



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Mecanismo del efecto protector de la alfa mangostina en el daño renal inducido por cisplatino: evaluación del daño mitocondrial, del estrés del retículo endoplásmico y de la autofagia.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

LAURA MARÍA REYES FERMÍN

TUTOR:

DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI  
[Facultad de Química](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. XOCHITL PÉREZ GARCÍA  
[Instituto De Fisiología Celular](#)

DRA. PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ  
[Instituto Nacional De Neurología](#)

Ciudad de México. Diciembre, 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

Este proyecto fue financiado por:

- El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), proyecto A1-S-7495.
- El Programa de apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), proyecto IN202219.
- El Programa de apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP), proyecto 5000-9105.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas y a la Facultad de Química.

En especial al Dr. José Pedraza Chaverri, por permitirme llegar al término del posgrado.

A los miembros del jurado por sus comentarios y correcciones:

Presidente: Dr. Roberto Coria Ortega

Vocal: Dra. Amelia Farrés González Sarabia

Vocal: Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz

Vocal: Dr. Carlos Leonardo Peraza Reyes

Secretario: Dra. Lena Ruiz Azuara

Una dedicatoria especial a mis papás, Raymundo Reyes Soriano y a mi hermosa Ma. del Rosario Fermín Guzmán. Estás presente en mi corazón y mente.

A los integrantes del laboratorio durante la realización del proyecto, gracias por una estancia agradable y enriquecedora: Dr. Emiliano, Dr. Sabino, M en C Alejandra Lira y Dra. Bibiana. Al M en C Omar Noel Medina Campos por el apoyo recibido.

## ÍNDICE

<b>Abreviaturas</b> .....	1
<b>Resumen</b> .....	3
<b>Abstract</b> .....	5
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	7
1.1 Alfa mangostina ( $\alpha$ M) .....	7
1.2 Efecto nefroprotector de la $\alpha$ M.....	9
1.3 Mecanismos relacionados con la protección de la $\alpha$ M .....	10
1.4 Cisplatino (CDDP) .....	12
1.5 Función mitocondrial .....	14
1.6 Estrés del RE .....	18
1.7 Autofagia .....	21
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	24
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	24
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	24
4.1 Objetivo general.....	24
4.2 Objetivos específicos.....	24
<b>5. METODOLOGÍA</b> .....	25
5.1 Reactivos .....	25
5.2 Modelo experimental .....	26
5.3 Viabilidad celular.....	26
5.4 Western blot.....	27
5.5 Control respiratorio celular .....	28
5.6 Marcaje mitocondrial con MitoTracker Green.....	29
5.7 Análisis estadístico .....	29
<b>6. RESULTADOS</b> .....	29
6.1 La $\alpha$ M evita la muerte celular inducida por CDDP. ....	29

6.2 La protección del $\alpha$ M se asocia a la preservación de la bioenergética mitocondrial.....	30
6.3 La $\alpha$ M previene parcialmente la disminución de la masa mitocondrial inducida por CDDP, al evitar la disminución en la biogénesis mitocondrial. ....	33
6.4 La inducción de la mitofagia juega un papel importante en la protección por $\alpha$ M .....	36
6.5 Participación del estrés del RE en el mecanismo de protección de la $\alpha$ M ...	40
7. DISCUSIÓN.....	43
8. CONCLUSIÓN .....	49
9. PERSPECTIVAS.....	50
10. BIBLIOGRFÍA.....	51
11. ARTÍCULOS PUBLICADOS .....	61

## Abreviaturas

<b><math>\alpha</math>M</b>	Alfa mangostina.
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico.
<b>Akt</b>	Cinasa de serina/treonina.
<b>AMPK</b>	Proteína cinasa activada por AMP.
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico.
<b>ASK1</b>	Cinasa 1 reguladora de la señal de apoptosis.
<b>ATF4</b>	Factor de transcripción activador 4.
<b>ATF6<math>\alpha</math></b>	Factor de transcripción activador 6 alfa.
<b>Atg</b>	Proteína relacionada a la autofagia.
<b>Bim</b>	Mediador de la muerte celular que interactúa con Bcl-2.
<b>CD5</b>	Glicoproteína CD5 de superficie de células T.
<b>CDDP</b>	<i>Cis</i> -diclorodiaminoplatino II o cisplatino.
<b>CII-SDHB</b>	Succinato deshidrogenasa, subunidad B.
<b>CI-NDUFB8</b>	NADH: ubiquinona oxidoreductasa, subunidad B8.
<b>CIV-MTCO1</b>	Citocromo c oxidasa mitocondrial, subunidad catalítica.
<b>CQ</b>	Cloroquina.
<b>CR</b>	Control respiratorio.
<b>CV-ATP5A</b>	Adenosín trifosfato (ATP) sintasa F, subunidad alfa.
<b>CYP</b>	Citocromo.
<b>CHOP</b>	Proteína homóloga de la proteína de unión al potenciador (C/EBP).
<b>DE</b>	Desviación estándar.
<b>DNP</b>	2,4-dinitrofenol.
<b>DPPH</b>	1-difenil-2-picril-hidracilo.
<b>DRP1</b>	Proteína 1 relacionada con la dinamina.
<b>DTT</b>	Ditiotreitol.
<b>E</b>	Capacidad máxima del sistema de transporte de electrones.
<b>eIF2<math>\alpha</math></b>	Factor 2 de iniciación de la traducción eucariota, subunidad alfa.
<b>ERAD</b>	Degradación asociada al RE.
<b>ERK</b>	Cinasa regulada por señales extracelulares.
<b>ETS</b>	Sistema de transporte de electrones.
<b>FDA</b>	Diacetato de fluoresceína.
<b>FIS1</b>	Proteína de fisión 1.
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente.
<b>GRP78</b>	Proteína regulada por glucosa de 78 kDa.
<b>GRP94</b>	Proteína regulada por glucosa de 94 kDa.
<b>HO-1</b>	Hemo oxigenasa 1.
<b>IRE1<math>\alpha</math></b>	Proteína 1 alfa que requiere inositol.
<b>JNK</b>	Cinasa c-Jun N-terminal.
<b>LC3-I</b>	Cadena 3 de la proteína 1A/1B asociada a los microtúbulos.

<b>LC3-II</b>	Forma lipidada de LC3-I.
<b>LLC-PK1</b>	Línea celular de túbulo proximal de cerdo.
<b>MAPK</b>	Proteína cinasa activada por mitógenos.
<b>MFN1</b>	Mitofusina 1.
<b>MFN2</b>	Mitofusina 2.
<b>NF-kB</b>	Factor nuclear kappa B.
<b>NRF1</b>	Factor nuclear respiratorio 1.
<b>NRF2</b>	Factor nuclear respiratorio 2.
<b>Nrf2</b>	Factor 2 relacionado al factor nuclear eritroideo 2.
<b>OCR</b>	Consumo basal de oxígeno.
<b>OCT2</b>	Transportador de cationes orgánicos 2.
<b>OPA1</b>	Proteína de atrofia óptica 1.
<b>OXPHOS</b>	Fosforilación oxidativa.
<b>P</b>	Respiración asociada a la fosforilación oxidativa.
<b>p62</b>	Proteína de unión a ubiquitina p62.
<b>PERK</b>	Cinasa del RE parecida a la proteína cinasa activada por ARN.
<b>PGC1<math>\alpha</math></b>	Coactivador del receptor gama activado por el proliferador de peroxisomas 1 alfa.
<b>PI3K</b>	Fosfatidil inositol 3 cinasa clase III.
<b>PINK1</b>	Cinasa inducida por el homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) 1.
<b>p-mTOR</b>	Forma fosforilada de la proteína diana sensible a rapamicina en mamíferos.
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Receptor gama activado por el proliferador de peroxisomas.
<b>PUMA</b>	Modulador de apoptosis sobrerregulado por p53.
<b>RE</b>	Retículo endoplásmico.
<b>RIDD</b>	Decaimiento dependiente de IRE1.
<b>RNS</b>	Especies reactivas de nitrógeno.
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno.
<b>SIRT1</b>	Sirtuina 1.
<b>TFAM</b>	Factor de transcripción mitocondrial A.
<b>Tg</b>	Tapsigargina.
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa.
<b>TRAF2</b>	Factor 2 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral.
<b>UGT</b>	UDP-glucuronosiltransferasas.
<b>ULK1</b>	Unc-51 como la cinasa activadora de autofagia 1.
<b>UPR</b>	Respuesta a proteínas mal desplegadas.
<b>VDAC</b>	Canal de aniones dependiente de voltaje.
<b>VMP1</b>	Proteína de membrana de vacuola 1.
<b>XBP1s</b>	Proteína de unión 1 a la caja X con <i>splicing</i> .



## Resumen

**Antecedentes:** La alfa mangostina ( $\alpha$ M) es una xantona presente en el árbol de mangostán (*Garcinia mangostana* Linn), el cual se ha usado en la medicina tradicional de Asia. En diversos estudios se ha demostrado que la  $\alpha$ M posee una gran variedad de actividades biológicas. En estudios *in vitro* e *in vivo* realizados en nuestro laboratorio, se ha demostrado que la  $\alpha$ M ejerce un efecto nefroprotector contra el daño inducido por cisplatino (CDDP), debido a la disminución del estrés oxidante y la apoptosis. Sin embargo, el mecanismo de daño por CDDP también involucra alteraciones en la función mitocondrial, el estrés del retículo endoplásmico (RE) y la autofagia. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es evaluar la participación de la  $\alpha$ M en el efecto nefroprotector, a través de la evaluación de la función mitocondrial, del estrés del RE y de la autofagia frente a CDDP, en cultivo de células de túbulo proximal renal (LLC-PK1).

**Metodología:** La línea celular LLC-PK1, de túbulo proximal de cerdo, se cultivó a una densidad de  $50 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>. Las células se expusieron a concentraciones de  $\alpha$ M, CDDP y a la co-incubación de ambos ( $\alpha$ M+CDDP). Después de 24 h de tratamiento, se determinó la viabilidad celular, parámetros respiratorios, así como marcadores de fusión y biogénesis mitocondrial, mitofagia, autofagia y estrés del RE. Adicionalmente se evaluó el efecto de la  $\alpha$ M y el CDDP sobre el estrés del RE y la autofagia, mediante el uso de inhibidores de autofagia e inductores de estrés del RE.

**Resultados:** El CDDP redujo la respiración de rutina celular, la respiración desacoplada (*Leak*), la capacidad máxima del sistema de transporte de electrones (E) y la respiración asociada a la fosforilación oxidativa (P), lo cual se evitó con la co-incubación de la  $\alpha$ M. El CDDP no modificó el control respiratorio (CR), el porcentaje de respiración asociado al complejo I, ni la actividad del complejo IV, lo que sugirió que los cambios en los parámetros respiratorios estaban asociados a cambios en la masa mitocondrial. El CDDP redujo los niveles del canal de aniones

dependiente de voltaje (VDAC) y de subunidades de los complejos mitocondriales. Esta reducción de la masa mitocondrial se asoció a la disminución de los marcadores de biogénesis mitocondrial, como el factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) y la subunidad catalítica de la citocromo c oxidasa mitocondrial (CIV-MTCO1). Adicionalmente, el CDDP indujo la fragmentación de la red mitocondrial, evaluada con MitoTracker Green, y la reducción en los niveles de mitofusina 2 (MFN2, involucrada en la fusión), lo cual se asoció al incremento de los marcadores de mitofagia, como la cinasa inducida por el homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) 1 (PINK) y Parkin. Todos estos cambios se evitaron con la co-incubación de  $\alpha$ M. En nuestro modelo, con las estrategias experimentales utilizadas no se demostró una relación con el estrés del RE ni el proceso de autofagia en la protección por  $\alpha$ M, sin embargo, no se descartan estos posibles mecanismos.

**Conclusión:** En este trabajo se demostró que la  $\alpha$ M es capaz de proteger contra la toxicidad del CDDP a través de la preservación de la masa mitocondrial.

## Abstract

**Background:** Alpha mangostin ( $\alpha$ M) is a xanthone present in the mangosteen tree (*Garcinia mangostana* Linn), has been used in traditional Asian medicine. Studies show that  $\alpha$ M has a wide variety of biological activities. *In vitro* and *in vivo* studies carried out in our research group demonstrated that it exerts a nephroprotective effect against cisplatin (CDDP)-induced cell damage due to decreased oxidative stress and apoptosis. However, the mechanism of CDDP damage involves alterations in mitochondrial function, endoplasmic reticulum (ER) stress, and autophagy. Therefore, the objective of the present work is to evaluate the participation of  $\alpha$ M in the nephroprotective effect against CDDP through the evaluation of mitochondrial function, ER stress, and autophagy in LLC-PK1 cell cultures.

**Methodology:** The LLC-PK1 cell line, from pig proximal tubule, was grown at a density of  $50 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>. LLC-PK1 cells were exposed to  $\alpha$ M, CDDP, or co-incubation of  $\alpha$ M and CDDP for 24 h. After treatment, the following parameters were evaluated: cell viability, the respiratory parameters, markers for biogenesis, fusion, mitophagy, autophagy, and ER stress. Additionally, through the use of autophagy inhibitors and ER stress inducers was evaluated the effect of ER stress and autophagy.

**Results:** It was found that  $\alpha$ M co-incubation prevented the CDDP reduced routine respiration, leak or decoupled respiration, the maximum capacity of the electron transport system (E), and respiration associated with oxidative phosphorylation (P). Interestingly, CDDP did not modify respiratory control (RC), the percentage of respiration associated with complex I or the activity of complex IV, suggesting that those changes in respiratory parameters are associated with changes in mitochondrial mass. Also, the CDDP decreased the protein levels of voltage-dependent anion carrier (VDAC) and mitochondrial complex. This reduction in mitochondrial mass was associated with a decrease in mitochondrial biogenesis markers (TFAM, CIV-MTCO1). Also, the CDDP induced fragmentation of the mitochondrial network evaluated by MitoTracker Green dye and the reduction in

MFN2 levels (fusion), which are associated with an increase of mitophagy markers (PINK/Parkin). All these changes were prevented by  $\alpha$ M. In this model, our experiments did not show a relationship with ER stress or the autophagy process in protection, but they cannot be discarded.

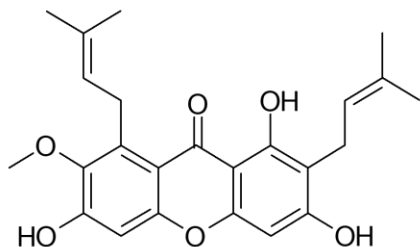
**Conclusion:** In this work, we demonstrated that  $\alpha$ M is capable of protecting against CDDP toxicity through the preservation of mitochondrial mass.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Alfa mangostina ( $\alpha$ M)

La alfa mangostina ( $\alpha$ M) es la xantona más abundante encontrada en el árbol del mangostán (*Garcinia mangostana* Linn) perteneciente a la familia Clusiaceae (Mahabusarakam et al., 1987). Se cree que el mangostán es originario del archipiélago Malayo, sin embargo el cultivo y la comercialización se da principalmente en el sudeste de Asia (Tailandia, Indonesia, Vietnam, Malasia y las Filipinas) y en menor proporción se encuentra en países como la India, Sri Lanka, Australia, Hawái, Puerto Rico, Costa Rica y México (en los estados de Chiapas y Veracruz) (Ovalle-Magallanes et al., 2017; Pedraza-Chaverri et al., 2008). El fruto del mangostán se conoce como la “reina de las frutas”, debido a su apariencia y sabor agradable, así como por sus efectos benéficos a la salud (Pedraza-Chaverri et al., 2008). Las semillas y el pericarpio de la fruta se han usado en la medicina tradicional de Asia, para tratar infecciones superficiales, heridas, disentería y diarrea, entre otras (Ovalle-Magallanes et al., 2017; Pedraza-Chaverri et al., 2008; Pérez-Rojas et al., 2009). El mangostán también se comercializa en la industria cosmética y en suplementos alimenticios, generando grandes ganancias económicas (Gutierrez-Orozco y Failla, 2013).

Los principales metabolitos secundarios presentes en el árbol del mangostán son las xantonas, las cuales poseen propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias, anti-bacterianas, anti-fúngicas, anti-cancerígenas, entre otras (Gutierrez-Orozco y Failla, 2013; Ovalle-Magallanes et al., 2017). El término xantona, designa a un grupo de compuestos de estructura dibenzo- $\gamma$ -pirona, cuya estructura química se compone de un sistema aromático de tres anillos sustituidos con grupos isopreno, metoxilo e hidroxilo generando una gran variedad de compuestos. En el mangostán se han identificado al menos 68 tipos de xantonas, 50 de las cuales se han extraído del pericarpio de la fruta (Pedraza-Chaverri et al., 2008) y siendo la  $\alpha$ M una xantona prenilada ampliamente estudiada (Fig. 1).



**Figura 1.** Estructura de la alfa mangostina ( $\alpha$ M).

La  $\alpha$ M es la principal xantona encontrada en el árbol del mangostán, su concentración en la cáscara del pericarpio es de alrededor del 4% (p/p) y representa de un 30 al 50% del contenido total de xantonas en el pericarpio de la fruta (Guzmán-Beltrán et al., 2016). En un modelo *in vitro*, se determinó que es necesario el transporte transepitelial dependiente de sales biliares en la captación de la  $\alpha$ M, lo que sugiere que la grasa en los alimentos podría contribuir a su absorción intestinal (Gutierrez-Orozco y Failla, 2013). De hecho, la  $\alpha$ M posee una biodisponibilidad baja en soluciones acuosas, pero llega a ser hasta del 60% en formulaciones de nano-emulsificaciones con aceites vegetales, además, la biodisponibilidad en soluciones oleosas es independiente a la concentración de la  $\alpha$ M (Zhao et al., 2016; Wathoni et al., 2020). Se ha sugerido que el metabolismo de la  $\alpha$ M ocurre predominantemente en el intestino delgado y en el hígado, y su eliminación se da principalmente vía filtración glomerular (Han et al., 2015). En un estudio de los productos del metabolismo de la  $\alpha$ M, se sugiere que la  $\alpha$ M puede metabolizarse vía reacciones de fase I y II, vía UDP-glucuronosiltransferasas (UGT) y vía citocromos (CYP) (Han et al., 2015).

Hasta el momento no existen evidencias de que la  $\alpha$ M sea tóxica. En ratas Wistar normales y diabéticas administradas con 10 a 2000 mg/kg de  $\alpha$ M una vez o administrada diariamente por 28 días no causó toxicidad (Ovalle-Magallanes et al., 2017). Al respecto sólo se ha demostrado que la administración de 250 mg/kg de  $\alpha$ M por 25 días causa disbiosis intestinal (Gutierrez-Orozco y Failla, 2013; Ovalle-Magallanes et al., 2017). Además, el consumo tradicional del mangostán por más de 100 años sugiere que su consumo humano es seguro, debido a que no se han descrito casos de mutagenicidad o de teratogenicidad en todo este tiempo (Ovalle-

Magallanes et al., 2017). Sin embargo, el desarrollo de nuevas formulaciones en las cuales se incrementa su biodisponibilidad, implica que se deben realizar estudios para demostrar su nula toxicidad en los diferentes vehículos.

En estudios *in vitro* e *in vivo* se ha demostrado que la  $\alpha$ M posee propiedades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatorias, anti-cancerígenas y que puede modular enfermedades metabólicas como la estetaosis y la obesidad, entre otras (Choi et al., 2015; Gutierrez-Orozco y Failla, 2013; Ovalle-Magallanes et al., 2017; Pedraza-Chaverri et al., 2008). Estas propiedades le confieren a la  $\alpha$ M un efecto protector en modelos de daño neurológico, cardiaco y renal (Devi Sampath y Vijayaraghavan, 2007; Márquez-Valadez et al., 2009; Pérez-Rojas et al., 2009). En estos modelos, la protección mediada por la  $\alpha$ M se ha asociado a la prevención del estrés oxidante, mediante la disminución en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), así como al restablecimiento en los niveles de glutatión y de la actividad de algunas enzimas antioxidantes, como la glutatión-S-transferasa, la glutatión peroxidasa, la superóxido dismutasa y la catalasa. Se ha sugerido que la  $\alpha$ M también podría incrementar la expresión de Nrf2 (factor 2 relacionado al factor nuclear eritroideo 2) y de la HO-1 (hemo oxigenasa 1) en el daño por lipopolisacárido en hígado de ratones (Fu et al., 2018), así como en tejido de retina de ratones tratados con  $\alpha$ M (Fang et al., 2016).

