression and protein levels (Oh et al., 2017) which may explain, at least in part, H₂O₂ higher levels. On the other hand, the H₂O₂ scavenging activity of curcumin (Trujillo et al., 2016) may explain, at least in part, the ability of curcumin to decrease mitochondrial H₂O₂ levels.

It has been reported that alterations in mitochondrial bioenergetics, specifically in mtMP can modify mitochondrial dynamic balance (Jones et al., 2017; Aparicio-Trejo et al., 2017; Morigi et al., 2015). Moreover, an increase in DRP1 level and mitochondrial fragmentation has recently been reported in a cisplatin-induced AKI mouse model (Morigi et al., 2015). In this work, cisplatin was found to increase FIS1 protein and modify mitochondrial ultrastructure. Cisplatin also decreased the expression of the mitochondrial fusion protein OPA1. These results suggest a shift in the mitochondrial dynamic balance to fission. On the other hand, curcumin administration attenuates both FIS1 levels increment and the ultrastructural changes, and also restores OPA1 levels, thus indicating that curcumin is able to restore the mitochondrial dynamic imbalance. In this regard, in our laboratory, it has been reported that curcumin could decrease mitochondrial fission in maleate-induced nephrotoxicity (Molina-Jijon et al., 2016). Interestingly, the CUR group showed higher MFN1 levels than the VEH group. In agreement with this, previous studies have shown that other antioxidants such as sulforaphane (O'Mealey et al., 2017) and

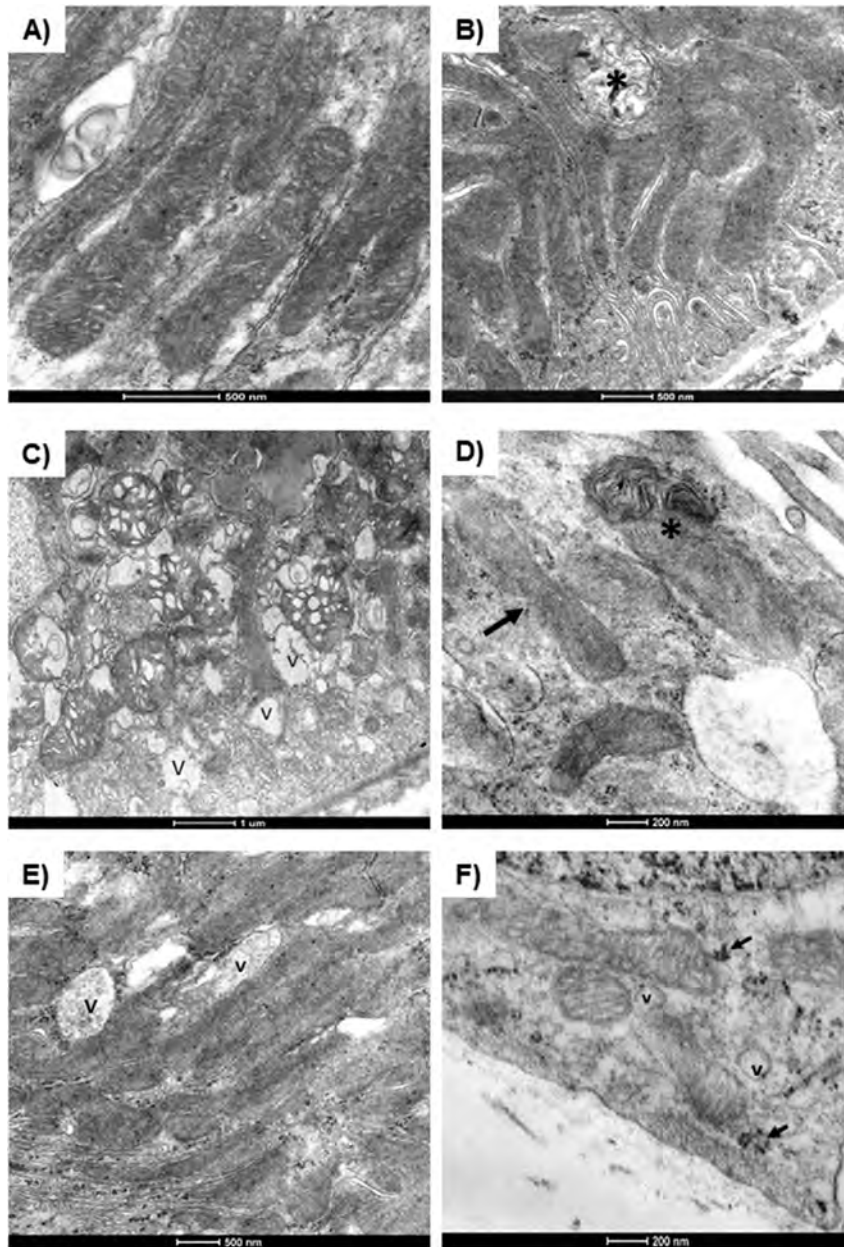


Fig. 9. Representative micrographs of the kidney ultrastructure in the different experimental groups: (A) Vehicle (VEH)-treated group. (B) Curcumin (CUR)-treated group. There is a double membrane vacuole which corresponds to autophagosome (asterisk). (C) Cisplatin (CIS)-treated group. Numerous swollen mitochondria with ruptured cristae and surrounded by empty vacuoles (V) delimited by thin membranes. (D) High power micrograph of the same cell showing in (C), there is a phagosome involving a mitochondria or mitophagosome (asterisk) and long mitochondria with central constriction suggesting fission mitochondria (arrow). (E) Curcumin + cisplatin (CUR + CIS) group. Some cytoplasmic empty vacuoles (V) are shown. (F) High power micrograph of cell showed in (E), there are small vacuoles (V) and numerous ribosomes (arrows).

resveratrol (Robb et al., 2017) increase mitochondrial fusion, suggesting that curcumin treatment may also be able to increase mitochondrial fusion.

SIRT3 is the major mitochondrial NAD⁺-dependent deacetylase, it maintains the ATP levels by deacetylation and activation of complex I (Ahn et al., 2008) and ATP synthase (Wu et al., 2013). We showed that cisplatin decreases SIRT3 protein and increases acetylated lysine levels (that may be secondary to the lower SIRT3 levels), and that the administration of curcumin prevents these alterations. The decrease in SIRT3 with cisplatin treatment is consistent with previous studies (Morigi et al., 2015). It has been reported that SIRT3 deacetylates OPA1, which increases its guanosine triphosphatase (GTPase) activity and improves mitochondrial

fusion (Samant et al., 2014); this is consistent with an increase in SIRT3 activity together with an increase in mitochondrial fusion markers found in our study. Moreover, SIRT3 has shown nephroprotective effects related to the preservation of mitochondrial ultrastructure integrity, decreasing mitochondrial fission, by DRP1 levels reduction, and preventing depolarization of mitochondrial membrane in mice with AKI induced by cisplatin (Morigi et al., 2015). The relevance of SIRT3 in AKI has been shown in studies using SIRT3-deficient mice whose survival index was lower than wild type mice when they were treated with cisplatin (Morigi et al., 2015). Our results suggest that curcumin can positively regulate SIRT3 protein and that its regulation may be involved in the protective effects of curcumin in the mitochondrial bioenergetics and