Por último, la capacidad antioxidante de la  $\alpha$ M se asocia a los grupos hidroxilo y prenilo dentro de su estructura, los cuales pueden neutralizar especies reactivas como el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno a través de la transferencia de protones (Martínez et al., 2011). Además es capaz de atrapar al anión superóxido, al oxígeno singulete, al peroxinitrito y radicales libres como el 1-difenil-2-picril-hidracilo (DPPH) (Jung et al., 2006; Pedraza-Chaverri et al., 2009).

## 1.2 Efecto nefroprotector de la $\alpha$ M

Hasta el momento, en pocos estudios se ha evaluado el efecto nefroprotector de la  $\alpha$ M. En estudios realizados en nuestro laboratorio, tanto en ratas como en células LLC-PK1, se ha sugerido que la  $\alpha$ M protege contra la nefrotoxicidad inducida por CDDP (*cis*-diclorodiaminoplatino II o cisplatino) (Pérez-Rojas et al., 2009; Sánchez-Pérez et al., 2010). De manera específica, en estos modelos se evaluó la capacidad

anti-oxidante y anti-inflamatoria de la  $\alpha$ M. Se demostró que el pre-tratamiento con  $\alpha$ M previene las alteraciones estructurales y funcionales renales, a través de la disminución del estrés oxidante/nitrante y la inflamación (Pérez-Rojas et al., 2009). Además, se demostró que la  $\alpha$ M evita la inducción del estrés oxidante, del incremento de la expresión p53 y de la apoptosis inducida por CDDP en células LLC-PK1 (Sánchez-Pérez et al., 2010), sugiriendo un mecanismo de protección multifactorial. Asimismo se descartó que el efecto nefroprotector de la  $\alpha$ M fuera secundario a alteraciones en la farmacocinética del CDDP o en los niveles de platino en el riñón, también se descartó que la  $\alpha$ M afectara la función renal (Pérez-Rojas et al., 2009) o la viabilidad celular (Sánchez-Pérez et al., 2010). Por otro lado, la  $\alpha$ M evitó el daño renal inducido con un marcador de contraste radiográfico (iodixanol) en células LLC-PK1, en el que los principales mecanismos conocidos de daño son el oxidante e inflamatorio (Lee et al., 2016). La  $\alpha$ M previno la apoptosis a través de la inhibición de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs): p38, la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) y la cinasa c-Jun N-terminal (JNK). Así mismo, previno la activación de la caspasa 3 (Lee et al., 2016).

Sin embargo, en los mecanismos asociados a la nefrotoxicidad inducida por CDDP, además del estrés oxidante, están involucrados también el daño mitocondrial, la autofagia y el estrés del RE (Zuk y Bonventre, 2016), los cuales no se han evaluado en la nefroprotección conferida por la  $\alpha$ M.

### 1.3 Mecanismos relacionados con la protección de la $\alpha$ M

Se ha sugerido que los mecanismos de protección de la  $\alpha$ M están relacionados a procesos multifactoriales que involucran la modulación de diferentes vías de señalización de procesos relacionados con la mitocondria, el RE y también con la autofagia (Sampath y Kannan, 2009; Guzmán-Beltrán et al., 2016; Liu et al., 2018). En cuanto a los procesos relacionados con la mitocondria, el pre-tratamiento con  $\alpha$ M restablece la función mitocondrial en un modelo de necrosis inducido por isoproterenol en células de miocardio (Sampath y Kannan, 2009). En este modelo la  $\alpha$ M evitó la disminución de la actividad de las enzimas de la cadena de transporte de electrones (de la nicotinamida adenín dinucleótido [NADH] deshidrogenasa y de la citocromo c oxidasa), de la actividad de enzimas del ciclo de Krebs y del nivel de



adenosín trifosfato (ATP). Además, restableció las actividades de enzimas antioxidantes mitocondriales (superóxido dismutasa y catalasa) y disminuyó la lipoperoxidación mitocondrial, preservando la morfología mitocondrial (Sampath y Kannan, 2009). En un modelo de esteatosis en cultivo primario de hepatocitos, la  $\alpha$ M evitó la disminución del potencial de membrana mitocondrial y de la tasa de consumo de oxígeno, evitó el incremento de la producción de ROS totales y mitocondriales, así como la liberación mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$ , citocromo c y la activación de las caspasas 9 y 13 (Tsai et al., 2016).

Por otro lado, la  $\alpha$ M mejora la captación de glucosa e inhibe la acumulación de lípidos en el citoplasma y la diferenciación de adipocitos a través de la disminución de la expresión del ARN mensajero (ARNm) de PPAR $\gamma$  (receptor gama activado por el proliferador de peroxisomas) en células 3T3-L1 (Taher et al., 2015). Además, incrementa la liberación de ácidos grasos libres asociado a un incremento de la expresión de leptina (Taher et al., 2015). Estos resultados se corroboraron en un estudio en ratones alimentados con una dieta alta en grasa, en el cual la  $\alpha$ M evitó la obesidad debido a una disminución de la acumulación de grasas y al evitar la dislipidemia. Esto se asoció a la fosforilación de AMPK (cinasa activada por AMP), al incremento de la expresión de sirtuina 1 (SIRT1) y a una disminución de la expresión de PPAR $\gamma$ , evitando la acumulación de lípidos hepáticos y la obesidad (Choi et al., 2015). Estos antecedentes son de relevancia ya que PGC1 $\alpha$  (coactivador del receptor gama activado por el proliferador de peroxisomas 1 alfa), el regulador maestro de la biogénesis mitocondrial, puede sufrir modificaciones postraduccionales mediadas por AMPK y SIRT1 (Fontecha-Barriuso et al., 2020), las cuales como se mencionó están relacionadas con el mecanismo de protección de la  $\alpha$ M.

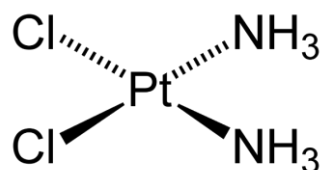
En cuanto al efecto de la  $\alpha$ M en la modulación del estrés del RE, se ha demostrado que la  $\alpha$ M ejerce un efecto protector en un modelo de nefropatía diabética al reducir el estrés oxidante, el estrés del RE y la apoptosis. Debido a una reducción de marcadores de estrés del RE, como GRP78 (proteína regulada por glucosa de 78 kDa), ATF4 (factor de transcripción activador 4), CHOP (proteína

homóloga de la proteína de unión al potenciador [C/EBP]) y la caspasa 12 (Liu et al., 2018).

Por último, la modulación de la autofagia como un mecanismo de supervivencia celular mediada por la  $\alpha$ M se demostró en macrófagos infectados con *Mycobacterium tuberculosis*. En este modelo la  $\alpha$ M fue capaz de inducir autofagia lo cual inhibió el crecimiento de *M. tuberculosis*, dicha inducción fue determinada por el incremento de los marcadores de autofagia beclina1, LC3-II (forma lipídada de la cadena 3 de la proteína 1A/1B asociada a los microtúbulos [LC3-I]) y el incremento de vesículas autofágicas (Guzmán-Beltrán et al., 2016). De manera similar, la modulación de la autofagia por la  $\alpha$ M se demostró en un estudio de daño hepático inducido por acetaminofén, en el cual la  $\alpha$ M restableció los niveles de la forma fosforilada de mTOR (proteína diana sensible a rapamicina en mamíferos), de p62 (proteína de unión a ubiquitina p62) y de LC3-II, sugiriendo que la acción de la  $\alpha$ M es previa a la inducción de autofagia (Yan et al., 2018). En células epiteliales intestinales obtenidas de ratones transgénicos con proteína verde fluorescente (GFP)-LC3 administrados con  $\alpha$ M, se observó un incremento de la señal de puntos fluorescentes verdes indicando que la  $\alpha$ M es capaz de inducir la activación de la autofagia (Kim et al., 2012).

#### 1.4 Cisplatino (CDDP)

El CDDP (Fig. 2) es un compuesto sólido de color amarillo, con fórmula  $\text{PtCl}_2\text{H}_6\text{N}_2$  y peso molecular de 300.1 g/mol, soluble en agua o solución salina. El CDDP es un complejo de coordinación cuadrado plano de platino (II), coordinado con dos átomos de cloro y dos moléculas de amonio (Zhou et al., 2020) (Fig. 2). Debido a su estructura, los átomos de cloro pueden estar sujetos a reacciones de desplazamiento químico con moléculas de agua o grupos sulfhidrilo (Zhang et al., 2006).



**Figura 2.** Estructura del *cis*-diclorodiaminoplatino II o cisplatino (CDDP).

En la captación celular del CDDP participan múltiples transportadores, permitiendo la acumulación del CDDP dentro de las células cancerosas y normales. Se ha demostrado que el CDDP puede acumularse en mayor concentración en el hígado, la próstata y el riñón (Sancho-Martínez et al., 2012). La captación del CDDP en las células del túbulo proximal del riñón se da principalmente a través de los transportadores de membrana de la superfamilia de acarreadores de solutos, como son los transportadores catiónicos orgánicos (OCT) 1 y 2 localizados en las membranas basolaterales de las células del túbulo proximal, así como los transportados de cobre 1 y 2 (Manohar y Leung, 2018). El CDDP se excreta principalmente por la orina, aunque el aclaramiento renal depende de la dosis y de las características renales de cada individuo (Duffy et al., 2018).

El mecanismo de acción del CDDP se presenta mediante la coordinación del platino en la posición N<sup>7</sup> de las bases de las purinas (adenina y guanina), formando aductos con el ácido desoxiribonucleico (ADN), influyendo a la estructura del ADN e induciendo muerte celular; sin embargo se ha demostrado que menos del 1% del CDDP administrado se une al ADN (Zhou et al., 2020). La mayoría del CDDP reacciona con proteínas o biomoléculas, principalmente las que poseen residuos sulfhidrilo (Zhang et al., 2006; Zhou et al., 2020).

En la clínica, el CDDP se usa como un potente agente antineoplásico en varios tipos de tumores metastásicos como: el testicular, de ovario, de vejiga, de mama, pancreático avanzado, etc. (Manohar y Leung, 2018). Sin embargo, la toxicidad limitante de su dosis es la nefrotoxicidad, por lo cual su uso está restringido en pacientes con falla renal pre-existente (Manohar y Leung, 2018). Se ha observado nefrotoxicidad en un 28% al 36% de pacientes tratados con una dosis única de 50 mg/m<sup>2</sup> de CDDP, manifestando elevación de los niveles de nitrógeno ureico en sangre, creatinina, ácido úrico y/o una disminución del aclaramiento de creatinina (Duffy et al., 2018; Manohar y Leung, 2018). Aunque la nefrotoxicidad inducida por el CDDP puede ser reversible, la dosis continua del agente puede inducir daño renal severo que puede irreversiblemente conllevar a la pérdida de la función renal (Ishimoto y Inagi, 2016).

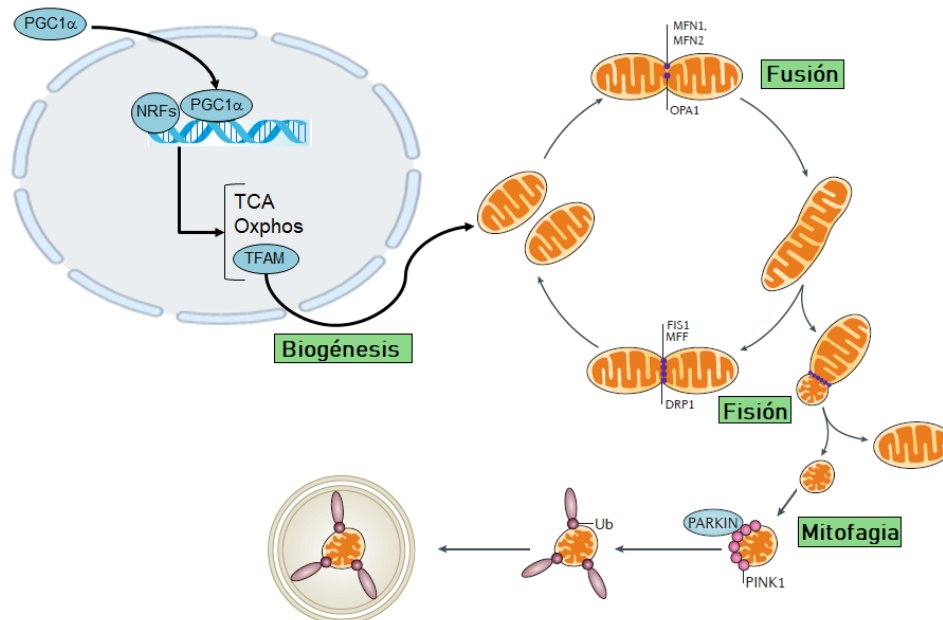
El segmento principalmente dañado por el CDDP en el riñón es el túbulo proximal (Kröning et al., 1999; Sancho-Martínez et al., 2012). El túbulo proximal forma parte de la nefrona, la unidad funcional del riñón, y su función contempla el 65% de la reabsorción de agua, glucosa, sodio, potasio, iones como cloruro, ácidos orgánicos pequeños y urea, por lo cual necesita grandes cantidades de energía. Por lo que, comparada con los otros segmentos de la nefrona, posee una gran cantidad de mitocondrias necesarias para llevar a cabo sus funciones de reabsorción (Yang et al., 2014; Bhargava y Schnellmann, 2017; Manohar y Leung, 2018).

Se han descrito diversos mecanismos relacionados con su acción antitumoral y nefrotóxica como lo son: (1) el daño al ADN, lo cual puede inducir la activación de p53, (2) la activación de vías apoptóticas, intrínseca dependientes de caspasas y extrínseca mediada por la producción del factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ) y receptores de muerte celular, (3) la inducción de estrés oxidante, por un incremento de ROS/especies reactivas de nitrógeno (RNS) y la disminución de la actividad o expresión de enzimas antioxidantes, (4) la inducción de inflamación mediada por  $TNF\alpha$  y otras citocinas, así como (5) la disfunción de organelos como el retículo endoplásmico y la mitocondria (Manohar y Leung, 2018; Sancho-Martínez et al., 2012). La inducción de estos mecanismos hacen al CDDP un potente agente antineoplásico, sin embargo también ejercen efectos negativos en las células normales. Por lo cual hasta el momento no existe un tratamiento efectivo para contrarrestar la nefrotoxicidad inducida por el CDDP (Duffy et al., 2018).

### 1.5 Función mitocondrial

La mitocondria es un organelo de doble membrana, que regula importantes procesos celulares que van desde el mantenimiento de la producción energética, producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa, hasta procesos relacionados con la muerte celular (Bhargava y Schnellmann, 2017). En el mantenimiento de la calidad y la función mitocondrial participan algunos procesos celulares, los cuales incluyen la biogénesis, la fusión-fisión y la mitofagia haciendo a la mitocondria un organelo dinámico (Fig. 3) (Diaz y Moraes, 2008). Por ejemplo, el daño en las mitocondrias induce estrés oxidante y la liberación de citocromo c,

así como la generación de nuevas mitocondrias para mantener la homeostasis energética (Diaz y Moraes, 2008).



**Figura 3. Procesos relacionados con el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial.** La mayoría del ATP se produce en la mitocondria a través del consumo de oxígeno, en la respiración aerobia, por el flujo de electrones a través de la cadena de transporte de electrones en un proceso llamado fosforilación oxidativa (OXPHOS). La homeostasis mitocondrial requiere de un fino balance entre la bioenergética y la dinámica mitocondrial, asegurándose de la adecuada función de la mitocondria. La biogénesis mitocondrial es un proceso para la generación de nuevas y funcionales mitocondrias, con la finalidad de incrementar los niveles de ATP dependiendo de las demandas del mismo. El principal co-activador a nivel transcripcional de TFAM, la OXPHOS, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y de la biogénesis, es el factor PGC1 $\alpha$ . Por otro lado, la correcta morfología mitocondrial, es indispensable para mantener la capacidad máxima de producción de ATP, la cual depende de los procesos de fisión y fusión. La fisión permite la división de las mitocondrias en dos, para aislar a las mitocondrias despolarizadas que afectan la red mitocondrial. Mientras que en la fusión se lleva a cabo la unión de dos mitocondrias, con la finalidad de mantener los niveles de ATP o redistribuir las proteínas mitocondriales. La mitofagia es la remoción selectiva de las mitocondrias dañadas o no funcionales mediante el proceso de autofagia. Los estímulos externos pueden modificar los procesos mitocondriales como lo son la mitofagia, la fisión-fusión y la biogénesis para evitar las irregularidades en los niveles de ATP. PGC1 $\alpha$ : coactivador del receptor gama activado por el proliferador de peroxisomas 1 alfa, NRF: factor nuclear respiratorio, TFAM: factor de transcripción mitocondrial A, MFN1,2: mitofusina 1 y 2, OPA1: proteína de atrofia óptica 1, DRP1: proteína 1 relacionada con la dinamina, PINK: cinasa inducida por el homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) 1, Ub: ubiquitina. Modificado de Bhargava y Schnellmann, 2017.

La mitocondria es especialmente sensible al daño por CDDP, ya que forma aductos con el ADN mitocondrial, además es más sensible al daño por ROS que el ADN nuclear y carece de una maquinaria eficiente de reparación del ADN (Manohar y Leung, 2017). Especialmente en la nefrotoxicidad inducida por CDDP la mitocondria tiene gran relevancia en el mecanismo de daño, debido a que el riñón es uno de los órganos con mayor demanda energética, por lo cual presentan un mayor contenido de mitocondrias y expresa de manera importante al transportador de cationes orgánicos 2 (OCT2) (Ortega-Domínguez et al., 2017; Pan et al., 2015; Yang et al., 2014; Zhang et al., 2006).

En la mitocondria, el CDDP reduce la actividad de los complejos mitocondriales y la producción de ATP (Ortega-Domínguez et al., 2017; Pan et al., 2015; Yang et al., 2014). Además, el CDDP disminuye el número de copias del ADN mitocondrial, el potencial de membrana mitocondrial y la actividad de la OXPHOS, determinada por la tasa de consumo basal de oxígeno (OCR) (Yu et al., 2018). Estas alteraciones conllevan a la modulación de otros procesos mitocondriales como la dinámica, la biogénesis y la mitofagia (Bhargava y Schnellmann, 2017).

La dinámica mitocondrial se define como el balance entre la fusión y la fisión (fragmentación) de las mitocondrias. Las proteínas involucradas en la fusión son las mitofusinas 1 (MFN1) y MFN2, relacionadas con la fusión de la membrana externa mitocondrial, y la proteína de atrofia óptica 1 (OPA1), que participa en la fusión de la membrana interna mitocondrial (Bhargava y Schnellmann, 2017; Yang et al., 2014). Con respecto a la fisión mitocondrial, se encuentra la proteína 1 relacionada con la dinamina (DRP1) y la proteína de fisión 1 (FIS1) (Bhargava y Schnellmann, 2017; Yang et al., 2014). Se ha descrito que la exposición a CDDP incrementa las proteínas relacionadas a la fisión, mientras que reduce los niveles de las proteínas de fusión, resultando en la fragmentación de las mitocondrias y en la pérdida de sus crestas (Yang et al., 2014).

Por otro lado, la biogénesis mitocondrial actúa como un elemento regulatorio de la mitocondria y es necesaria para el control de calidad de la misma, tiene como finalidad incrementar la masa mitocondrial para mantener la demanda energética

(Sanchis-Gomar et al., 2014). Para ello, se requiere una coordinación precisa entre el genoma mitocondrial y nuclear (Bhargava y Schnellmann, 2017). Dentro de la maquinaria encargada de modular la biogénesis mitocondrial, se encuentra PGC1 $\alpha$ , considerado como el regulador maestro de dicho proceso. Este coactivador regula la biogénesis de manera directa e indirecta, ya que regula la expresión de proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo, incluyendo a los factores nucleares respiratorios (NRF) 1 y NRF2 (Ishimoto y Inagi, 2016). A su vez, el factor NRF1 interacciona con PGC1 $\alpha$ , para promover la transcripción del factor TFAM, un regulador de la replicación del ADN mitocondrial (Bhargava y Schnellmann, 2017). Se ha observado que la sobre-expresión de PGC1 $\alpha$  incrementa el número de mitocondrias, la capacidad respiratoria y la producción de ATP. Asimismo, se ha reportado que la exposición a CDDP reduce los niveles de PGC1 $\alpha$  (Fontecha-Barriuso et al., 2020), NRF1, NRF2 y TFAM (Guo et al., 2018) así como el número de copias mitocondriales, sugiriendo la inhibición de la biogénesis mitocondrial.