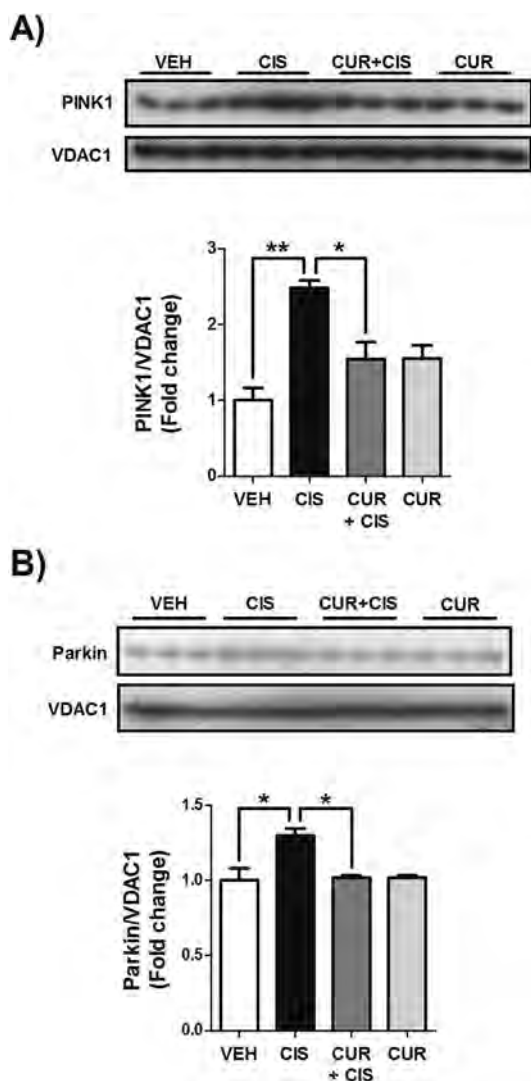


Fig. 10. Curcumin decreases the levels of proteins involved in mitophagy in cisplatin-induced acute kidney injury (AKI). Western blot was performed in mitochondria isolated of renal cortex. (A) Immunodetection and densitometry of PINK1. (B) Immunodetection and densitometry of parkin. Voltage-dependent anion selective channel 1 (VDAC1) was used as mitochondrial loading control. Data are presented as mean ± SEM, n = 3. *p < 0.05, **p < 0.01.

dynamic. Interestingly, some studies have shown that curcumin can regulate histone deacetylase (HDAC) both positively and negatively, such as HDAC 2, which is positively regulated (Meja et al., 2008), and HDAC 1, 3 and 8, which are negatively regulated (Chen et al., 2007; Liu et al., 2005).

Further, it has been demonstrated that high levels of FIS1 protein promote autophagy in mouse embryonic fibroblasts cells (Gomes and Scorrano, 2008). In this context, mitophagy is induced by mitochondrial fission and by the decrease in mtMP (Anzell et al., 2017; Morigi et al., 2015). Mitophagy induction is associated with an increase in mitochondrial proteins PINK1 and parkin (Anzell et al., 2017; Zhao et al., 2017). The kinase protein PINK1 phosphorylates parkin allowing its activation and the poly-ubiquitination of proteins from the outer membrane (Durcan and Fon, 2015). In the present study, cisplatin was found to increase PINK1 and parkin levels, which suggest autophagy induction that was confirmed by ultrastructural studies showing numerous autophagosomes involving mitochondria in epithelial cells from proximal convoluted tubules. The administration of curcumin was able to maintain the levels of PINK1 and parkin, compared to vehicle-treated rats. It has been reported that when autophagy is blocked by inhibitors (Periyasamy-Thandavan et al., 2008) or by knockout of autophagy-related protein 5 (Atg5) (Takahashi et al., 2012) and Atg7 (Jiang et al., 2012) in mouse treated with cisplatin, the increase in BUN and creatinine is higher than in wild type cisplatin-treated mice, thus suggesting that autophagy may have a protective role in cisplatin-induced renal damage. Likewise, Zhao et al. (2017) found that inhibition of mitophagy by knockdown of PINK1 and parkin leads to apoptosis and decrease in both ATP content and mtMP; the overexpression of both proteins prevented these alterations. Hence, this suggests that mitophagy plays a protective role in cisplatin-induced AKI *in vitro*, by decreasing ROS levels after elimination of damaged mitochondria. On the other hand, it has been reported that curcumin can induce autophagy, by activating transcription factor EB, a key nuclear transcription factor that regulates autophagy and lysosome biogenesis and function (Zhang et al., 2016). It was observed that treatment with curcumin prevented the cisplatin-induced increase in PINK1 and parkin. In the CUR group, no changes were found in PINK1 and parkin levels. Nevertheless, in the present study, some autophagosomes were observed in the ultrastructural examination of the kidney of rats of the CUR group.