El contenido mitocondrial no solo depende de la biogénesis, si no también de la mitofagia. La mitofagia es un tipo de autofagia selectiva que se encarga de degradar a las mitocondrias dañadas o disfuncionales, contribuyendo al control mitocondrial y a la supervivencia celular. En condiciones de estrés, la disminución del potencial de membrana mitocondrial permite la acumulación de PINK en la membrana externa mitocondrial y con ello el reclutamiento de Parkin, que es reconocida por la maquinaria de la autofagia (Bhargava y Schnellmann, 2017). Se ha sugerido que la exposición a CDDP induce la activación de la mitofagia, como mecanismo para contrarrestar el daño renal (Wang et al., 2018), también se ha sugerido que la mitofagia sólo ocurre cuando hay un incremento de la fisión mitocondrial (Zhao et al., 2017).

## 1.6 Estrés del RE

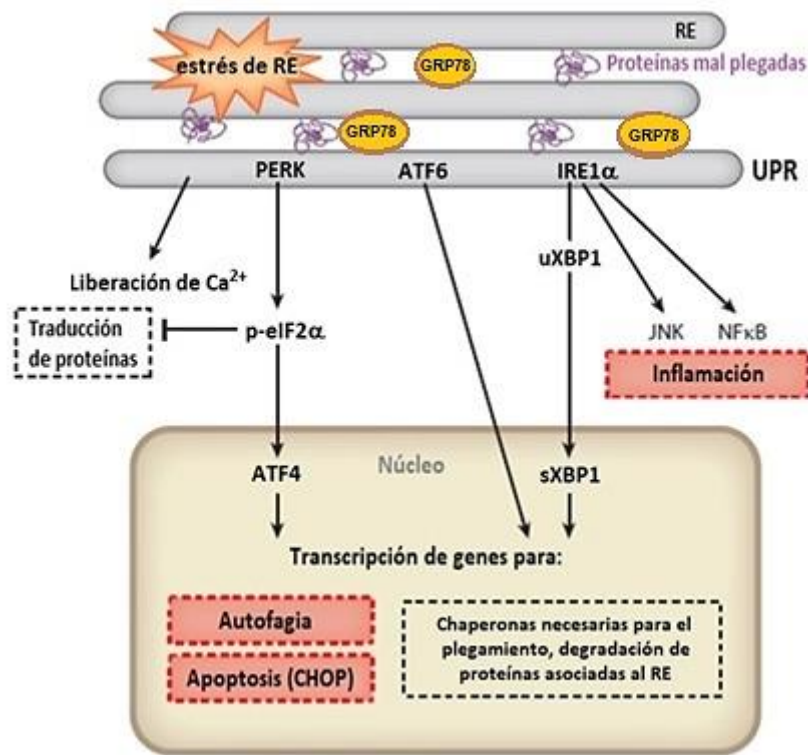
Debido a la interacción de la mitocondria con el RE, se ha sugerido que la disfunción de uno puede comprometer la función del otro y viceversa (Marchi et al., 2014).

El RE es el organelo membranoso de mayor tamaño el cual realiza múltiples funciones, incluyendo el plegamiento y tráfico de proteínas, la homeostasis de calcio, la síntesis de lípidos y diferentes funciones celulares (Malhi y Kaufman, 2011). La perturbación de la homeostasis del RE produce lo denominado “estrés del RE”, lo cual induce la activación de una vía de señalización adaptativa conocida como la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). La UPR tiene como propósito atenuar la traducción de proteínas, inducir la expresión de genes relacionados con las funciones del RE para incrementar la capacidad de plegamiento, mantener la homeostasis de proteínas (proteostasis), inducir el sistema de la degradación asociada al RE (ERAD) y la autofagia (Yan et al., 2018).

La vía de la UPR es un mecanismo de señalización a través de tres sensores: PERK (cinasa del RE parecida a la proteína cinasa activada por ARN), IRE1 $\alpha$  (proteína 1 alfa que requiere inositol) y ATF6 $\alpha$  (factor de transcripción activador 6 alfa) (Fig. 4) (Malhi y Kaufman, 2011). En condiciones de no estrés, los tres sensores están inactivos por la interacción con la chaperona GRP78. Sin embargo, cuando el RE sensa la acumulación de proteínas mal plegadas o la desregulación en sus otras funciones, la GRP78 se une a las proteínas mal plegadas y permite la activación de los tres sensores (Malhi y Kaufman, 2011).

El IRE1 $\alpha$  es una proteína transmembranal del RE, que una vez liberada de GRP78 se dimeriza y se autofosforila, activando sus funciones de endoribonucleasa y cinasa de serina/treonina presentes en su porción citosólica (Malhi y Kaufman, 2011). Su actividad de endoribonucleasa cataliza el procesamiento del transcrito de la proteína de unión a la caja X (XBP1), generando la forma XBP1s (con *splicing*), la cual es un potente factor de transcripción que regula la transcripción de genes relacionados con el plegamiento de proteínas del RE, el tráfico intracelular, la biogénesis del RE y el sistema ERAD.





**Figura 4. El estrés del RE induce la activación de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR).** La acumulación de proteínas mal plegadas induce el desacoplamiento de GRP78 de los tres sensores de la UPR (IRE1 $\alpha$ , PERK y ATF6 $\alpha$ ), induciendo varias vías de señalización con la finalidad de restablecer la homeostasis del RE y la supervivencia celular. La vía de IRE1 $\alpha$  lleva a cabo el procesamiento de XBP1 (XBP1s), el cual participa en la transcripción de proteínas relacionadas con la homeostasis del RE, el sistema ERAD y la autofagia. La activación de IRE1 $\alpha$  también induce la fosforilación de algunas proteínas como, JNK o la activación de la caspasa 12. La vía de PERK induce la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , lo cual reduce la síntesis global de proteínas, así como favorece la transcripción de ATF4, quien a su vez promueve la transcripción de proteínas relacionadas con la homeostasis del RE y la autofagia induciendo la supervivencia celular. Al igual que la vía de IRE1 $\alpha$ , la vía de PERK puede inducir apoptosis a través de CHOP. Por último, después del desacoplamiento de GRP78 de ATF6 $\alpha$ , éste se activa por escisión induciendo la transcripción de XBP1, de proteínas relacionadas con la homeostasis del RE y de componentes de ERAD. GRP78: proteína regulada por glucosa de 78 kDa, PERK: cinasa del RE parecida a la proteína cinasa activada por ARN, ATF6: factor de transcripción activador 6 alfa, IRE1 $\alpha$ : proteína 1 alfa que requiere inositol, XBP1u: Proteína de unión 1 a la caja X sin *splicing*, XBP1s: proteína de unión 1 a la caja X con *splicing*, p-eIF2 $\alpha$ : factor 2 de iniciación de la traducción eucariota, subunidad alfa fosforilado, ATF4: factor de transcripción activador 4, CHOP: proteína homóloga de la proteína de unión al potenciador (C/EBP). Modificado de Zuk y Bonventre, 2016.

Además, IRE1 $\alpha$  a través de su actividad de endoribonucleasa lleva a cabo la degradación de ARN mensajeros regulada por el decaimiento dependiente de IRE1 (RIDD), lo que disminuye la carga de proteínas a traducir. Por otro lado, su actividad de cinasa favorece la activación de JNK a través del factor 2 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral-2 (TRAF2)/ cinasa reguladora de la señal de apoptosis 1 (ASK1). La interacción de IRE1-TRAF2 puede directamente inducir la activación de la caspasa 12, la cual induce apoptosis. Por otro lado, la IRE1 $\alpha$  y el factor XBP1s están relacionados con la activación de la autofagia (Malhi y Kaufman, 2011).

El segundo sensor, PERK una vez liberado de GRP78 se oligomeriza, trans-autofosforila y activa. El PERK lleva a cabo la fosforilación de un factor de inicio de la transcripción, eIF2 $\alpha$  (factor 2 de iniciación de la traducción eucariota, subunidad alfa) en la serina<sup>51</sup> (Malhi y Kaufman, 2011). Esto provoca la supresión general de la transcripción, atenuando la síntesis general de proteínas. Aunque existen otras proteínas relacionadas con la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , las cuales forman parte de la “respuesta de estrés integrada” su activación depende de condiciones ambientales y fisiológicas específicas. La fosforilación de eIF2 $\alpha$  induce la traducción de ARNm que presentan dos fragmentos de inicio de la transcripción, como el de ATF4, induciendo la transcripción de chaperonas, la expansión del RE y la autofagia para restablecer la homeostasis del RE (Malhi y Kaufman, 2011). Sin embargo, ATF4 también puede inducir la transcripción del factor pro-apoptótico CHOP, el cual induce la transcripción de proteínas proapoptóticas como el mediador de la muerte celular que interactúa con Bcl-2 (Bim), el modulador de apoptosis sobrerregulado por p53 (PUMA), la glicoproteína CD5 de superficie de células T (CD5), mientras que la expresión de CHOP reduce la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2. Por otro lado, se ha sugerido que PERK puede fosforilar directamente al factor de transcripción relacionado con la inducción de enzimas antioxidantes, el factor Nrf2, contribuyendo a la homeostasis redox y la supervivencia (Almanza et al., 2019; Malhi y Kaufman, 2011).

El factor de transcripción ATF6 $\alpha$ , una vez liberado de GRP78 es transportado al aparato de Golgi por la proteína de la cubierta II (COPII) para posteriormente ser escindido por las proteasas del Sitio-1 y Sitio-2 (Schindler y Schekman, 2009). El ATF6 $\alpha$  escindido induce la transcripción de genes relacionados con el plegamiento, maduración y secreción de proteínas como XBP1, chaperonas como GRP78 y GRP94 (proteína regulada por glucosa de 94 kDa), la ATPasa de calcio del retículo saco-endoplásmico que regula la captación de calcio dentro del RE, además, puede inducir la expresión de componentes de ERAD y CHOP (Malhi y Kaufman, 2011; Schindler y Schekman, 2009).

Aunque la UPR permite la protección celular ante estímulos nocivos, un estímulo persistente o de estrés severo conduce a la activación de apoptosis mediada por el estrés del RE, y a otros procesos celulares como la inflamación (Kaufman y Malhotra, 2014; Yan et al., 2020).

Las perturbaciones en las células del riñón resultan en la acumulación de proteínas mal plegadas o no plegadas en el RE, induciendo estrés del RE y la activación de la UPR (Yan et al., 2018). La importancia del RE en la nefrotoxicidad inducida por CDDP se ha incrementado debido a la inducción de la apoptosis relacionada a la activación de la UPR (Inagi et al., 2014). En la toxicidad inducida por CDDP se ha descrito un incremento en los marcadores de la UPR (GRP78, p-eIF2 $\alpha$ , ATF4), activando la apoptosis dependiente del estrés del RE (CHOP y caspasa-12) (Mandic et al., 2003; Peyrou y Cribb, 2007; Rovetta et al., 2012).

### 1.7 Autofagia

La autofagia es un sistema conservado de degradación y reciclamiento de componentes celulares en el citoplasma, que lleva a cabo la degradación de macromoléculas como las proteínas no plegadas y/o agregadas (Galluzzi et al., 2017; Kaushal y Shah, 2016). Es esencial para la regulación de nutrientes y el control de calidad y la homeostasis intracelular. En principio la autofagia es un mecanismo de autodefensa ante estímulos adversos, sin embargo si procede de manera continua o excesiva los procesos celulares de muerte celular pueden participar para eliminar las células dañadas. Existen varios tipos de autofagia dependiendo de las macromoléculas o organelos cargo a degradar, entre estos tipos

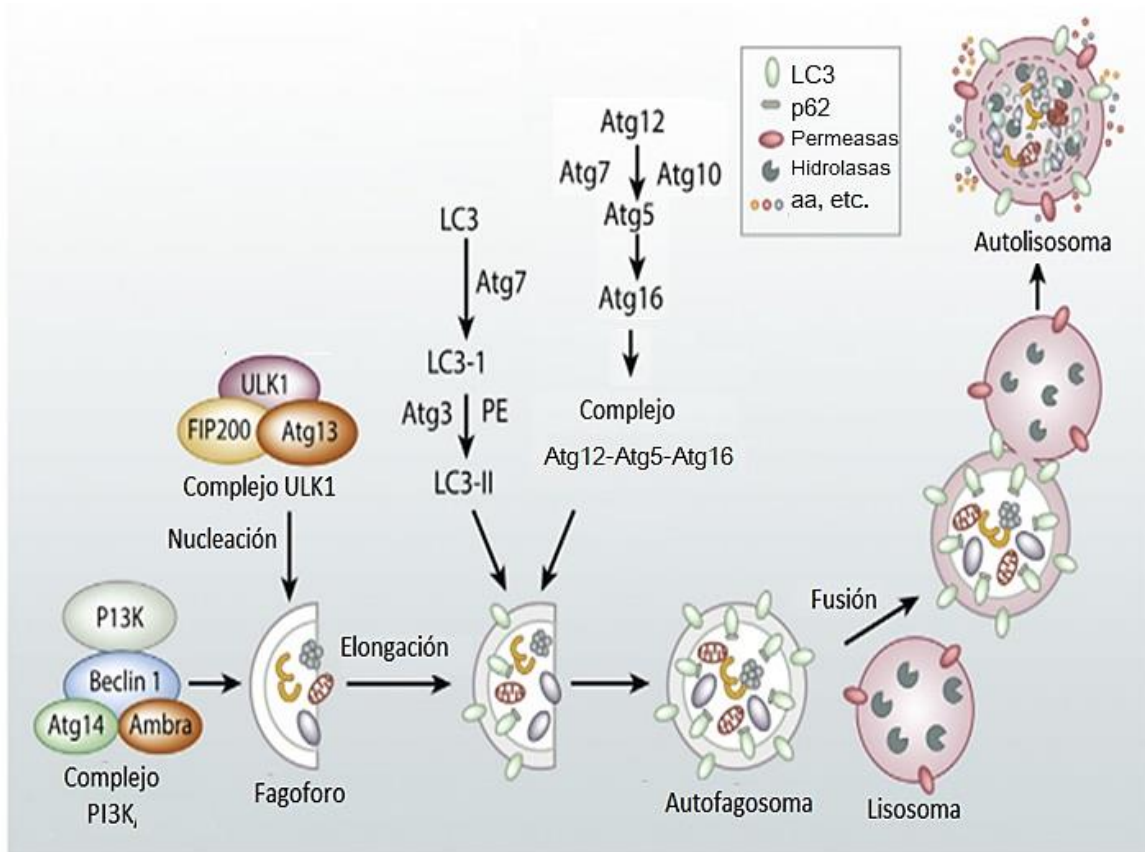
están la macroautofagia, microautofagia y la autofagia dependiente de chaperonas (Galluzzi et al., 2017; Kaushal y Shah, 2016).

El proceso de la autofagia involucra una serie de pasos que conlleva el raptó de los componentes dañados dentro de una vesícula de doble membrana (autofagosoma) y su posterior degradación, cuando el autofagosoma se fusiona con el lisosoma (autolisosoma) (Galluzzi et al., 2017; Kaushal y Shah, 2016). La formación del autofagosoma involucra una gran cantidad de complejos de proteínas incluyendo a las Atg's (familia de proteínas relacionados a la autofagia) y otras proteínas. Las proteínas que participan en el inicio de la formación del autofagosoma son (a) el complejo ULK1/ULK2 (Unc-51 como la cinasa activadora de autofagia 1 y 2) y (b) el complejo beclina-1/PI3K; las proteínas que participan en la expansión de la membrana del autofagosoma son (c) la proteína de transmembrana Atg9 y VMP1 (proteína de membrana de vacuola 1); la elongación del autofagosoma se da a través (d) del sistema de conjugación de proteínas parecidas a ubiquitina formando el complejo Atg12-Atg5-Atg16 y (e) de la lipidación de LC3-I con fosfatidiletalona (PE) (LC3-II). Una vez formado el autofagosoma, éste se fusiona con el lisosoma generando el autolisosoma, en el cual se degrada el contenido de macromoléculas u organelos (carga) así como LC3-II (Kaushal y Shah, 2016). Además, se cuenta con receptores de carga específicos para macromoléculas y organelos, siendo p62 el receptor selectivo del cargo más estudiado el cual interacciona con LC3-II y que finalmente también termina siendo degradado en el autolisosoma (Galluzzi et al., 2017).

Aunque el proceso posee una alta dinámica y complejidad, el incremento del nivel de LC3-II, así como la degradación de p62 se han utilizado para evidenciar la autofagia (Fig. 5) (Galluzzi et al., 2017).

Se ha demostrado que el estrés del RE induce autofagia en células de túbulo proximal renal y, como se mencionó previamente, que el daño mitocondrial induce la activación de la mitofagia, ambos procesos como un mecanismo de protección (Fougeray y Pallet, 2015; Ralto y Parikh, 2016). Se ha sugerido que en la toxicidad por CDDP, la inducción de autofagia y mitofagia tiene un papel protector o de supervivencia (Rovetta et al., 2012; Wang et al., 2018). La inhibición de la autofagia

mediante inhibidores químicos o ARN no codificante favorecen el efecto citotóxico del CDDP (Kaushal y Shah, 2016; Zhao et al., 2017).



**Figura 5. Maquinaria de la autofagia.** La autofagia es un proceso complejo inducido por una variedad de estímulos, principalmente como una respuesta de supervivencia celular. En este proceso participan diferentes proteínas en la nucleación, elongación, formación del autofagosoma. Finalmente la fusión del lisosoma con el autofagosoma, da lugar a la formación del autolisosoma y con ello a la degradación del cargo a sus componentes esenciales como lo son aminoácidos (aa), ácidos grasos libres, etc. para su posterior re-utilización. ULK: Unc-51 como la cinasa activadora de autofagia, Atg: factor relacionado a la autofagia, PI3K: fosfatidil inositol 3 cinasa clase III, LC3-I: cadena 3 de la proteína 1A/1B asociada a los microtúbulos, LC3-II: forma lipidada de LC3-I, PE: fosfatidil etanolamina, p62: proteína de unión a ubiquitina p62. Modificado de Kaushal y Shah, 2016.

## 2. JUSTIFICACIÓN

El CDDP es un agente antineoplásico de primera línea contra distintos tipos de cáncer. Sin embargo, su uso se limita debido a sus efectos adversos, observándose que alrededor del 28-36% de los pacientes desarrollan nefrotoxicidad. A la fecha no existe un tratamiento eficaz que disminuya este efecto adverso, por lo cual en la clínica a los pacientes se les recomienda el uso de agua y diuréticos durante el tratamiento. Por ello, la búsqueda de alternativas terapéuticas que ayuden a mitigar la nefrotoxicidad inducida por CDDP resulta de interés primordial. Entre ellas, el uso de antioxidantes como la  $\alpha$ M, la cual ha demostrado poseer múltiples efectos biológicos. Aunque se ha establecido que la  $\alpha$ M protege del daño por CDDP, no se ha estudiado la participación de los mecanismos relacionados a la función mitocondrial, al estrés del RE y a la autofagia. Además, tampoco se ha evaluado si la  $\alpha$ M *per se* tiene un efecto en los procesos descritos en células de túbulo proximal de cerdo LLC-PK1.

## 3. HIPÓTESIS

La protección conferida por la  $\alpha$ M en la nefrotoxicidad inducida por CDDP se relaciona con el mantenimiento de la función mitocondrial, la modulación de la autofagia y la prevención del estrés del RE.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Evaluar en células LLC-PK1 si el mecanismo por medio del cual la  $\alpha$ M protege del daño por CDDP está relacionado con el mantenimiento de la función mitocondrial, la modulación de la autofagia y la prevención del estrés del RE.