Cisplatin induces alterations in mitochondrial bioenergetics and redox balance, the mechanisms include (Fig. 11): decrease in state

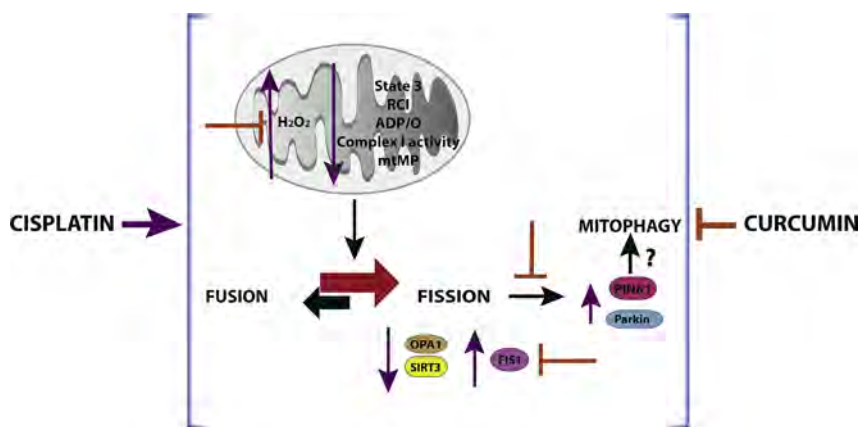


Fig. 11. Integrative scheme showing the cisplatin-induced mitochondrial alterations and the effect of curcumin described in this work. Cisplatin effects are displayed with purple arrows. Orange bars display the effects of curcumin. The red arrow shows that cisplatin treatment favors mitochondrial fission. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3, in RCI, in ADP/O, in complex I activity and in mtMP leading to enhanced mitochondrial H₂O₂ production. The mitochondrial defects in the OXPHOS, together with the oxidative stress and the mitochondrial membrane depolarization allow an increase in fission process, as evidenced by the increase in FIS1 levels and the decrease in OPA1 levels. Additionally, the SIRT3 levels and activity were decreased, thus favoring the imbalance of mitochondrial dynamic to fission (Fig. 11). The increase in mitochondrial fission and the mitochondrial depolarization also increases PINK1 and parkin proteins, suggesting the induction of mitophagy as a mechanism to remove the damaged mitochondria (Fig. 11). Finally, it is shown that curcumin treatment is able to prevent all these alterations (Fig. 11).

In conclusion, the protective effect of curcumin in cisplatin-induced AKI was associated with the prevention of the alterations in mitochondrial bioenergetics, redox balance, dynamic, and SIRT3 levels.

Acknowledgements

This work was supported in part by the following grants: CONACYT 220046 and 252008 and PAPIIT IN211713 and IN201316. We thank Dr. Ismael Torres and Dr. Enrique Pinzón for the technical support with experimental animals. Bibiana Ortega-Domínguez is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received the fellowship 233661 from CONACYT.

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2017.07.018>.

References

- Ahn, B.H., Kim, H.S., Song, S., Lee, I.H., Liu, J., Vassilopoulos, A., Deng, C.X., Finkel, T., 2008. A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 14447–14452 doi:0803790105 [pii] 10.1073/pnas.0803790105.
- Anzell, A.R., Maizy, R., Przyklenk, K., Sanderson, T.H., 2017. Mitochondrial quality control and disease: insights into ischemia-reperfusion injury. *Mol. Neurobiol.* <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-017-0503-910.1007/s12035-017-0503-9> [pii].
- Aparicio-Trejo, O.E., Tapia, E., Molina-Jijón, E., Medina-Campos, O.N., Macías-Ruvalcaba, N.A., Leon-Contreras, J.C., Hernandez-Pando, R., Garcia-Arroyo, F.E., Cristobal, M., Sanchez-Lozada, L.G., Pedraza-Chaverri, J., 2017. Curcumin prevents mitochondrial dynamics disturbances in early 5/6 nephrectomy: relation to oxidative stress and mitochondrial bioenergetics. *Biofactors* 43, 293–310. <http://dx.doi.org/10.1002/biof.1338>.
- Apostolova, N., Victor, V.M., 2015. Molecular strategies for targeting antioxidants to mitochondria: therapeutic implications. *Antioxid. Redox Signal* 22, 686–729. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2014.5952>.
- Chen, Y., Shu, W., Chen, W., Wu, Q., Liu, H., Cui, G., 2007. Curcumin, both histone deacetylase and p300/CBP-specific inhibitor, represses the activity of nuclear factor kappa B and Notch 1 in Raji cells. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 101, 427–433 doi:PTO142 [pii]10.1111/j.1742-7843.2007.00142.x.
- Choi, Y.M., Kim, H.K., Shim, W., Anwar, M.A., Kwon, J.W., Kwon, H.K., Kim, H.J., Jeong, H., Kim, H.M., Hwang, D., Kim, H.S., Choi, S., 2015. Mechanism of cisplatin-induced cytotoxicity is correlated to impaired metabolism due to mitochondrial ROS generation. *PLoS One* 10, e0135083. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0135083PONE-D-15-11027> [pii].
- Durcan, T.M., Fon, E.A., 2015. The three P's of mitophagy: PARKIN, PINK1, and post-translational modifications. *Genes Dev.* 29, 989–999 doi:29/10/989 [pii] 10.1101/gad.262758.115.
- Fernández-Rojas, B., Rodríguez-Rangel, D.S., Granados-Castro, L.F., Negrette-Guzmán, M., León-Contreras, J.C., Hernández-Pando, R., Molina-Jijón, E., Reyes, J.L., Zazueta, C., Pedraza-Chaverri, J., 2015. C-phycocyanin prevents cisplatin-induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Mol. Cell. Biochem.* 406, 183–197. <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-015-2436-9>.
- Friedman, J.R., Nunnari, J., 2014. Mitochondrial form and function. *Nature* 505, 335–343 doi:nature12985 [pii]10.1038/nature12985.
- Garrido, N., Perez-Martos, A., Faro, M., Lou-Bonafonte, J.M., Fernandez-Silva, P., Lopez-Perez, M.J., Montoya, J., Enriquez, J.A., 2008. Cisplatin-mediated impairment of mitochondrial DNA metabolism inversely correlates with glutathione levels. *Biochem. J.* 414, 93–102 doi:BJ20071615 [pii]10.1042/BJ20071615.
- Gomes, L.C., Scorrano, L., 2008. High levels of Fis1, a pro-fission mitochondrial protein, trigger autophagy. *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 860–866 doi:S0005-2728(08)00593-8 [pii]10.1016/j.bbabbio.2008.05.442.