### 4.2 Objetivos específicos

En el modelo de nefrotoxicidad inducido por CDDP establecer los mecanismos de citoprotección mediados por la  $\alpha$ M al:

1. Determinar los cambios en la bioenergética mitocondrial.
2. Evaluar las alteraciones inducidas sobre la masa, fusión y el recambio (biogénesis y mitofagia) mitocondrial.
3. Analizar la participación de la autofagia.
4. Estudiar la participación del estrés del RE.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Reactivos

La  $\alpha$ M utilizada en este proyecto, se obtuvo del pericarpio del árbol del mangostán (*Garcinia mangostana*, DNP International Inc., Whittier, CA, EUA) como previamente está descrito (Nava Catorce et al., 2016), con un 98% de pureza determinado por cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplado a espectrometría de masas (UPLC-MS). La línea celular LLC-PK1 (ATCC CL-101) se adquirió de American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EUA). El CDDP, el azul de tripano, el diacetato de fluoresceína (FDA), el *tris* (hidroximetil) aminometano, el desoxicolato de sodio, el 4-nonilfenol polietilenglicol (NP-40), el fluoruro de sodio (NaF), la D-(+)-glucosa, el pirofosfato de sodio ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ), el fluoruro de fenimetilsulfonilo (PMSF), el ortovanadato de sodio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), el Tritón X-100, el ditioneitol (DTT), el glicerolfosfato, el ácido 4-(2-hidroetil)piperazina-1-etanosulfónico (HEPES), el Tween-20, el glicerol, el ácido etilendiaminotetracético (EDTA), el dimetil sulfóxido (DMSO), la antimicina A, el ácido etilenglicol-*bis* (2-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), el 2,4-dinitrofenol (DNP), el cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ) tetrahidratado, la oligomicina, la rotenona, el L-ascorbato de sodio, la azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ), el tetrametil-*p*-fenilendiamina (TMPD), el fosfato de sodio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), el fosfato de sodio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), el dodecilsulfato de sodio (SDS), el Ponceau S (rojo de Ponceau), la sal difosfato de cloroquina (CQ), la wortmanina (95455), la tapsigargina (Tg, T9033), la acrilamida y los anticuerpos primarios contra LC3 (L7543), p62 (0067), GRP94 (G4420) y la alfa tubulina ( $\alpha$ -Tub, T9026) se compraron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). El medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), el suero fetal bovino (SFB) y el antibiótico penicilina/estreptomina se compraron de Biowest (Riverside, MO, EUA). El cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), el bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ), el cloruro de sodio (NaCl) y el ácido clorhídrico (HCl) se compraron de Mallinckrodt plc (St. Louis, MO, EUA). El coctel inhibidor de proteasas se compró de Roche Applied Science (Mannheim, Alemania). La sonda MitoTracker<sup>TM</sup> Green se compró de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA). Los anticuerpos primarios contra PGC1 $\alpha$ , (ab54481), Parkin (ab15954) y el coctel de anticuerpos de subunidades de la fosforilación oxidativa (OXPHOS, ab110413) se compraron en Abcam (Cambridge,

MA, EUA). Los anticuerpos primarios contra NRF1 (sc-33771), VDAC (sc-8828), PINK1 (sc-33796), TFAM (sc-19050), GRP78 (sc-376768) y ATF4 (sc-200) se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, EUA). El anticuerpo contra MFN2 (D2D10) se compró en Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EUA). Los anticuerpos secundarios conjugados a fluorescencia (IRDye®) se obtuvieron de LI-COR Biosciences (Lincoln, NE, EUA). Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

## 5.2 Modelo experimental

Las células se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de SFB y penicilina/estreptomina (100/50 U/mL) en una incubadora humidificada, con CO<sub>2</sub> al 5% y 37°C. Los subcultivos celulares utilizados comprendieron entre el número 9 al 30, una vez abierto el criovial de embalaje. Las células se mantuvieron en cajas de cultivo de 100 mm hasta alcanzar 90% de confluencia. Posteriormente, las células se cultivaron a una confluencia de 50,000 células/cm<sup>2</sup> en medio DMEM suplementado con 10% de SFB, y 24 h después se procedió a la realización de los experimentos. Las células LLC-PK1 se trataron con  $\alpha$ M (1-5  $\mu$ M) y CDDP (5-40  $\mu$ M) por 24 h, en un modelo de co-incubación en DMEM con SFB al 1%. Los stocks utilizados fueron: (a)  $\alpha$ M 10 mM disuelta en DMSO y posterior dilución con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 1:100 y (b) CDDP 0.5 mg/mL (1.670 mM) en solución salina (SS) al 0.9% protegido de la luz. Un tratamiento adicional consistió en el pre-tratamiento con CQ (30  $\mu$ M por 2 h) y wortmanina (10 nM, 1 h previo al tratamiento con  $\alpha$ M y CDDP y posterior co-incubación) como inhibidores de autofagia, así como Tg (1  $\mu$ M por 6 h) y DTT (2 mM, 2 h previo al tratamiento con  $\alpha$ M y CDDP y posterior co-incubación) como inductores de estrés del RE. Después del pre-tratamiento se adicionó la  $\alpha$ M y/o el CDDP por 24 h. Se tomaron micrografías de campo claro por triplicado con un objetivo de 20x, usando el lector Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA).

## 5.3 Viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de FDA de acuerdo al método descrito previamente (Moreno-Londoño et al., 2017) en placas de cultivo de 96 pozos. La fluorescencia del FDA es proporcional a la viabilidad celular.



#### 5.4 Western blot

La determinación de los diferentes marcadores de proteína, se realizó mediante la técnica de western blot previamente descrita (Aparicio-Trejo et al., 2018; Ortega-Domínguez et al., 2017). Los experimentos en las células LLC-PK1 se realizaron en cajas de 60 mm, después de los tratamientos las células se lavaron dos veces con PBS frío, posteriormente las células se recolectaron con 400  $\mu$ L de amortiguador de radioinmunoprecipitación (RIPA: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4, EDTA 1 mM, deoxicolato de sodio al 0.5%, NP-40 al 1% y SDS al 0.1%) con inhibidores de proteasas y fosfatasa (NaF 25 mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM, PMSF 1 mM,  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  1 mM, glicerolfosfato 0.5 mM y coctel inhibidor de proteasas 1X) y se dejaron en agitación por 30 min a 4°C. Los lisados celulares se centrifugaron a 15,000 x g, 10 min a 4°C, se recolectó el sobrenadante y se almacenó a -70°C hasta su posterior uso. La concentración de proteína se determinó espectrofotométricamente mediante el método de Lowry (Lowry et al., 1951). Se utilizaron cantidades iguales de proteína (15  $\mu$ g), en geles de poliacrilamida al 10%-15% con SDS según el peso de la proteína a determinar. Las proteínas se transfirieron a membranas de polifloruro de vinilideno (PVDF, de Immobilon) para aplicaciones de fluorescencia en un equipo de transferencia húmeda, posteriormente las membranas se bloquearon con una solución con leche libre de grasa al 5% por 1 h. Las membranas se lavaron dos veces con PBS y posteriormente se incubaron toda la noche a 4°C con los respectivos anticuerpos primarios: PGC-1 $\alpha$  (1:100), NRF1 (1:200), TFAM (1:500), VDAC (1:500), coctel OXPHOS (1:1500), MFN2 (1:1000), PINK1 (1:1000), Parkin (1:1000), LC3 (1:1500), p62 (1:1000), GRP78 (1:1000), GRP94 (1:1000), ATF4 (1:1000) y  $\alpha$ -Tub (1:8000). Una vez terminado el tiempo de incubación las membranas se lavaron con TBS-Tween 1X (amortiguador salino de tris con Tween 20 al 0.1%), tres veces por 10 min a temperatura ambiente. Después, las membranas se incubaron con su respectivo anticuerpo secundario fluorescente (1:10,000) por 1 h a temperatura ambiente protegidos de la luz, una vez transcurrido el tiempo de incubación el exceso de anticuerpo se eliminó mediante cuatro lavados de 5 min con PBS-Tween al 1%. Las bandas de proteínas se detectaron con el escáner de Odyssey (Li-COR Biosciences, Lincoln, NE, EUA) y la intensidad de la

banda se analizó con el software Image Studio™ Life Software Li-COR Odyssey, el cual permite normalizar para corregir las variaciones de carga entre bandas y dar conteos de señal medidos en un solo píxel por unidad de tiempo a través del cálculo del factor Z. En todos los casos excepto para la detección de las subunidades de OXPHOS, la  $\alpha$ -Tub se utilizó como marcador de control de carga, la cual se determinó posterior a la detección de la proteína de interés. Para ello, las membranas se lavaron 3 veces con TBS-Tween al 1% por 5 min antes de incubar con el anticuerpo de  $\alpha$ -Tub. Por otro lado, las subunidades de OXPHOS se corrieron en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes, el control de carga se refirió a la tinción con Ponceau S al 1% por 2 min (Romero-Calvo et al., 2010). El exceso de tinción con Ponceau S se eliminó con PBS hasta que las bandas fueron visibles. Posteriormente, las membranas se colocaron en bolsas transparentes y se escanearon en un escáner convencional a 300 dpi como un documento TIF (HP Scanjet G4050) y la cuantificación se realizó con el mismo software Image Studio. Nuevamente las membranas se lavaron con PBS hasta eliminar la tinción, antes de incubar con el anticuerpo para OXPHOS como se menciona anteriormente.

### 5.5 Control respiratorio celular

Los experimentos de consumo de oxígeno se realizaron en la célula intacta utilizando un equipo de respirometría de alta resolución (Oroboros Oxygraph-2k). Las determinaciones se realizaron en  $2.5 \times 10^6$  células por condición, 24 h posteriores al tratamiento, los parámetros respiratorios corresponden a: **(1)** Respiración de rutina (basal), **(2)** *Leak* o respiración desacoplada, consumo de oxígeno en presencia de oligomicina ( $5 \mu\text{M}$ ), **(3)** Máxima capacidad del sistema de transferencia de electrones (E), mediante la titulación con DNP ( $5 \mu\text{M}$ ), **(4)** Control respiratorio (CR), relación entre la respiración basal/fuga de protones (*basal/leak*), **(5)** Respiración asociada con la fosforilación oxidativa (P,  $P = \text{basal} - \text{leak}$ ). A todos los datos se les restó el valor de la respiración no mitocondrial (rotenona  $1 \mu\text{M}$  más antimicina A  $2.5 \mu\text{M}$ ) y se normalizó por el número de células. En un experimento independiente se determinó **(a)** la respiración asociada al complejo I (CI,  $\text{basal} - \text{respiración con rotenona } 1 \mu\text{M}$ ), **(b)** la actividad del complejo V (CV), respiración con

rotenona 0.5  $\mu\text{M}$  y antimicina A 2.5  $\mu\text{M}$ , la cual se corrigió por el consumo de oxígeno en presencia de  $\text{NaN}_3$  100 mM.

### 5.6 Marcaje mitocondrial con MitoTracker Green

La masa mitocondrial se estimó utilizando un marcador fluorescente mitocondrial. A las 24 h de tratamiento con  $\alpha\text{M}$  y/o CDDP las células se lavaron con DMEM sin SFB y se incubaron con MitoTracker Green 0.5  $\mu\text{M}$  en medio DMEM sin SFB por 20 min a 37°C, las células se lavaron con solución Ringer Krebs para mamíferos tres veces. Posteriormente se tomaron micrografías representativas con un objetivo 20x, las micrografías se presentan con un posterior zoom con el equipo Cytation 5 imaging, GFP filter (Ex/Em, 469 nm/525 nm).

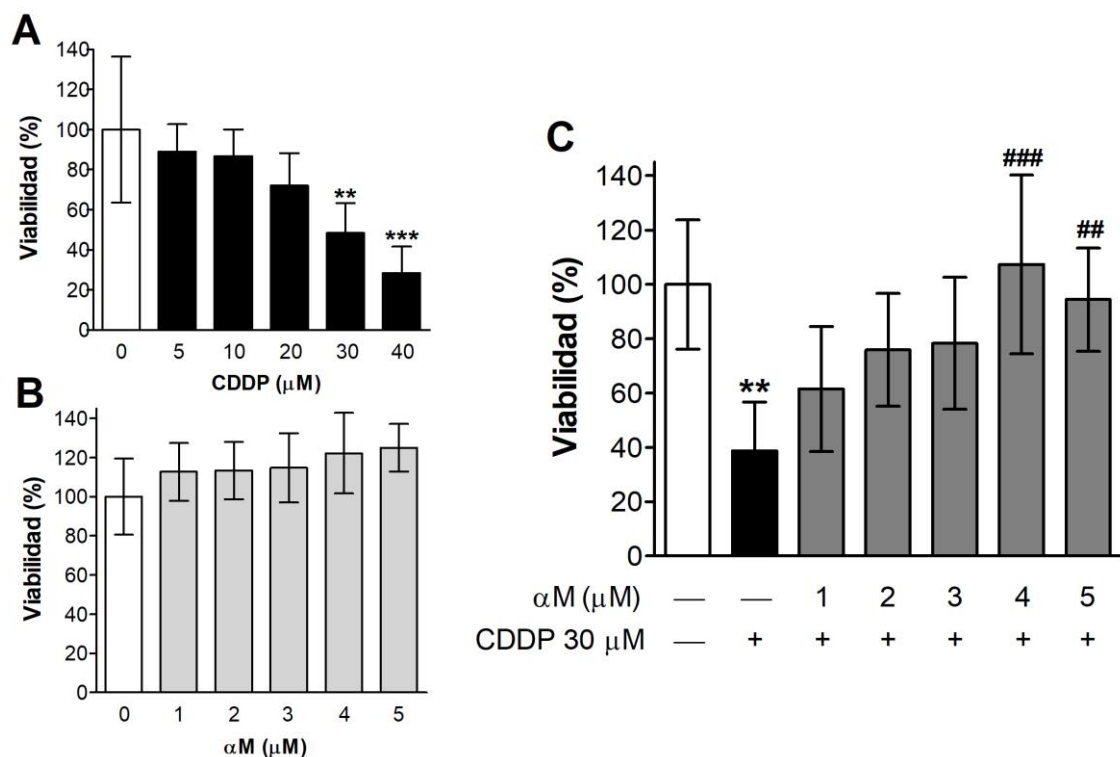
### 5.7 Análisis estadístico

Los datos se representaron como el promedio  $\pm$  desviación estándar (DE). Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguida de una prueba Dunnett o Tukey según los tratamientos a comparar. La comparación en los curso temporales con la cantidad de proteína se analizó utilizando una ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Bonferroni. Se utilizó el software Graph-Pad Prism 5 (San Diego, CA, EUA). Un valor de  $p < 0.05$  se consideró como representativo de los cambios con respecto a cada tratamiento.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 La $\alpha\text{M}$ evita la muerte celular inducida por CDDP

El CDDP redujo el 50% de la viabilidad celular a una concentración de 30  $\mu\text{M}$  a las 24 h de incubación (Fig. 6A). La  $\alpha\text{M}$  no afectó la viabilidad celular en la concentraciones evaluadas (Fig. 6B). Además, la menor concentración de  $\alpha\text{M}$  que confirió protección frente a 30  $\mu\text{M}$  de CDDP, fue la concentración de 4  $\mu\text{M}$  (Fig. 6C). Ambas concentraciones se eligieron para los experimentos posteriores.

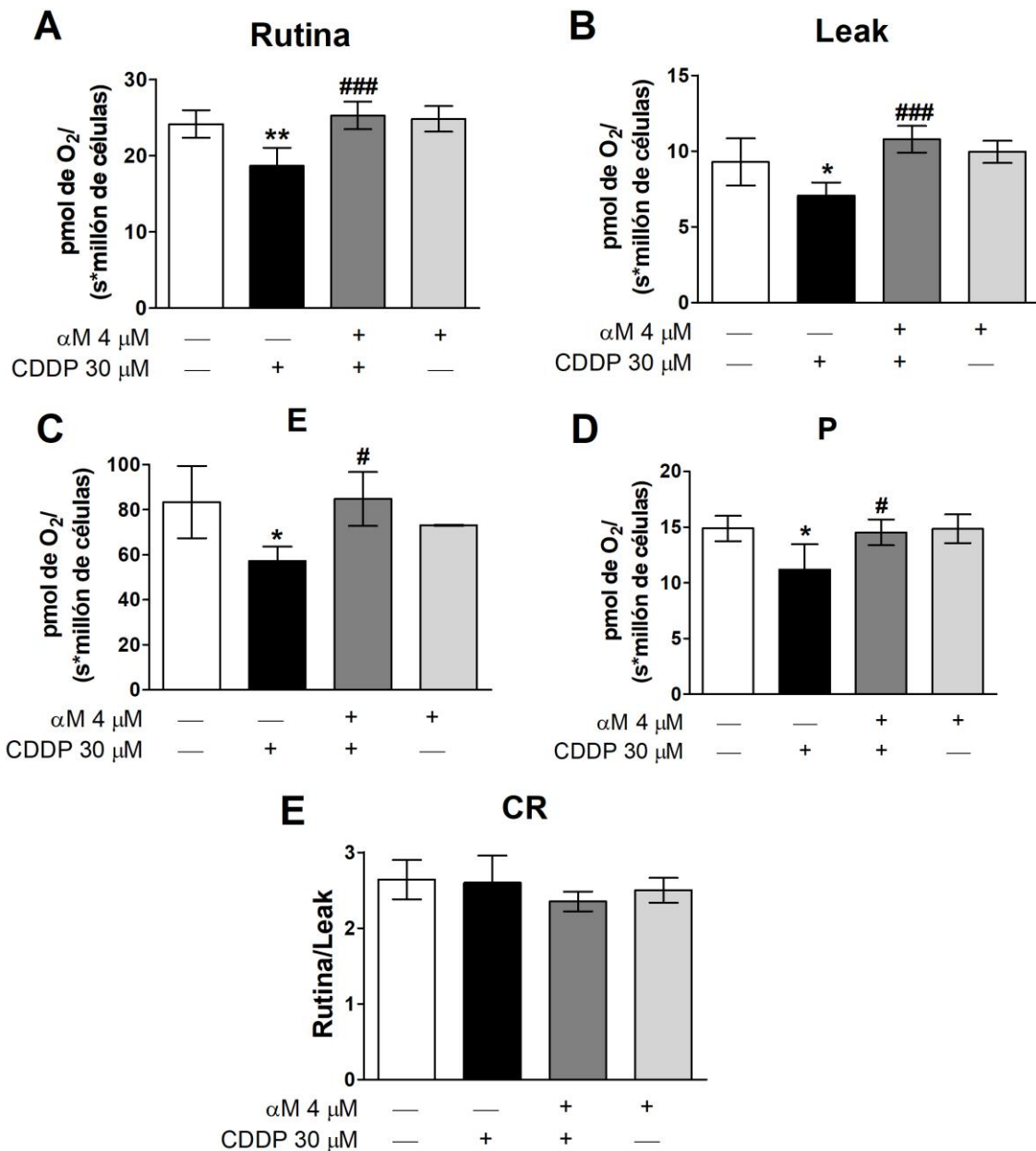


**Figura 6. Efecto protector de la alfa mangostina ( $\alpha$ M) contra la toxicidad del cisplatino (CDDP).** Las células LLC-PK1 se incubaron con concentraciones crecientes de **(A)** CDDP (5-40  $\mu$ M) y **(B)**  $\alpha$ M (1-5  $\mu$ M) por 24 h. **(C)** En un modelo de co-incubación se utilizaron las concentraciones de  $\alpha$ M con CDDP 30  $\mu$ M por 24 h. Después del tratamiento se determinó la viabilidad celular por el método de diacetato de fluoresceína (FDA). Los datos están expresados como promedio $\pm$ DE, n=5-7. \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01 y \*p<0.05 vs control, ###p<0.001 y ##p<0.01 vs CDDP.