- Granados-Castro, L.F., Rodríguez-Rangel, D.S., Fernandez-Rojas, B., Leon-Contreras, J.C., Hernandez-Pando, R., Medina-Campos, O.N., Eugenio-Perez, D., Pinzon, E., Pedraza-Chaverri, J., 2016. Curcumin prevents paracetamol-induced liver mitochondrial alterations. *J. Pharm. Pharmacol.* 68, 245–256. <http://dx.doi.org/10.1111/jphp.12501>.
- Jiang, M., Wei, Q., Dong, G., Komatsu, M., Su, Y., Dong, Z., 2012. Autophagy in proximal tubules protects against acute kidney injury. *Kidney Int.* 82, 1271–1283 doi:S0085-2538(15)55485-9 [pii]10.1038/ki.2012.261.
- Jones, E., Gaytan, N., Garcia, I., Herrera, A., Ramos, M., Agarwala, D., Rana, M., Innis-Whitehouse, W., Schuenzel, E., Gilkerson, R., 2017. A threshold of transmembrane potential is required for mitochondrial dynamic balance mediated by DRP1 and OMA1. *Cell Mol. Life Sci.* 74, 1347–1363. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-016-2421-910.1007/s00018-016-2421-9> [pii].
- Kruidering, M., Van de Water, B., de Heer, E., Mulder, G.J., Nagelkerke, J.F., 1997. Cisplatin-induced nephrotoxicity in porcine proximal tubular cells: mitochondrial dysfunction by inhibition of complexes I to IV of the respiratory chain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280, 638–649.
- Krumschnabel, G., Eigentler, A., Fasching, M., Gnaiger, E., 2014. Use of safranin for the assessment of mitochondrial membrane potential by high-resolution respirometry and fluorometry. *Methods Enzym.* 542, 163–181 doi:B978-0-12-416618-9.00009-1 [pii]10.1016/B978-0-12-416618-9.00009-1.
- Kuhad, A., Pilkhal, S., Sharma, S., Tirkey, N., Chopra, K., 2007. Effect of curcumin on inflammation and oxidative stress in cisplatin-induced experimental nephrotoxicity. *J. Agric. Food Chem.* 55, 10150–10155. <http://dx.doi.org/10.1021/jf0723965>.
- Kumar, P., Sulakhiya, K., Barua, C.C., Mundhe, N., 2017. TNF-alpha, IL-6 and IL-10 expressions, responsible for disparity in action of curcumin against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Mol. Cell Biochem.* <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-017-2981-510.1007/s11010-017-2981-5> [pii].
- Liu, H.L., Chen, Y., Cui, G.H., Zhou, J.F., 2005. Curcumin, a potent anti-tumor reagent, is a novel histone deacetylase inhibitor regulating B-NHL cell line Raji proliferation. *Acta Pharmacol. Sin.* 26, 603–609. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-7254.2005.00081.x>.
- Liu, Z., Dou, W., Zheng, Y., Wen, Q., Qin, M., Wang, X., Tang, H., Zhang, R., Lv, D., Wang, J., Zhao, S., 2016. Curcumin upregulates Nrf2 nuclear translocation and protects rat hepatic stellate cells against oxidative stress. *Mol. Med. Rep.* 13, 1717–1724. <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2015.4690>.
- Makrecka-Kuka, M., Krumschnabel, G., Gnaiger, E., 2015. High-resolution respirometry for simultaneous measurement of oxygen and hydrogen peroxide fluxes in permeabilized cells, tissue homogenate and isolated mitochondria. *Biomolecules* 5, 1319–1338 doi:biom5031319 [pii]10.3390/biom5031319.