## 6.2 La protección del $\alpha$ M se asocia a la preservación de la bioenergética mitocondrial

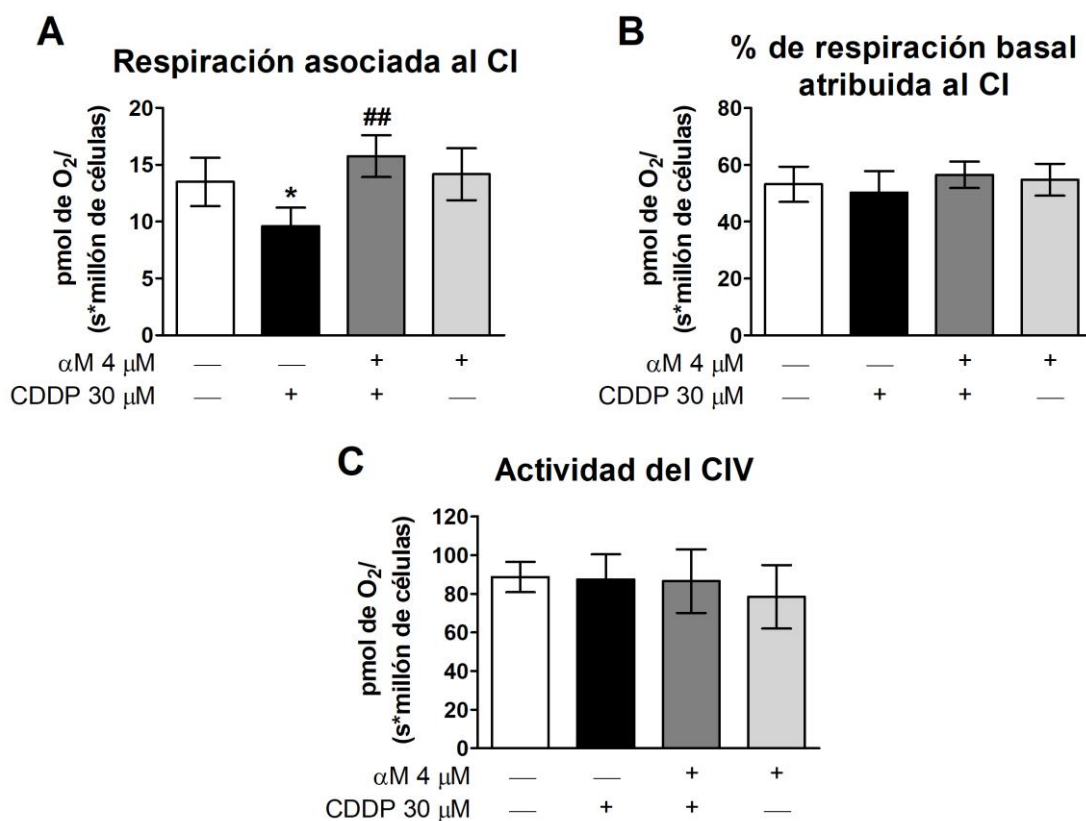
Aunque el principal mecanismo del CDDP es el daño al ADN, en la nefrotoxicidad se ha reconocido al daño mitocondrial como uno de los principales mecanismos de daño celular. Para evaluar si el daño inducido por CDDP y la protección mediada por la  $\alpha$ M involucran cambios en la bioenergética mitocondrial, se procedió a determinar parámetros respiratorios en la célula intacta. El CDDP redujo la respiración de rutina (Fig. 7A), el *leak* de la respiración o desacoplada (Fig. 7B), E (Fig. 7C) y P (Fig. 7D) a las 24 h de tratamiento en las células LLC-PK1. De manera interesante, aunque todos los parámetros mencionados disminuyeron por el CDDP, el CR no se modificó en ninguno de los tratamientos (Fig. 7E), lo que sugirió que las

alteraciones bioenergéticas podrían estar relacionadas con una disminución de todo el sistema de transporte de electrones (ETS).



**Figura 7. Parámetros respiratorios:** (A) Respiración de rutina celular, (B) Leak de la respiración o desacoplada, (C) Capacidad máxima del sistema de transferencia de electrones (E), (D) Respiración asociada a la fosforilación oxidativa (P) y (E) Control respiratorio (CR), a las 24 h de co-tratamiento de alfa mangostina (αM) y cisplatino (CDDP) en células LLC-PK1. Los datos están expresados como promedio±DE, n=3-5. \*\*P<0.01, \*p<0.05 vs control y ###p<0.001, #p<0.05 vs CDDP.

Por lo tanto, se evaluó la respiración asociada al complejo I (CI) mitocondrial, la actividad del complejo IV (CIV) y el porcentaje de la respiración de rutina asociada al CI. Aunque el CDDP disminuyó la respiración asociada al CI (Fig. 8A), no afectó el porcentaje de respiración de rutina asociada al mismo (Fig. 8B) ni la actividad del complejo CIV (Fig. 8). Con base en estos resultados y al hecho de la disminución en E, como una medida de la capacidad del ETS, se sugirió que la disminución de dichos parámetros se debía a una disminución en todo el ETS. Esto probablemente a consecuencia de una disminución en la masa mitocondrial, más que a alteraciones en la actividad de los complejos respiratorios. Por otro lado, el tratamiento con  $\alpha$ M evitó la disminución en los parámetros respiratorios inducidos por CDDP, además la  $\alpha$ M *per se* no alteró ninguno de los parámetros respiratorios.

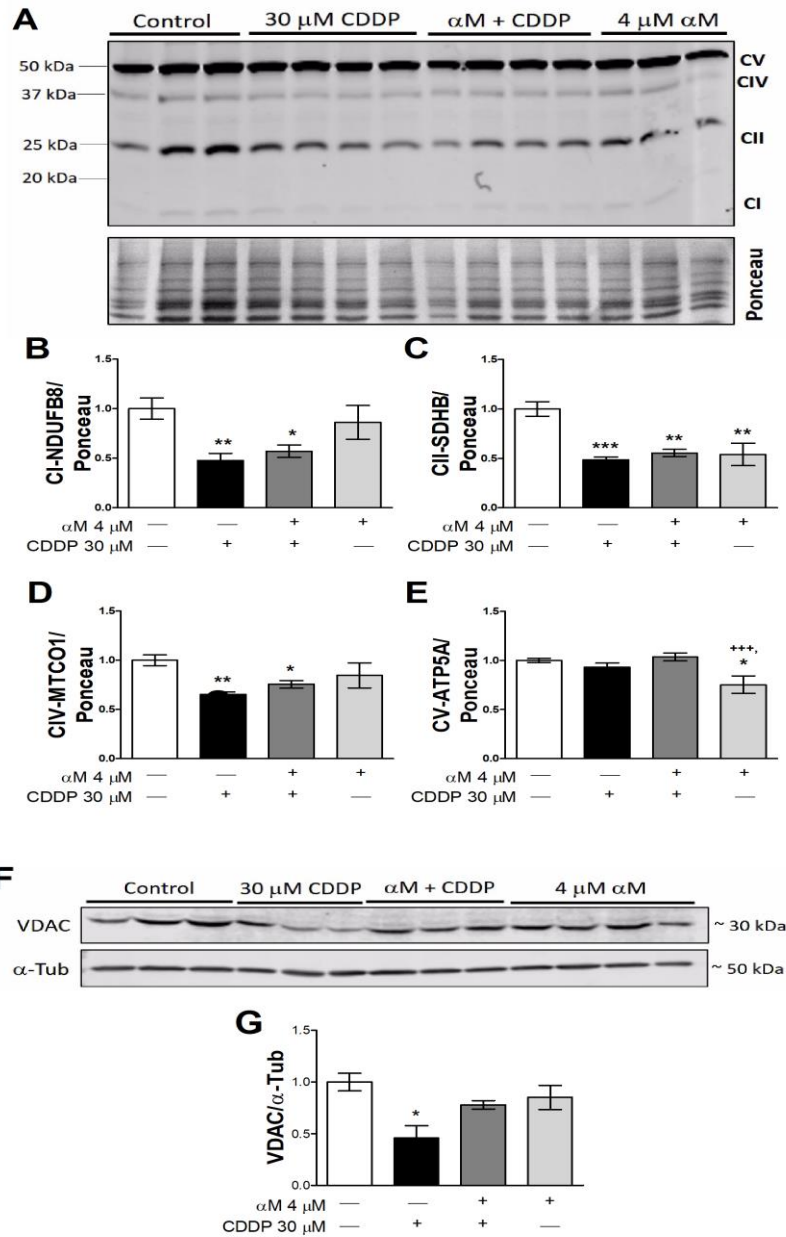


**Figura 8. Determinación de los parámetros respiratorios:** (A) respiración asociada a complejo I (CI), (B) porcentaje de respiración basal atribuida al CI y (C) actividad del complejo IV (CIV) a las 24h de co-tratamiento de alfa mangostina ( $\alpha$ M) y cisplatino (CDDP) en células LLC-PK1. Los datos están expresados como promedio $\pm$ DE, n=4-6. \*P<0.05 vs control y ##p<0.01 vs CDDP.

### 6.3 La $\alpha$ M previene parcialmente la disminución de la masa mitocondrial inducida por CDDP, al evitar la disminución en la biogénesis mitocondrial

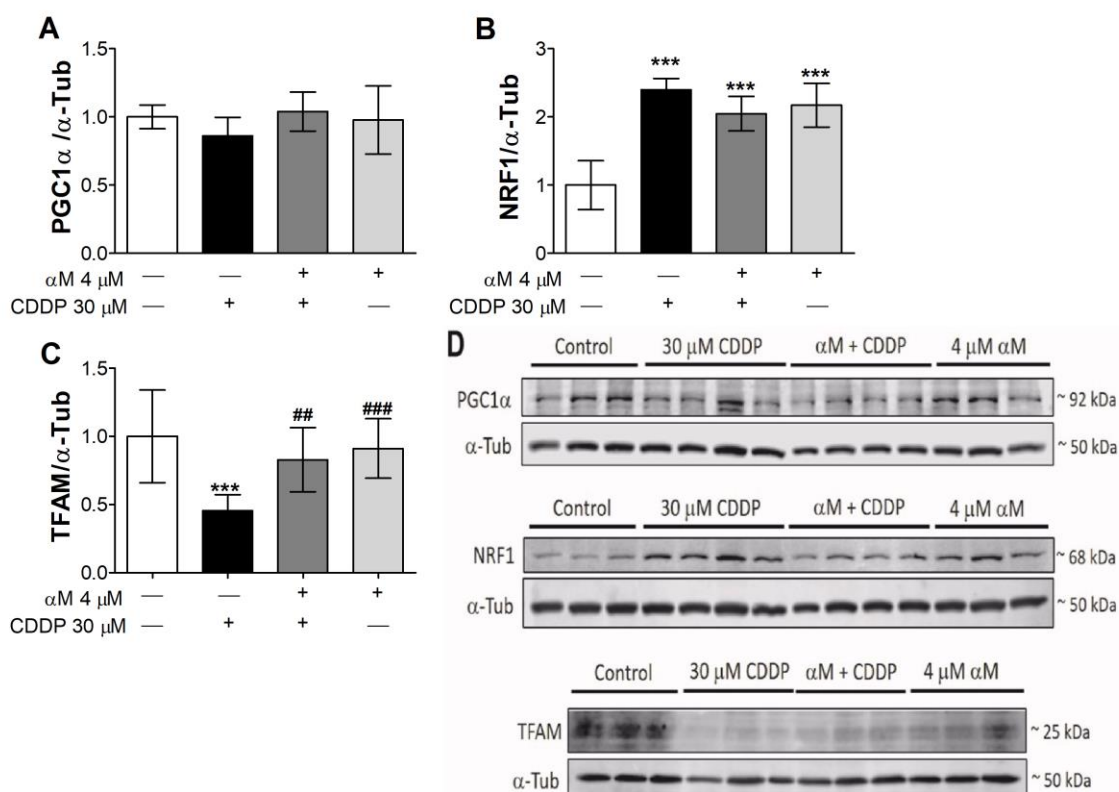
Para determinar si la reducción de los parámetros respiratorios estaba relacionado con la disminución de la masa mitocondrial, determinamos los niveles de VDAC y algunas subunidades de los complejos mitocondriales. En la figura 9, se observa que la incubación con CDDP redujo los niveles de CI-NDUFB8 (NADH: ubiquinona oxidoreductasa subunidad B8) (Fig. 9B), CII-SDHB (succinato deshidrogenasa subunidad B) (Fig. 9C), CIV-MTCO1 (citocromo c oxidasa mitocondrial subunidad catalítica) (Fig. 9D) y VDAC (Fig. 9F), pero el tratamiento con CDDP no modificó los niveles de CV-ATP5A (ATP sintasa F subunidad alfa) en comparación con el control (Fig. 9E). Aunque el co-tratamiento con  $\alpha$ M no restableció dichos niveles, sí logró restablecer parcialmente la disminución en los niveles de VDAC inducida por CDDP (Fig. 9F).

Debido a que cambios en la masa mitocondrial dependen de los procesos de síntesis y degradación, se procedió a evaluar los niveles de marcadores de biogénesis (Fig. 10). Se encontró que el CDDP no modificó los niveles de PGC1 $\alpha$  (Fig. 10A). A diferencia de PGC1 $\alpha$ , los niveles de NRF1 se incrementaron en los tratamientos con CDDP, CDDP+ $\alpha$ M y  $\alpha$ M (Fig. 10B). El CDDP disminuyó los niveles de TFAM, pero la co-incubación con  $\alpha$ M evitó esta reducción (Fig. 10C). La reducción de TFAM con el tratamiento de CDDP concordó con la caída en los niveles de la subunidad CIV-MTCO1, dado que ésta es un blanco de TFAM (Collu-Marchese et al., 2015). Por lo tanto, es probable que la exposición a CDDP reduzca la biogénesis mitocondrial.



**Figura 9. El cisplatino (CDDP) induce una disminución de contenido de proteínas mitocondriales.** Western blot en la célula completa con un coctel de anticuerpos para subunidades de proteínas de la fosforilación oxidativa (OXPHOS), **(A)** blots y **(B-E)** densitometrías correspondientes, así como, el nivel del canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC), **(F)** blot y **(G)** densitometría. Succinato deshidrogenasa subunidad B (CII-SDHB), NADH: ubiquinona oxidoreductasa subunidad B8 (CI-NDUFB8), Citocromo c oxidasa mitocondrial subunidad catalítica (CIV-MTCO1), Adenosín trifosfato (ATP) sintasa F subunidad alfa (CV-ATP5A), Alfa tubulina ( $\alpha$ -Tub). Los datos están expresados como promedio $\pm$ DE, n=4-8. \*\*\*P<0.001, \*\*p<0.01 y \*p<0.05 vs control y +++p<0.001 vs ( $\alpha$ M+CDDP).

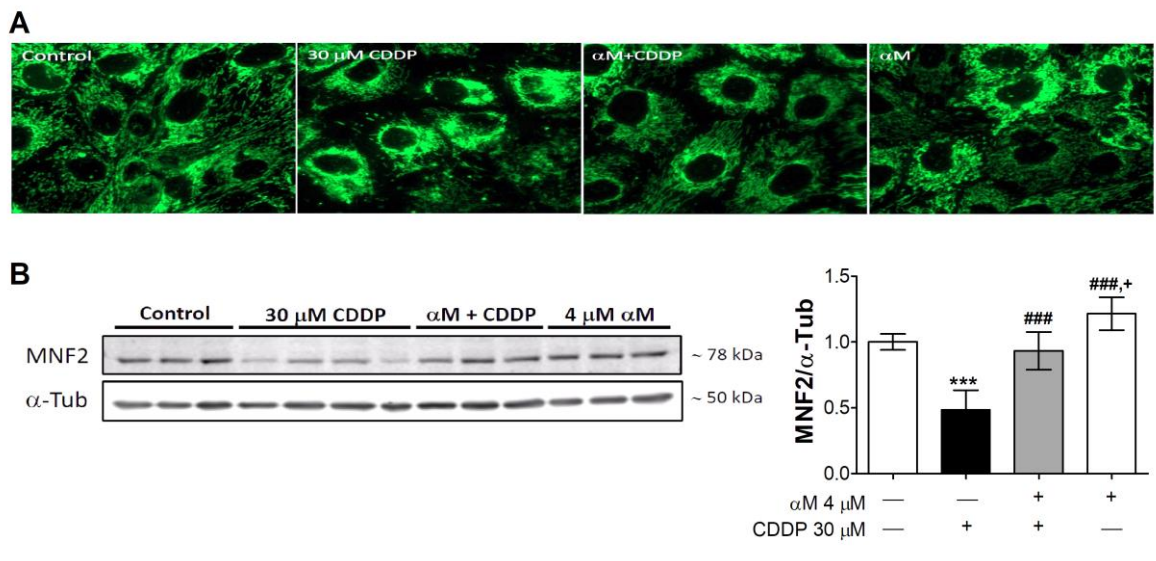




**Figura 10. Modulación de la biogénesis mitocondrial.** Niveles de proteína de **(A)** PGC1 $\alpha$  (coactivador del receptor gama activado por el proliferador de peroxisomas 1 alfa), de **(B)** (NRF1 (factor nuclear respiratorio 1) y de **(C)** TFAM (factor de transcripción mitocondrial A). **(D)** Blots representativos.  $\alpha$ -Tub: alfa tubulina,  $\alpha$ M: alfa mangostina. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  DE, n=5-7. \*\*\*p<0.001 y \*p<0.05 vs. control. ###P<0.001 y ##p<0.01 vs. CDDP (cisplatino).

Adicionalmente se realizó el marcaje de las mitocondrias con MitoTracker Green, un marcador mitocondrial fluorescente. En las micrografías se observa que las células tratadas con CDDP presentan una señal puntuada comparado con las células control (Fig. 11A), sugiriendo fragmentación mitocondrial, también se observa una disminución de la continuidad de la red mitocondrial, lo cual se evitó con el tratamiento de  $\alpha$ M. Por otro lado, la exposición a CDDP redujo los niveles de MFN2, un marcador de fusión mitocondrial, lo cual se evitó con el co-tratamiento de  $\alpha$ M (Fig. 11B). Estos datos sugieren que el CDDP reduce la fusión y promueve la fragmentación mitocondrial, facilitando la degradación de las mitocondrias

disfuncionales. Así mismo, la degradación mitocondrial explicaría la disminución de las subunidades mitocondriales y de VDAC con el tratamiento con CDDP, apoyando la idea de la disminución de la masa mitocondrial, la cual se preserva de manera parcial por la  $\alpha$ M.



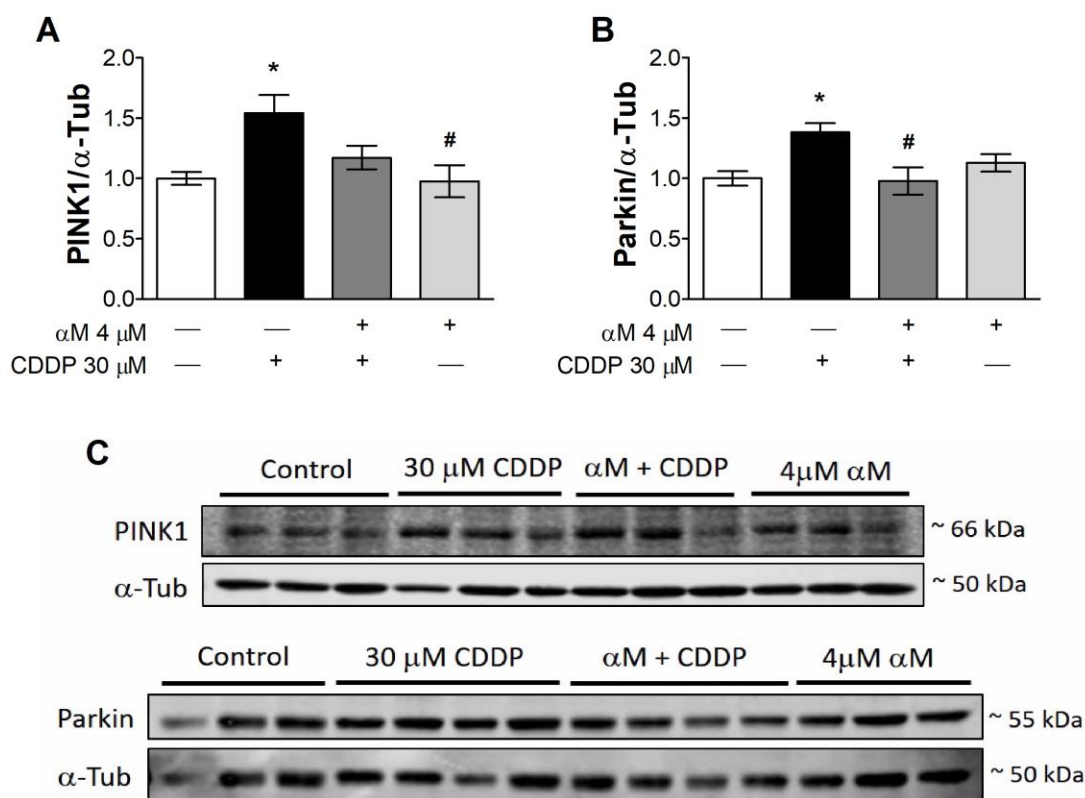
**Figura 11. La alfa mangostina ( $\alpha$ M) evita la disminución del contenido de MFN2 (mitofusina 2) y el marcaje puntuado de MitoTracker Green. (A)** Micrografías representativas del marcaje con Mitotracker green, marcador de masa mitocondrial, a 20x con posterior zoom. **(B)** Western blot en la célula completa de MFN2, así como la densitometría correspondiente.  $\alpha$ -Tub: alfa tubulina. Los datos se representan como promedio $\pm$ DE, n=4-8. \*\*\*p<0.001 vs. control, ###p<0.001 vs CDDP (cisplatino) y +p<0.05 vs  $\alpha$ M+CDDP.