- Meja, K.K., Rajendrasozhan, S., Adenuga, D., Biswas, S.K., Sundar, I.K., Spooner, G., Marwick, J.A., Chakravarty, P., Fletcher, D., Whittaker, P., Megson, I.L., Kirkham, P.A., Rahman, I., 2008. Curcumin restores corticosteroid function in monocytes exposed to oxidants by maintaining HDAC2. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 39, 312–323 doi:2008-00120C [pii]10.1165/rcmb.2008-00120C.
- Miller, R.P., Tadagavadi, R.K., Ramesh, G., Reeves, W.B., 2010. Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity. *Toxins (Basel)* 2, 2490–2518. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins2112490toxins-02-02490> [pii].
- Molina-Jijón, E., Aparicio-Trejo, O.E., Rodríguez-Munoz, R., Leon-Contreras, J.C., Del Carmen Cardenas-Aguayo, M., Medina-Campos, O.N., Tapia, E., Sanchez-Lozada, L.G., Hernandez-Pando, R., Reyes, J.L., Arreola-Mendoza, L., Pedraza-Chaverri, J., 2016. The nephroprotection exerted by curcumin in maleate-induced renal damage is associated with decreased mitochondrial fission and autophagy. *Biofactors* 42, 686–702. <http://dx.doi.org/10.1002/biof.1313>.
- Molina-Jijón, E., Tapia, E., Zazueta, C., El Hafidi, M., Zatarain-Barron, Z.L., Hernandez-Pando, R., Medina-Campos, O.N., Zarco-Marquez, G., Torres, I., Pedraza-Chaverri, J., 2011. Curcumin prevents Cr(VI)-induced renal oxidant damage by a mitochondrial pathway. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 1543–1557 doi:S0891-5849(11)00471-0 [pii]10.1016/j.freeradbiomed.2011.07.018.
- Morigi, M., Perico, L., Rota, C., Longaretti, L., Conti, S., Rottoli, D., Novelli, R., Remuzzi, G., Benigni, A., 2015. Sirtuin 3-dependent mitochondrial dynamic improvements protect against acute kidney injury. *J. Clin. Invest.* 125, 715–726 doi:77632 [pii]10.1172/JCI77632.
- Nowak, G., 2002. Protein kinase C-alpha and ERK1/2 mediate mitochondrial dysfunction, decreases in active Na⁺ transport, and cisplatin-induced apoptosis in renal cells. *J. Biol. Chem.* 277, 43377–43388. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M206373200M206373200> [pii].
- O'Mealey, G.B., Berry, W.L., Plafker, S.M., 2017. Sulforaphane is a Nrf2-independent inhibitor of mitochondrial fission. *Redox Biol.* 11, 103–110 doi:S2213-2317(16)30275-0 [pii]10.1016/j.redox.2016.11.007.
- Oh, C.J., Ha, C.M., Choi, Y.K., Park, S., Choe, M.S., Jeoung, N.H., Huh, Y.H., Kim, H.J., Kwon, H.S., Lee, J.M., Lee, S.J., Jeon, J.H., Harris, R.A., Park, K.G., Lee, I.K., 2017. Pyruvate dehydrogenase kinase 4 deficiency attenuates cisplatin-induced acute kidney injury. *Kidney Int.* 91, 880–895 doi:S0085-2538(16)30610-X [pii] 10.1016/j.kint.2016.10.011.
- Ozkok, A., Edelstein, C.L., 2014. Pathophysiology of cisplatin-induced acute kidney injury. *Biomed. Res. Int.* 2014, 967826. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/967826>.
- Pan, H., Shen, K., Wang, X., Meng, H., Wang, C., Jin, B., 2014. Protective effect of metalloporphyrins against cisplatin-induced kidney injury in mice. *PLoS One* 9, e86057. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0086057PONE-D-13-28896> [pii].
- Pedraza-Chaverri, J., Sanchez-Lozada, L.G., Osorio-Alonso, H., Tapia, E., Scholze, A.,