#### 6.4 La inducción de la mitofagia juega un papel importante en la protección por $\alpha$ M

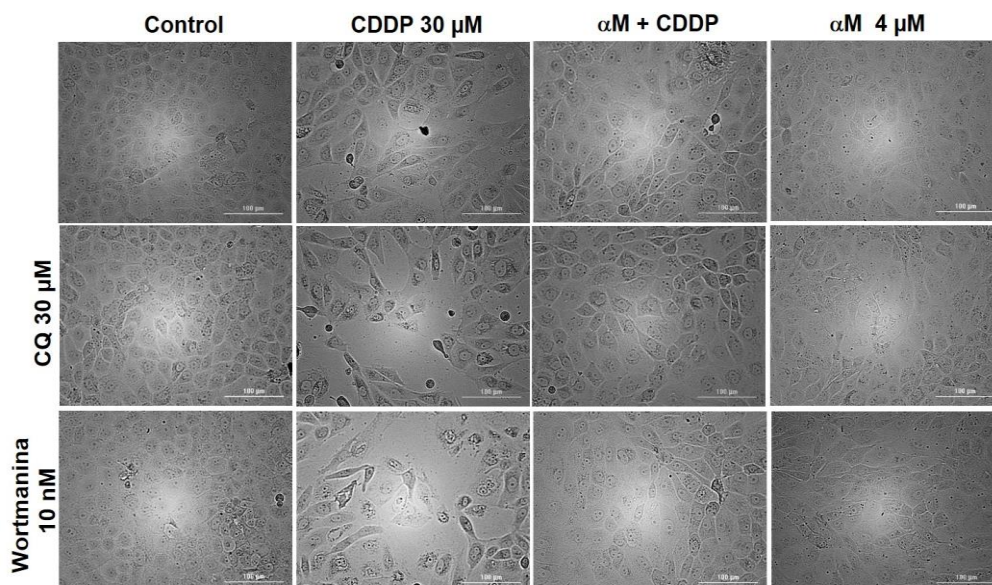
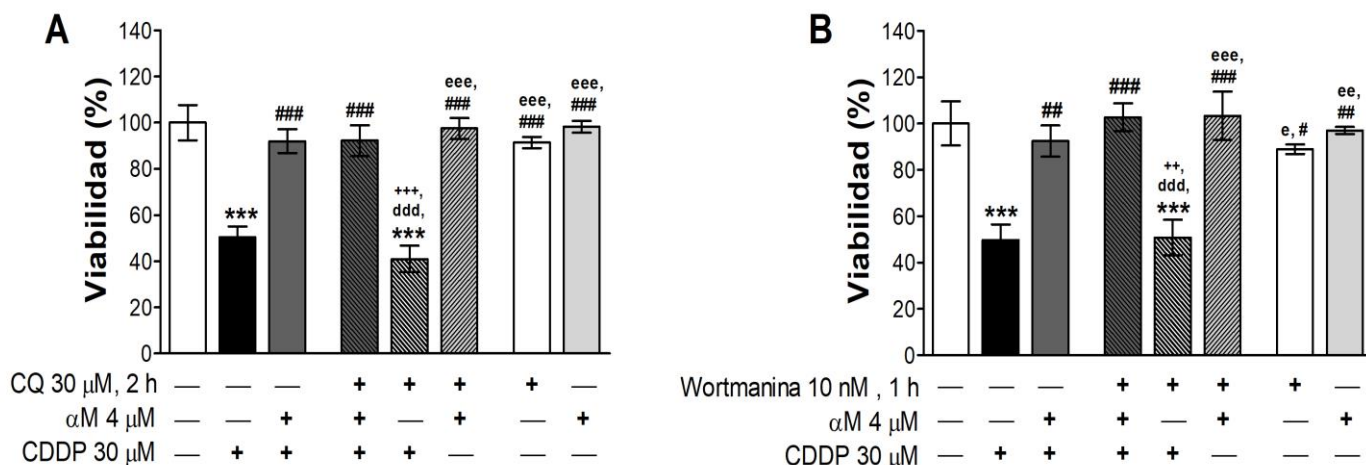
Para determinar si la disminución de la masa mitocondrial también involucraba un incremento en los procesos de degradación, se decidió evaluar marcadores de mitofagia. En la Figura 12 se presenta el nivel de los dos principales reguladores de la mitofagia, PINK y Parkin, los cuales incrementaron con el tratamiento de CDDP. La  $\alpha$ M evitó dicho aumento, sugiriendo que la  $\alpha$ M evita la inducción de la mitofagia.

Aunque la mitofagia es un proceso específico de la autofagia (macroautofagia), nuestro interés fue determinar el papel de la autofagia general en el modelo de daño inducido por CDDP y evaluar si la protección mediada por la  $\alpha$ M involucra su modulación (Fig. 13). Para lo cual, se utilizaron dos inhibidores, uno del inicio y otro del final del proceso de la autofagia. La wortmanina inhibe a la PI3K, la

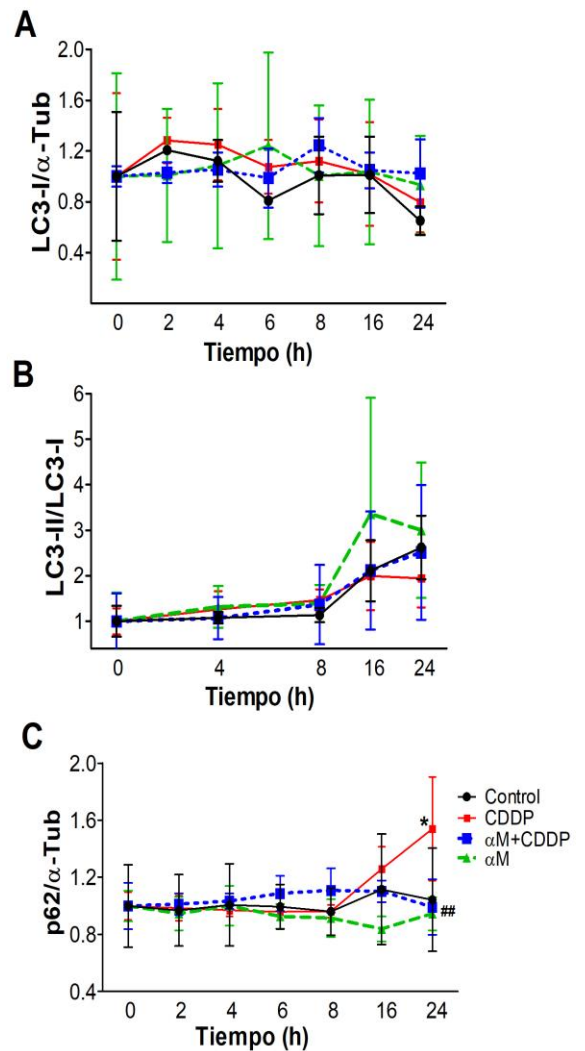
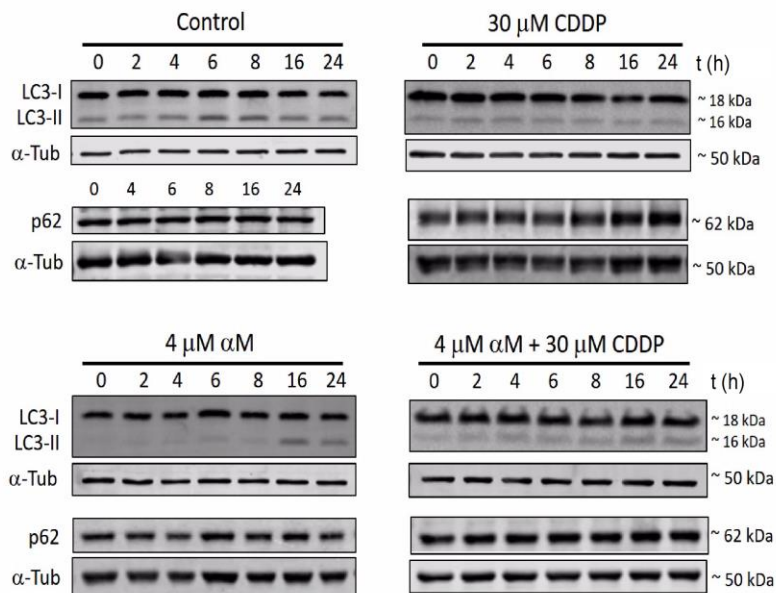
cual puede inducir autofagia, y la CQ es un reconocido inhibidor de la parte final del proceso de la autofagia. Sin embargo, como se observa en la Figura 13 la inhibición de la autofagia no evitó la protección de la  $\alpha$ M, sugiriendo que la autofagia no es un mecanismo principal en el mecanismo de sobrevivencia de la  $\alpha$ M. Al evaluar dos marcadores ampliamente reconocidos de la inducción de la autofagia, LC3-II y p62 (cuya acumulación es indicativo de inhibición de la autofagia) no observamos variaciones entre los niveles de LC3-II, y sólo observamos un incremento de p62 en el tratamiento con CDDP en un curso temporal (Fig. 14).



**Figura 12. Modulación de la mitofagia.** (A) Cinasa inducida por el homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) 1. (PINK1) y (B) Parkin. (C) Blots representativos. Alfa tubulina ( $\alpha$ -Tub), alfa mangostina ( $\alpha$ M). Los datos están representados como promedio $\pm$ DE, n=6-7. \*P<0.05 vs. control. #P<0.05 vs. cisplatino (CDDP).



**Figura 13. Inhibición de la autofagia.** Las células se trataron previamente con **(A)** CQ (cloroquina) por 2 h, la cual afecta la etapa final de la autofagia evitando la degradación del cargo, ó **(B)** Wortmanina por 1 h, inhibidor no específico de la PI3K (fosfatidil inositol 3 cinasa clase III) relacionado con el inicio de la autofagia. αM: alfa mangostina, CDDP: cisplatino. Los datos están expresados como promedio±DE, n=4-6. \*\*\*P<0.001 vs control. ###P<0.001, ##p<0.01 y #p<0.05 vs. (CDDP). +++P<0.001 y ++p<0.01 vs. (αM+CDDP). dddP<0.001 vs. (inhibidor+αM+CDDP). eeeP<0.001, eeP<0.01 y eP<0.05 vs. (inhibidor+CDDP)

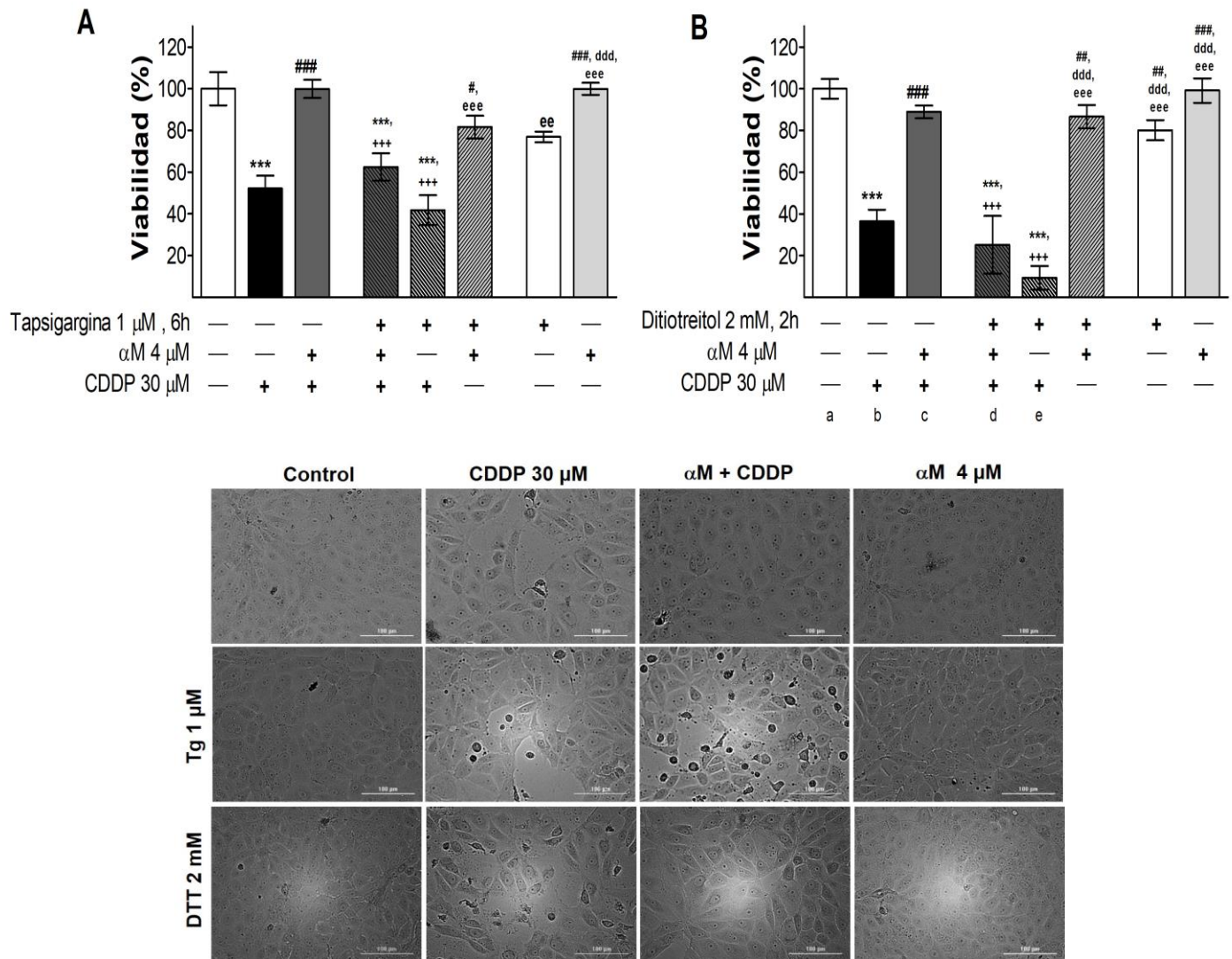


**Figura 14. Proteínas relacionadas con la autofagia.** Se evaluaron los niveles de marcadores del proceso intermedio (A y B, LC3-I y LC3-II) y del final de la autofagia (C, p62). Se presentan los blots representativos. α-Tub: alfa tubulina, αM: alfa mangostina, LC3-I: cadena 3 de la proteína 1A/1B asociada a los microtúbulos, LC3-II: forma lipidada de LC3-I, p62: Proteína de unión a ubiquitina p62. Los datos están expresados como promedio±DE, n=3-5. \*p<0.05 vs CT. ##p<0.01 vs CDDP (cisplatino).

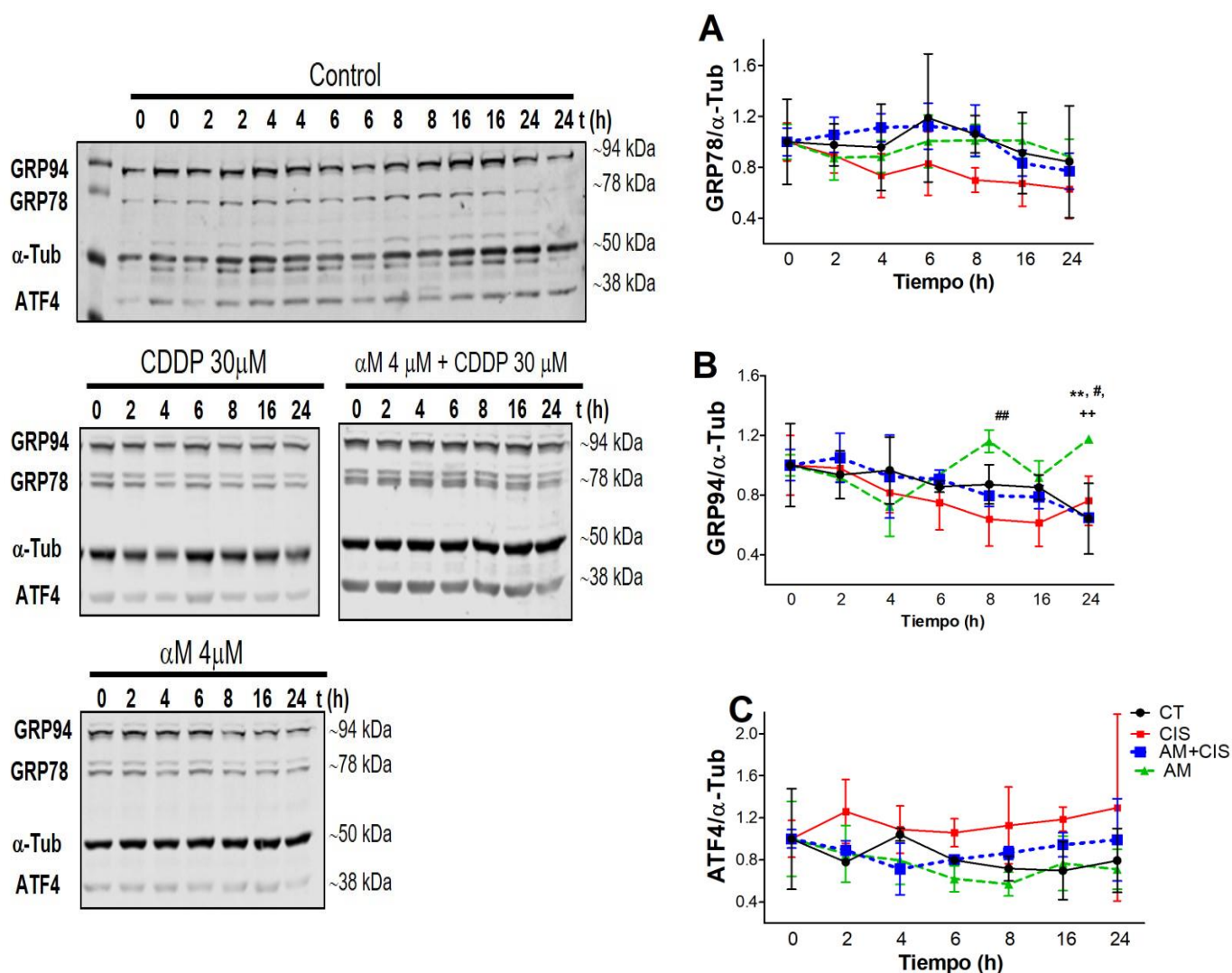
### 6.5 Participación del estrés del RE en el mecanismo de protección de la $\alpha$ M

Dada la estrecha relación entre la mitocondrial y el RE, se decidió evaluar el papel del estrés del RE. Para lo cual se usaron dos compuestos inductores de estrés del RE, la Tg (tapsigargina, inductor que afecta la homeostasis de calcio) y el DTT (ditiotreitól, inductor indirecto que incrementa la cantidad de proteínas mal plegadas). En la Figura 15 se presentan los datos de viabilidad celular, los cuales sugieren que la inducción de estrés del RE podría tener un efecto en el mecanismo de protección de la  $\alpha$ M, ya que el uso de ambos inductores evitó la protección por  $\alpha$ M. Sin embargo, al determinar el contenido de proteína de algunos marcadores del estrés del RE en un curso temporal (Fig. 15), no se observó un incremento significativo de GRP78 y ATF4. De manera interesante, el único marcador que incrementó a las 24 h fue la chaperona GRP94 en el tratamiento con  $\alpha$ M, lo cual podría relacionarse con procesos de proliferación celular.

Aunque mediante nuestra estrategia experimental no encontramos una relación directa entre la protección de la  $\alpha$ M con los marcadores de estrés del RE, es claro que la alteración de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  y el estrés, inducido por Tg y DTT respectivamente, juegan un papel importante en el mecanismo de protección de la  $\alpha$ M. Por lo cual, al no haber determinado marcadores tempranos de la inducción de la UPR no podemos descartar la participación del estrés del RE y de la UPR en nuestro modelo.



**Figura 15. La inducción de estrés del retículo endoplásmico (RE) se relaciona con el mecanismo de protección de la alfa mangostina ( $\alpha$ M).** Las células se trataron previamente con **(A)** Tapsigargina (Tg) por 6 h, la cual afecta la homeostasis de calcio, o **(B)** Ditiotreititol (DTT) por 2 h, el cual oxida puentes disulfuro en las proteínas. Los datos están expresados como promedio $\pm$ DE, n=6 y 3. \*\*\*P<0.001 vs control. ###P<0.001, ##p<0.01 y #p<0.05 vs. cisplatino (CDDP). +++P<0.001 vs. ( $\alpha$ M+CDDP). dddP<0.001 vs. (inhibidor+ $\alpha$ M+CDDP). eeeP<0.001 y eeP<0.01 vs. (inhibidor+CDDP).