2016. New pathogenic concepts and therapeutic approaches to oxidative stress in chronic kidney disease. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2016, 6043601. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/6043601>.
- Periyasamy-Thandavan, S., Jiang, M., Wei, Q., Smith, R., Yin, X.M., Dong, Z., 2008. Autophagy is cytoprotective during cisplatin injury of renal proximal tubular cells. *Kidney Int.* 74, 631–640 doi:S0085-2538(15)53367-X [pii]10.1038/ki.2008.214.
- Rezaee, R., Momtazi, A.A., Monemi, A., Sahebkar, A., 2017. Curcumin: a potentially powerful tool to reverse cisplatin-induced toxicity. *Pharmacol. Res.* 117, 218–227 doi:S1043-6618(16)31079-9 [pii]10.1016/j.phrs.2016.12.037.
- Robb, E.L., Moradi, F., Maddalena, L.A., Valente, A.J., Fonseca, J., Stuart, J.A., 2017. Resveratrol stimulates mitochondrial fusion by a mechanism requiring mitofusin-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 485, 249–254 doi:S0006-291X(17)30393-5 [pii]10.1016/j.bbrc.2017.02.102.
- Sahin, K., Orhan, C., Tuzcu, M., Muqbil, I., Sahin, N., Gencoglu, H., Guler, O., Padhye, S.B., Sarkar, F.H., Mohammad, R.M., 2014. Comparative in vivo evaluations of curcumin and its analog difluorinated curcumin against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biol. Trace Elem. Res.* 157, 156–163. <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-014-9886-x>.
- Samant, S.A., Zhang, H.J., Hong, Z., Pillai, V.B., Sundaresan, N.R., Wolfgeher, D., Archer, S.L., Chan, D.C., Gupta, M.P., 2014. SIRT3 deacetylates and activates OPA1 to regulate mitochondrial dynamics during stress. *Mol. Cell Biol.* 34, 807–819 doi:MCB.01483-13 [pii]10.1128/MCB.01483-13.
- Sugiyama, S., Hayakawa, M., Kato, T., Hanaki, Y., Shimizu, K., Ozawa, T., 1989. Adverse effects of anti-tumor drug, cisplatin, on rat kidney mitochondria: disturbances in glutathione peroxidase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159, 1121–1127 doi:0006-291X(89)92225-0 [pii].
- Takahashi, A., Kimura, T., Takabatake, Y., Namba, T., Kaimori, J., Kitamura, H., Matsui, I., Niimura, F., Matsusaka, T., Fujita, N., Yoshimori, T., Isaka, Y., Rakugi, H., 2012. Autophagy guards against cisplatin-induced acute kidney injury. *Am. J. Pathol.* 180, 517–525 doi:S0002-9440(11)01016-9 [pii]10.1016/j.ajpath.2011.11.001.
- Tapia, E., Sanchez-Lozada, L.G., Garcia-Nino, W.R., Garcia, E., Cerecedo, A., Garcia-Arroyo, F.E., Osorio, H., Arellano, A., Cristobal-Garcia, M., Loredó, M.L., Molina-Jijon, E., Hernandez-Damian, J., Negrette-Guzman, M., Zazueta, C., Huerta-Yepez, S., Reyes, J.L., Madero, M., Pedraza-Chaverri, J., 2014. Curcumin prevents maleate-induced nephrotoxicity: relation to hemodynamic alterations, oxidative stress, mitochondrial oxygen consumption and activity of respiratory complex I. *Free Radic. Res.* 48, 1342–1354. <http://dx.doi.org/10.3109/10715762.2014.954109>.
- Topcu-Tarladacalisir, Y., Sapmaz-Metin, M., Karaca, T., 2016. Curcumin counteracts cisplatin-induced nephrotoxicity by preventing renal tubular cell apoptosis. *Ren. Fail* 38, 1741–1748. <http://dx.doi.org/10.1080/0886022X.2016.1229996>.
- Trujillo, J., Molina-Jijon, E., Medina-Campos, O.N., Rodriguez-Munoz, R., Reyes, J.L., Loredó, M.L., Barrera-Oviedo, D., Pinzon, E., Rodriguez-Rangel, D.S., Pedraza-Chaverri, J., 2016. Curcumin prevents cisplatin-induced decrease in the tight and adherens junctions: relation to oxidative stress. *Food Funct.* 7, 279–293. <http://dx.doi.org/10.1039/c5fo00624d>.
- Waseem, M., Kaushik, P., Parvez, S., 2013. Mitochondria-mediated mitigatory role of curcumin in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Cell Biochem. Funct.* 31, 678–684. <http://dx.doi.org/10.1002/cbf.2955>.
- Wu, Y.T., Lee, H.C., Liao, C.C., Wei, Y.H., 2013. Regulation of mitochondrial F₀F₁ ATPase activity by Sirt3-catalyzed deacetylation and its deficiency in human cells harboring 4977bp deletion of mitochondrial DNA. *Biochim. Biophys. Acta* 1832, 216–227 doi:S0925-4439(12)00224-4 [pii]10.1016/j.bbdis.2012.10.002.
- Yang, C., Zhang, X., Fan, H., Liu, Y., 2009. Curcumin upregulates transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia. *Brain Res.* 1282, 133–141 doi:S0006-8993(09)00929-9 [pii]10.1016/j.brainres.2009.05.009.
- Zhan, M., Brooks, C., Liu, F., Sun, L., Dong, Z., 2013. Mitochondrial dynamics: regulatory mechanisms and emerging role in renal pathophysiology. *Kidney Int.* 83, 568–581 doi:S0085-2538(15)55790-6 [pii]10.1038/ki.2012.441.
- Zhang, J., Wang, J., Xu, J., Lu, Y., Jiang, J., Wang, L., Shen, H.M., Xia, D., 2016. Curcumin targets the TFEB-lysosome pathway for induction of autophagy. *Oncotarget* 7, 75659–75671 doi:12318 [pii]10.18632/oncotarget.12318.
- Zhao, C., Chen, Z., Xu, X., An, X., Duan, S., Huang, Z., Zhang, C., Wu, L., Zhang, B., Zhang, A., Xing, C., Yuan, Y., 2017. Pink1/Parkin-mediated mitophagy play a protective role in cisplatin induced renal tubular epithelial cells injury. *Exp. Cell Res.* 350, 390–397 doi:S0014-4827(16)30430-X [pii]10.1016/j.yexcr.2016.12.015.