**Figura 16. Niveles de proteínas relacionadas con la homeostasis del retículo endoplásmico (RE).** Se evaluaron los niveles de chaperonas, **(A)** GRP78 (proteína regulada por glucosa de 78 kDa) y **(B)** GRP94 (proteína regulada por glucosa de 94 kDa), así como un marcador de la vía de PERK (cinasa del RE parecida a la proteína cinasa activada por ARN), **(C)** ATF4 (factor de transcripción activador 4). Los datos están representados como promedio $\pm$ DE, n=3. \*\*p<0.01 vs CT. #p<0.05 vs CDDP (cisplatino). ++p<0.01 vs alfa mangostina ( $\alpha$ M)+CDDP.



## 7. DISCUSIÓN

Aunque el CDDP es un potente agente antineoplásico los efectos limitantes de la dosis, como la nefrotoxicidad, aún no están totalmente dilucidados por lo cual hasta el momento no existe un tratamiento eficaz para contrarrestar estos efectos en la clínica (Duffy et al., 2018). La nefrotoxicidad del CDDP se atribuye a su acumulación en el riñón especialmente en el túbulo proximal de la nefrona (Yang et al., 2014). Debido a las funciones del túbulo proximal y la dependencia de éste a la función mitocondrial, el daño mitocondrial se ha reconocido como un mecanismo importante en la nefrotoxicidad por CDDP (Manohar y Leung, 2018; Wang et al., 2018). Aunado a esto, la formación de aductos del CDDP no solo con el ADN sino con proteínas del citosol, de la mitocondria y del ER, favorecen la activación de una gran cantidad de vías de señalización de supervivencia y muerte celular (Sancho-Martínez et al., 2012). Por otro lado, aunque se ha demostrado que la  $\alpha$ M es capaz de contrarrestar los efectos nefrotóxicos del CDDP, hasta el momento no se habían estudiado los efectos de la misma sobre la función mitocondrial, el estrés del RE y la autofagia. En este proyecto se trató de evaluar el efecto de la  $\alpha$ M en combinación con el CDDP, y al mismo tiempo se evaluó el efecto *per se* de la  $\alpha$ M.

Anteriormente se demostró que la nefroprotección de la  $\alpha$ M frente a CDDP está relacionada con sus propiedades antioxidantes (Pérez-Rojas et al., 2009; Sánchez-Pérez et al., 2010). En el presente trabajo demostramos que dicha protección también está relacionada a la preservación de la función mitocondrial. En este proyecto utilizamos la línea celular LLC-PK1, debido a que es una línea celular de riñón estable y hasta la fecha se ha descrito como una línea celular que no presenta cambio neoplásico después de numerosos pases de cultivo, además de que posee características de células de túbulo proximal (Hull et al., 1976; Nielsen et al., 1998). Corroboramos en las células LLC-PK1 que la co-incubación con  $\alpha$ M protege contra la disminución de la viabilidad inducida por CDDP (Fig. 6C), como se ha descrito anteriormente (Sánchez-Pérez et al., 2010). La protección se encontró con las concentraciones de 4 y 5  $\mu$ M de  $\alpha$ M, sin embargo no hubo diferencias significativas entre ambas concentraciones (Fig 6). Debido a que en una curva de concentraciones de 1, 2.5, 5, 7.5 y 10  $\mu$ M de  $\alpha$ M, encontramos que la  $\alpha$ M

reduce cerca del 50% la viabilidad a la concentración de 7.5  $\mu\text{M}$  (datos no presentados), para la realización de los experimentos posteriores decidimos usar la menor concentración de protección de  $\alpha\text{M}$ . Estas consideraciones las tomamos en cuenta debido a que hasta el momento no se ha descrito toxicidad por  $\alpha\text{M}$  y al hecho de haber usado DMSO y medio de cultivo como vehículo de la  $\alpha\text{M}$ , ya que se ha demostrado que los procesos de microemulsificación favorecen su absorción y distribución (Ovalle-Magallanes et al., 2017; Xu et al., 2017).

En nuestro laboratorio anteriormente se demostró que la  $\alpha\text{M}$  evita el estrés oxidante *in vitro* e *in vivo* inducido por CDDP, ya que es capaz de prevenir el aumento de ROS y la disminución de glutatión (Pérez-Rojas et al., 2009; Sánchez-Pérez et al., 2010). En el presente trabajo demostramos que las alteraciones bioenergéticas mitocondriales inducidas por el CDDP como son el parámetro de respiración de rutina, el *leak*, E, P (Fig 7) y la respiración asociada al CI se evitan con el co-tratamiento de la  $\alpha\text{M}$ . Dichos experimentos se realizaron en la célula completa, ya que tiene como ventaja el evitar muchos de los artefactos asociados con el aislamiento de mitocondrias y tiene una mayor relevancia fisiológica (Brand y Nicholls, 2011). Sin embargo, la determinación de otros parámetros respiratorios se dificulta debido a que la membrana celular es impermeable a nucleótidos de adenina, muchos de los sustratos mitocondriales y algunos inhibidores utilizados en el análisis de la respiración mitocondrial. Se ha demostrado que en células RTC el CDDP disminuye el OCR, referido a la actividad basal de OXPHOS (Yu et al., 2018), así como en estudios *in vivo* el CDDP disminuye el consumo de oxígeno mitocondrial y la actividad de los complejos I y V en mitocondrias aisladas (Ortega-Domínguez). Si bien se ha reportado que el CDDP disminuye la actividad de los complejos I-IV en cultivo celular, esto se observó a los 20 min de incubación con las concentraciones de 50 y 500  $\mu\text{M}$  de CDDP (Kruidering et al., 1997). El hecho de que en nuestros experimentos el CDDP no indujera cambios en el CR, nos sugirió que el CDDP podría estar causando alteraciones en la actividad de la ETS o bien podría deberse a alteraciones en el contenido mitocondrial. De manera importante demostramos que la  $\alpha\text{M}$  no altera ningún parámetro bioenergético determinado.

Estas alteraciones de los parámetros respiratorios inducidos por el CDDP se debieron a cambios en la forma y la masa mitocondrial, como se ha observado anteriormente (Sancho-Martínez et al., 2012; Ortega-Domínguez et al., 2017). Debido a que observamos una disminución en los niveles de VDAC y de las subunidades de los complejos mitocondriales (Fig. 9). Se ha demostrado que el CDDP se une con alta eficiencia a VDAC, lo cual puede favorecer las alteraciones estructurales o funcionales de la mitocondria, ya que VDAC es la proteína más abundante en la membrana externa mitocondrial (Sancho-Martínez et al., 2012). Por otro lado, las subunidades de los complejos mitocondriales CI-NDUFB8, CII-SBH y CV-ATP5A son codificadas por el ADN nuclear y la subunidad CIV-MTCO1 es codificada por el ADN mitocondrial (Signes y Vizarra, 2018). El hecho de que el CDDP disminuyó los niveles de VDAC y las subunidades de los complejos mitocondriales, a excepción de CV-ATP5A, y no alteró el CR apoya la hipótesis de que el efecto de CDDP se presenta a nivel de masa mitocondrial. Aunque el co-tratamiento con la  $\alpha$ M no restableció los niveles de las subunidades ni de VDAC a niveles de las células control, si previno las alteraciones en la morfología mitocondrial y en los parámetros bioenergéticos (Figs. 9 y 11). Por otro lado, el tratamiento con  $\alpha$ M disminuyó los niveles de proteína de CII-SBH y de CV-ATP5A, pero no modificó los parámetros respiratorios determinados, por lo cual sería deseable evaluar la actividad de dichos complejos, pero este tipo de estudios rebasa los objetivos del presente trabajo. Al respecto un estudio en tejido cardíaco de ratas reportó que el tratamiento con  $\alpha$ M no afecta la actividad de enzimas mitocondriales, entre ellas el CIV mitocondrial, además de restablecer la actividad de dichas enzimas disminuidas por isoproterenol (Sampath y Kannan, 2009).

La disminución en la masa mitocondrial se asoció a alteraciones en la biogénesis mitocondrial, ya que observamos una disminución en los niveles de TFAM. La interacción de PGC1 $\alpha$  con NRF1 promueve la transcripción de TFAM, el cual ayuda al mantenimiento de la estructura, la replicación y la transcripción del ADN mitocondrial, promueve la síntesis de proteínas mitocondriales y la biogénesis mitocondrial (Kang et al., 2007; Fontecha-Barriuso et al., 2020). Aunque no observamos una disminución en los niveles de proteína PGC1 $\alpha$  no podemos

descartar alteraciones en su actividad, ya que este factor transcripcional está modulado por diferentes modificaciones post-traduccionales como la fosforilación por AMPK y la desacetilación por SIRT1 o SIRT3 (Ishimoto e Inagi, 2016). Se ha descrito que el CDDP disminuye los niveles de SIRT3, además el uso de un agonista de AMPK incrementa la expresión de SIRT3 induciendo la biogénesis mitocondrial con ello disminuyendo el daño tubular inducido por CDDP (Ishimoto e Inagi, 2016; Ortega-Domínguez et al., 2017). En contraste, la  $\alpha$ M puede inducir la activación de SIRT1 y AMPK en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta alta en grasa (Choi et al., 2015). Asimismo, aunque observamos un incremento en los niveles de NRF1, no podemos descartar alteraciones en su actividad, ya que también está expuesto a modificaciones post-traduccionales (fosforilación y metilación), a interacciones con PGC1 $\alpha$  o la inhibición por ciclina D1 (Sanchis-Gomar et al., 2014). NRF1 contribuye a la expresión de subunidades de los complejos mitocondriales, transportadores y factores transcripcionales como TFAM. En músculo se ha observado que la sobreexpresión de NRF1 incrementa la expresión de algunos blancos, pero no incrementa la capacidad respiratoria (Sanchis-Gomar et al., 2012). Debido a que la disminución de los niveles de TFAM es una medida indirecta del efecto de PGC1 $\alpha$  en la biogénesis (Wu et al., 1999), nosotros sugerimos que existen alteraciones en la biogénesis mitocondrial. Por otro lado la  $\alpha$ M puede evitar los cambios inducidos por el CDDP a nivel mitocondrial, así como no induce alteraciones en la biogénesis.

Debido a las alteraciones en la masa y la biogénesis mitocondrial, al evaluar los marcadores de mitofagia (PINK/Parkin) observamos que en efecto el CDDP causa un incremento de los marcadores, y con ello la activación de la mitofagia, lo cual se evita con el co-tratamiento de la  $\alpha$ M. La inducción de la mitofagia se ha asociado como un efecto de supervivencia o protección frente al CDDP, debido a que protege de la disfunción mitocondrial (Zhao et al., 2017; Wang et al., 2018). Además, la  $\alpha$ M fue capaz de evitar el incremento en los marcadores de mitofagia, sugiriendo que el efecto de la  $\alpha$ M podría estar relacionado a procesos previos a la activación de la misma. Estos antecedentes sugerían la participación de la autofagia, sin embargo, nuestros experimentos no nos permitieron observar

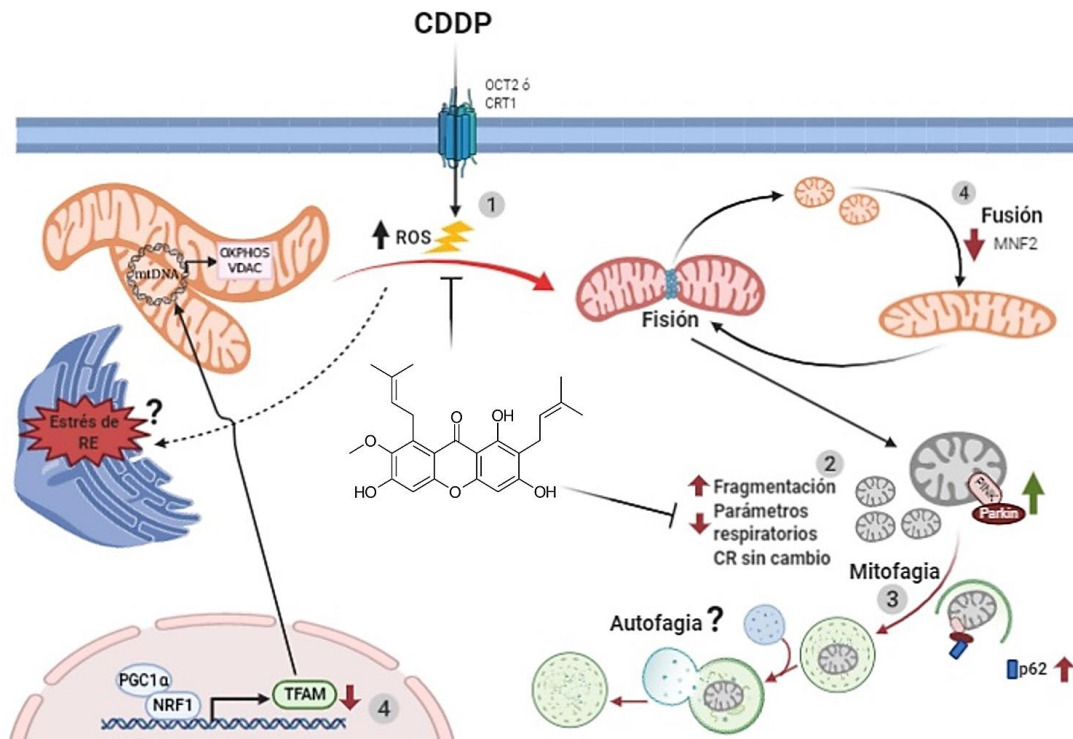
cambios en los marcadores LC3-II y p62. Aunado a que el uso de inhibidores de la autofagia en etapas iniciales y finales no afectaron la protección mediada por la  $\alpha$ M, no podemos descartar el efecto de la autofagia en el mecanismo de protección de la  $\alpha$ M. Aunque la participación de la autofagia se ha referido como un mecanismo protector frente al CDDP, aún no es tan clara su participación como mecanismo de protección o de apoptosis asociada a la inducción de la autofagia en cultivo celular, debido a que se ha sugerido que la inducción de la autofagia es dependiente de la concentración del CDDP y de la línea celular (Yang et al., 2008; Rovetta et al., 2012; Wang et al., 2018). Si bien, bajas concentraciones de CDDP (10  $\mu$ M) que generan estrés moderado, induce autofagia como un mecanismo de respuesta temprana al daño por CDDP, altas concentraciones de CDDP (50  $\mu$ M) generan un estrés severo que induzca apoptosis (Rovetta et al., 2012). En las células tratadas con altas concentraciones de CDDP los niveles de marcadores de autofagia se mantienen parecidos a las células control, además el uso de inhibidores de autofagia no exacerba el daño por CDDP (Rovetta et al., 2012). Por el contrario, en células LLC-PK1 tratadas con 50  $\mu$ M de CDDP, la inducción de la autofagia es una respuesta temprana al daño por CDDP (Yang et al., 2008). En este modelo el uso de inhibidores de la autofagia incrementa la actividad de la apoptosis inducida por CDDP (Yang et al., 2008). En nuestros experimentos evaluamos la concentración de 30  $\mu$ M de CDDP, por lo que esperábamos demostrar la participación de la autofagia como un mecanismo de protección. Sin embargo, el hecho de que el uso de inhibidores de la misma no exacerbara el daño por CDDP nos sugiere la realización de estudios adicionales para determinar el flujo de la autofagia o la formación de autofagosomas, dado que la autofagia es un proceso sumamente complejo (Galluzzi et al., 2017; Kaushal y Shah, 2016).

La mitocondria y el RE son organelos membranosos cuya estructura forma redes, lo cual facilita la interacción interorganelos a través de múltiples sitios de contacto formando dominios específicos, membranas del RE asociadas a la mitocondria (Bergeron et al., 1987; Marchi et al., 2014). Estas interacciones participan en la coordinación entre los dos organelos en la transferencia de calcio y lípidos, en la regulación de la fisión mitocondrial o la provisión de membranas para

la autofagia. En la nefrotoxicidad inducida por CDDP, como se ha mencionado, el daño mitocondrial tiene una gran relevancia en el mecanismo de daño, sin embargo también se ha reportado el daño al RE (Inagi et al., 2014; Manohar y Leung, 2017). Especialmente en la inducción de la apoptosis mediada por el estrés del RE (Mandic et al., 2003). Aunque la inducción del estrés del RE mediante Tg y DTT evitó la protección de la  $\alpha$ M (Fig. 15), la determinación de los marcadores de estrés del RE por western blot no esclareció la inducción de la UPR. Esto podría deberse a que el monitoreo de la UPR también contempla las modificaciones pos-traduccionales, la inducción de ARNm específicos o la traslación de los factores de transcripción al núcleo, las cuales no se evaluaron en el presente trabajo (Samali et al., 2010). Por otro lado, los resultados del uso de inductores de estrés del RE nos abre a nuevas hipótesis, en las cuales la homeostasis de calcio y el estrés oxidante podrían participar como mecanismos importantes relacionados en la protección de la  $\alpha$ M.

## 8. CONCLUSIÓN

La  $\alpha$ M protegió del daño inducido por el CDDP, principalmente al evitar las alteraciones bioenergéticas mitocondriales, debido a que la  $\alpha$ M preservó la masa mitocondrial. Con los resultados obtenidos, al parecer el estrés del RE y la autofagia no participan de manera importante en el mecanismo de daño inducido por CDDP, sin embargo, no podemos descartar su participación (Fig. 17).



**Figura 14. Diagrama integrativo.** El daño celular inducido por CDDP en las células LLC-PK1 es principalmente a través del estrés oxidante y el daño a la mitocondria (1, 2), principalmente al disminuir la masa de la red mitocondrial, debido a una disminución de la biogénesis y la fusión mitocondrial (4), así como a un incremento de la mitofagia (3). En el presente trabajo demostramos que la  $\alpha$ M es capaz de evitar la disminución de la masa mitocondrial y los efectos relacionados. Por sí misma, la  $\alpha$ M no indujo ningún cambio en la función mitocondrial, del RE o de la autofagia. Aunque no se encontró una relación con el daño al RE o inducción de autofagia por CDDP, no se puede descartar la participación de dichos procesos. MFN2: Mitofusina 2, CDDP: cisplatino, OCT2: Transportador de cationes orgánicos 2, CRT1: transportador de cobre 1, RE; retículo endoplásmico, VDAC: Canal de aniones dependiente de voltaje, OXPHOS: fosforilación oxidativa, ROS: especies reactivas de oxígeno, CR: control respiratorio, PINK: Kinasa inducida por el homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) 1, p62: Proteína de unión a ubiquitina p62, TFAM: Factor de transcripción mitocondrial A, NRF1: Factor nuclear respiratorio 1, PGC1 $\alpha$ : Coactivador del receptor gama activado por el proliferador de peroxisomas 1 alfa.

## 9. PERSPECTIVAS

Debido a que nuestra estrategia para evaluar la participación de la autofagia no nos permitió evaluar si existe flujo autofágico o si la autofagia estaba bloqueada, una perspectiva será realizar nuevas estrategias para determinar la participación de la autofagia como mecanismo de supervivencia o apoptosis celular, debido a que los inhibidores aparentemente no tienen efecto en el tratamiento con CDDP o  $\alpha$ M+CDDP.

Debido a que el uso de Tg, la cual afecta la homeostasis de calcio, parece tener gran relevancia en la protección de la  $\alpha$ M y además del hecho de que varias proteínas relacionadas con la OXPHOS están reguladas por los niveles de calcio (Glancy y Balaban, 2012), otra perspectiva del trabajo es evaluar la participación del calcio como regulador de la bioenergética, autofagia y estrés del RE en el modelo del CDDP y la protección mediada por  $\alpha$ M.

Del mismo modo, debido a las limitantes metodológicas al evaluar la activación de la UPR, otra perspectiva del presente trabajo es evaluar mediante otras metodologías, por ejemplo a nivel de la acumulación de ARNm, los marcadores de dicha respuesta así como marcadores del estrés del RE. Debido a que hay una aparente disminución de GRP78 y que en el daño por CDDP se ha descrito la fragmentación del RE, sería de interés evaluar la autofagia del RE.



## 10. BIBLIOGRFÍA

- Almanza, A., Carlesso, A., Chinthra, C., Creedican, S., Doultinos, D., Leuzzi, B., Luís, A., McCarthy, N., Montibeller, L., More, S., Papaioannou, A., Püschel, F., Sassano, M.L., Skoko, J., Agostinis, P., de Bellerocche, J., Eriksson, L.A., Fulda, S., Gorman, A.M., Healy, S., Kozlov, A., Muñoz-Pinedo, C., Rehm, M., Chevet, E., Samali, A., 2019. Endoplasmic reticulum stress signalling - from basic mechanisms to clinical applications. *FEBS J.* 286, 241–278. <https://doi.org/10.1111/febs.14608>
- Aparicio-Trejo, O.E., Tapia, E., Sánchez-Lozada, L.G., Pedraza-Chaverri, J., 2018. Mitochondrial bioenergetics, redox state, dynamics and turnover alterations in renal mass reduction models of chronic kidney diseases and their possible implications in the progression of this illness. *Pharmacol. Res.* 135, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.07.015>
- Bergeron, M., Gaffiero, P., & Thiéry, G., 1987. Segmental variations in the organization of the endoplasmic reticulum of the rat nephron. A stereomicroscopic study. *Cell Tissue Res.*, 247(1), 215–225. <https://doi.org/10.1007/BF00216564>
- Bhargava, P., Schnellmann, R.G., 2017. Mitochondrial energetics in the kidney. *Nat. Rev. Nephrol.* 13, 629–646. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.107>
- Choi, Y.A., Yoon, Y.H., Choi, K., Kwon, M., Goo, S.H., Cha, J.-S., Choi, M.-K., Lee, H.S., Song, I.-S., 2015. Enhanced oral bioavailability of morin administered in mixed micelle formulation with PluronicF127 and Tween80 in rats. *Biol. Pharm. Bull.* 38, 208–217. <https://doi.org/10.1248/bpb.b14-00508>
- Collu-Marchese, M., Shuen, M., Pauly, M., Saleem, A., Hood, D.A., 2015. The regulation of mitochondrial transcription factor A (Tfam) expression during skeletal muscle cell differentiation. *Biosci. Rep.* 35. <https://doi.org/10.1042/BSR20150073>
- Devi Sampath, P., Vijayaraghavan, K., 2007. Cardioprotective effect of alpha-mangostin, a xanthone derivative from mangosteen on tissue defense system against isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 21, 336–339. <https://doi.org/10.1002/jbt.20199>

- Diaz, F., Moraes, C.T., 2008. Mitochondrial Biogenesis and Turnover. *Cell Calcium* 44, 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.12.004>
- Duffy, E.A., Fitzgerald, W., Boyle, K., Rohatgi, R., 2018. Nephrotoxicity: Evidence in Patients Receiving Cisplatin Therapy. *Clin. J. Oncol. Nurs.* 22, 175–183. <https://doi.org/10.1188/18.CJON.175-183>
- Fang, Y., Su, T., Qiu, X., Mao, P., Xu, Y., Hu, Z., Zhang, Y., Zheng, X., Xie, P., Liu, Q., 2016. Protective effect of alpha-mangostin against oxidative stress induced-retinal cell death. *Sci. Rep.* 6, 21018. <https://doi.org/10.1038/srep21018>
- Fontecha-Barriuso, M., Martin-Sanchez, D., Martinez-Moreno, J.M., Monsalve, M., Ramos, A.M., Sanchez-Niño, M.D., Ruiz-Ortega, M., Ortiz, A., Sanz, A.B., 2020. The Role of PGC-1 $\alpha$  and Mitochondrial Biogenesis in Kidney Diseases. *Biomolecules* 10. <https://doi.org/10.3390/biom10020347>
- Fougeray, S., Pallet, N., 2015. Mechanisms and biological functions of autophagy in diseased and ageing kidneys. *Nat. Rev. Nephrol.* 11, 34–45. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2014.201>
- Fu, T., Li, H., Zhao, Y., Cai, E., Zhu, H., Li, P., Liu, J., 2018. Hepatoprotective effect of  $\alpha$ -mangostin against lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute liver failure in mice. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 106, 896–901. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.034>
- Galluzzi, L., Baehrecke, E.H., Ballabio, A., Boya, P., Bravo-San Pedro, J.M., Cecconi, F., Choi, A.M., Chu, C.T., Codogno, P., Colombo, M.I., Cuervo, A.M., Debnath, J., Deretic, V., Dikic, I., Eskelinen, E.-L., Fimia, G.M., Fulda, S., Gewirtz, D.A., Green, D.R., Hansen, M., Harper, J.W., Jäättelä, M., Johansen, T., Juhasz, G., Kimmelman, A.C., Kraft, C., Ktistakis, N.T., Kumar, S., Levine, B., Lopez-Otin, C., Madeo, F., Martens, S., Martinez, J., Melendez, A., Mizushima, N., Münz, C., Murphy, L.O., Penninger, J.M., Piacentini, M., Reggiori, F., Rubinsztein, D.C., Ryan, K.M., Santambrogio, L., Scorrano, L., Simon, A.K., Simon, H.-U., Simonsen, A., Tavernarakis, N., Tooze, S.A., Yoshimori, T., Yuan, J., Yue, Z., Zhong, Q., Kroemer, G., 2017. Molecular

- definitions of autophagy and related processes. *EMBO J.* 36, 1811–1836. <https://doi.org/10.15252/emboj.201796697>
- Glancy, B., & Balaban, R. S., 2012. Role of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> in the regulation of cellular energetics. *Biochemistry*, 51(14), 2959–2973. <https://doi.org/10.1021/bi2018909>
- Guo, Y., Ni, J., Chen, S., Bai, M., Lin, J., Ding, G., Zhang, Y., Sun, P., Jia, Z., Huang, S., Yang, L., Zhang, A., 2018. MicroRNA-709 Mediates Acute Tubular Injury through Effects on Mitochondrial Function. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 29, 449–461. <https://doi.org/10.1681/ASN.2017040381>
- Gutierrez-Orozco, F., Failla, M.L., 2013. Biological activities and bioavailability of mangosteen xanthenes: a critical review of the current evidence. *Nutrients* 5, 3163–3183. <https://doi.org/10.3390/nu5083163>
- Guzmán-Beltrán, S., Rubio-Badillo, M.Á., Juárez, E., Hernández-Sánchez, F., Torres, M., 2016. Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and  $\alpha$ -mangostin inhibit the growth of *Mycobacterium tuberculosis* by inducing autophagy. *Int. Immunopharmacol.* 31, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.12.027>
- Han, S. Y., You, B. H., Kim, Y. C., Chin, Y. W., & Choi, Y. H., 2015. Dose-Independent ADME Properties and Tentative Identification of Metabolites of  $\alpha$ -Mangostin from *Garcinia mangostana* in Mice by Automated Microsampling and UPLC-MS/MS Methods. *PloS one*, 10(7), e0131587. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131587>
- Hull, R.N., Cherry, W.R., Weaver, G.W., 1976. The origin and characteristics of a pig kidney cell strain, LLC-PK. *In Vitro* 12, 670–677.
- Inagi, R., Ishimoto, Y., Nangaku, M., 2014. Proteostasis in endoplasmic reticulum--new mechanisms in kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* 10, 369–378. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2014.67>
- Ishimoto, Y., Inagi, R., 2016. Mitochondria: a therapeutic target in acute kidney injury. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 31, 1062–1069. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfv317>
- Jung, H.-A., Su, B.-N., Keller, W.J., Mehta, R.G., Kinghorn, A.D., 2006. Antioxidant xanthenes from the pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen). *J. Agric. Food Chem.* 54, 2077–2082. <https://doi.org/10.1021/jf052649z>

- Kaufman, R.J., Malhotra, J.D., 2014. Calcium trafficking integrates endoplasmic reticulum function with mitochondrial bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta* 1843, 2233–2239. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.03.022>
- Kaushal, G.P., Shah, S.V., 2016. Autophagy in acute kidney injury. *Kidney Int.* 89, 779–791. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2015.11.021>
- Kim, S.-J., Hong, E.-H., Lee, B.-R., Park, M.-H., Kim, J.-W., Pyun, A.-R., Kim, Y.-J., Chang, S.-Y., Chin, Y.-W., Ko, H.-J., 2012.  $\alpha$ -Mangostin Reduced ER Stress-mediated Tumor Growth through Autophagy Activation. *Immune Netw.* 12, 253–260. <https://doi.org/10.4110/in.2012.12.6.253>
- Kröning, R., Katz, D., Lichtenstein, A.K., Nagami, G.T., 1999. Differential effects of cisplatin in proximal and distal renal tubule epithelial cell lines. *Br. J. Cancer* 79, 293–299. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690047>
- Lee, D., Choi, Y.O., Kim, K.H., Chin, Y.-W., Namgung, H., Yamabe, N., Jung, K., 2016. Protective effect of  $\alpha$ -mangostin against iodixanol-induced apoptotic damage in LLC-PK1 cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 26, 3806–3809. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.05.031>
- Liu, T., Duan, W., Nizigiyimana, P., Gao, L., Liao, Z., Xu, B., Liu, L., Lei, M., 2018. Alpha-mangostin attenuates diabetic nephropathy in association with suppression of acid sphingomyelinase and endoplasmic reticulum stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 496, 394–400. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.01.040>
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Mahabusarakam, W., Wiriyaichitra, P., Taylor, W.C., 1987. Chemical Constituents of *Garcinia mangostana*. *J. Nat. Prod.* 50, 474–478. <https://doi.org/10.1021/np50051a021>
- Malhi, H., Kaufman, R.J., 2011. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J. Hepatol.* 54, 795–809. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.11.005>
- Mandic, A., Hansson, J., Linder, S., Shoshan, M.C., 2003. Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. *J. Biol. Chem.* 278, 9100–9106. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210284200>

- Manohar, S., Leung, N., 2018. Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature. *J. Nephrol.* 31, 15–25. <https://doi.org/10.1007/s40620-017-0392-z>
- Marchi, S., Patergnani, S., Pinton, P., 2014. The endoplasmic reticulum-mitochondria connection: one touch, multiple functions. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 461–469. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2013.10.015>
- Márquez-Valadez, B., Lugo-Huitrón, R., Valdivia-Cerda, V., Miranda-Ramírez, L.R., Pérez-De La Cruz, V., González-Cuahutencos, O., Rivero-Cruz, I., Mata, R., Santamaría, A., Pedraza-Chaverri, J., 2009. The natural xanthone alpha-mangostin reduces oxidative damage in rat brain tissue. *Nutr. Neurosci.* 12, 35–42. <https://doi.org/10.1179/147683009X388850>
- Martínez, A., Galano, A., Vargas, R., 2011. Free radical scavenger properties of  $\alpha$ -mangostin: thermodynamics and kinetics of HAT and RAF mechanisms. *J. Phys. Chem. B* 115, 12591–12598. <https://doi.org/10.1021/jp205496u>
- Nava Catorce, M., Acero, G., Pedraza-Chaverri, J., Fragoso, G., Govezensky, T., Gevorkian, G., 2016. Alpha-mangostin attenuates brain inflammation induced by peripheral lipopolysaccharide administration in C57BL/6J mice. *J. Neuroimmunol.* 297, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.05.008>
- Nielsen, R., Birn, H., Moestrup, S.K., Nielsen, M., Verroust, P., Christensen, E.I., 1998. Characterization of a kidney proximal tubule cell line, LLC-PK1, expressing endocytotic active megalin. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 9, 1767–1776.
- Ortega-Domínguez, B., Aparicio-Trejo, O.E., García-Arroyo, F.E., León-Contreras, J.C., Tapia, E., Molina-Jijón, E., Hernández-Pando, R., Sánchez-Lozada, L.G., Barrera-Oviedo, D., Pedraza-Chaverri, J., 2017. Curcumin prevents cisplatin-induced renal alterations in mitochondrial bioenergetics and dynamic. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 107, 373–385. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.07.018>
- Ovalle-Magallanes, B., Eugenio-Pérez, D., Pedraza-Chaverri, J., 2017. Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.): A comprehensive update. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 109, 102–122. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.08.021>

- Pan, H., Chen, J., Shen, K., Wang, X., Wang, P., Fu, G., Meng, H., Wang, Y., Jin, B., 2015. Mitochondrial modulation by Epigallocatechin 3-Gallate ameliorates cisplatin induced renal injury through decreasing oxidative/nitrative stress, inflammation and NF- $\kappa$ B in mice. *PloS One* 10, e0124775. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124775>
- Patricia Moreno-Londoño, A., Bello-Alvarez, C., Pedraza-Chaverri, J., 2017. Isoliquiritigenin pretreatment attenuates cisplatin induced proximal tubular cells (LLC-PK1) death and enhances the toxicity induced by this drug in bladder cancer T24 cell line. *Food Chem. Toxicol.* 109, 143–154. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.08.047>
- Pedraza-Chaverri, J., Cárdenas-Rodríguez, N., Orozco-Ibarra, M., Pérez-Rojas, J.M., 2008. Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 46, 3227–3239. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.07.024>
- Pedraza-Chaverri, J., Reyes-Fermín, L.M., Nolasco-Amaya, E.G., Orozco-Ibarra, M., Medina-Campos, O.N., González-Cuahutencos, O., Rivero-Cruz, I., Mata, R., 2009. ROS scavenging capacity and neuroprotective effect of alpha-mangostin against 3-nitropropionic acid in cerebellar granule neurons. *Exp. Toxicol. Pathol. Off. J. Ges. Toxikol. Pathol.* 61, 491–501. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2008.11.002>
- Pérez-Rojas, J.M., Cruz, C., García-López, P., Sánchez-González, D.J., Martínez-Martínez, C.M., Ceballos, G., Espinosa, M., Meléndez-Zajgla, J., Pedraza-Chaverri, J., 2009. Renoprotection by alpha-Mangostin is related to the attenuation in renal oxidative/nitrosative stress induced by cisplatin nephrotoxicity. *Free Radic. Res.* 43, 1122–1132.
- Peyrou, M., Cribb, A.E., 2007. Effect of endoplasmic reticulum stress preconditioning on cytotoxicity of clinically relevant nephrotoxins in renal cell lines. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 21, 878–886. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.03.001>
- Ralto, K.M., Parikh, S.M., 2016. Mitochondria in Acute Kidney Injury. *Semin. Nephrol.* 36, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2016.01.005>

- Romero-Calvo, I., Ocón, B., Martínez-Moya, P., Suárez, M.D., Zarzuelo, A., Martínez-Augustin, O., de Medina, F.S., 2010. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal. Biochem.* 401, 318–320. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.02.036>
- Rovetta, F., Stacchiotti, A., Consiglio, A., Cadei, M., Grigolato, P.G., Lavazza, A., Rezzani, R., Aleo, M.F., 2012. ER signaling regulation drives the switch between autophagy and apoptosis in NRK-52E cells exposed to cisplatin. *Exp. Cell Res.* 318, 238–250. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.11.008>
- Samali, A., Fitzgerald, U., Deegan, S., & Gupta, S., 2010. Methods for monitoring endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. *Int. J. Cell Biol.*, 2010, 830307. <https://doi.org/10.1155/2010/830307>
- Sampath, P.D., Kannan, V., 2009. Mitigation of mitochondrial dysfunction and regulation of eNOS expression during experimental myocardial necrosis by alpha-mangostin, a xanthonic derivative from *Garcinia mangostana*. *Drug Chem. Toxicol.* 32, 344–352. <https://doi.org/10.1080/01480540903159210>
- Sánchez-Pérez, Y., Morales-Bárceñas, R., García-Cuellar, C.M., López-Marure, R., Calderon-Oliver, M., Pedraza-Chaverri, J., Chirino, Y.I., 2010. The alpha-mangostin prevention on cisplatin-induced apoptotic death in LLC-PK1 cells is associated to an inhibition of ROS production and p53 induction. *Chem. Biol. Interact.* 188, 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.06.014>
- Sanchis-Gomar, F., García-Giménez, J.L., Gómez-Cabrera, M.C., Pallardó, F.V., 2014. Mitochondrial biogenesis in health and disease. Molecular and therapeutic approaches. *Curr. Pharm. Des.* 20, 5619–5633.
- Sancho-Martínez, S.M., Prieto-García, L., Prieto, M., López-Novoa, J.M., López-Hernández, F.J., 2012. Subcellular targets of cisplatin cytotoxicity: an integrated view. *Pharmacol. Ther.* 136, 35–55. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.07.003>
- Signes, A., & Fernandez-Vizarra, E., 2018. Assembly of mammalian oxidative phosphorylation complexes I-V and supercomplexes. *Essays Biochem.*, 62(3), 255–270. <https://doi.org/10.1042/EBC20170098>

- Schindler, A.J., Schekman, R., 2009. In vitro reconstitution of ER-stress induced ATF6 transport in COPII vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 17775–17780. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910342106>
- Taher, M., Mohamed Amiroudine, M. Z., Tengku Zakaria, T. M., Susanti, D., Ichwan, S. J., Kaderi, M. A., Ahmed, Q. U., & Zakaria, Z. A., 2015.  $\alpha$ -Mangostin Improves Glucose Uptake and Inhibits Adipocytes Differentiation in 3T3-L1 Cells via PPAR $\gamma$ , GLUT4, and Leptin Expressions. *eCAM*, 2015, 740238. <https://doi.org/10.1155/2015/740238>
- Tsai, S.-Y., Chung, P.-C., Owaga, E.E., Tsai, I.-J., Wang, P.-Y., Tsai, J.-I., Yeh, T.-S., Hsieh, R.-H., 2016. Alpha-mangostin from mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.) pericarp extract reduces high fat-diet induced hepatic steatosis in rats by regulating mitochondria function and apoptosis. *Nutr. Metab.* 13, 88. <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0148-0>
- Wang, Y., Tang, C., Cai, J., Chen, G., Zhang, D., Zhang, Z., Dong, Z., 2018. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is activated in cisplatin nephrotoxicity to protect against kidney injury. *Cell Death Dis.* 9, 1113. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1152-2>
- Wathoni, N., Rusdin, A., Motoyama, K., Joni, I.M., Lesmana, R., Muchtaridi, M., 2020. Nanoparticle Drug Delivery Systems for  $\alpha$ -Mangostin. *Nanotechnol. Sci. Appl.* 13, 23–36. <https://doi.org/10.2147/NSA.S243017>
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R.C., Spiegelman, B.M., 1999. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98, 115–124. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80611-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80611-X)
- Yan, M., Shu, S., Guo, C., Tang, C., & Dong, Z., 2018. Endoplasmic reticulum stress in ischemic and nephrotoxic acute kidney injury. *Ann. Med.*, 50(5), 381–390. <https://doi.org/10.1080/07853890.2018.1489142>
- Yan, X.-T., Sun, Y.-S., Ren, S., Zhao, L.-C., Liu, W.-C., Chen, C., Wang, Z., Li, W., 2018. Dietary  $\alpha$ -Mangostin Provides Protective Effects against Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Mice via Akt/mTOR-Mediated



- Inhibition of Autophagy and Apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19051335>
- Yan, X.-Y., Qu, X.-Z., Xu, L., Yu, S.-H., Tian, R., Zhong, X.-R., Sun, L.-K., Su, J., 2020. Insight into the role of p62 in the cisplatin resistant mechanisms of ovarian cancer. *Cancer Cell Int.* 20, 128. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01196-w>
- Yang C, Kaushal V, Shah SV, Kaushal GP. 2008. Autophagy is associated with apoptosis in cisplatin injury to renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 294(4):F777-87. doi: 10.1152/ajprenal.00590.2007. Yang, Y., Liu, H., Liu, F., Dong, Z., 2014. Mitochondrial dysregulation and protection in cisplatin nephrotoxicity. *Arch. Toxicol.* 88, 1249–1256. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1239-1>
- Yu, X., Meng, X., Xu, M., Zhang, X., Zhang, Y., Ding, G., Huang, S., Zhang, A., Jia, Z., 2018. Celastrol ameliorates cisplatin nephrotoxicity by inhibiting NF- $\kappa$ B and improving mitochondrial function. *EBioMedicine* 36, 266–280. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.09.031>
- Zhang, L., Cooper, A.J.L., Krasnikov, B.F., Xu, H., Bubber, P., Pinto, J.T., Gibson, G.E., Hanigan, M.H., 2006. Cisplatin-induced toxicity is associated with platinum deposition in mouse kidney mitochondria in vivo and with selective inactivation of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in LLC-PK1 cells. *Biochemistry* 45, 8959–8971. <https://doi.org/10.1021/bi060027g>
- Zhao, C., Chen, Z., Qi, J., Duan, S., Huang, Z., Zhang, C., Wu, L., Zeng, M., Zhang, B., Wang, N., Mao, H., Zhang, A., Xing, C., Yuan, Y., 2017. Drp1-dependent mitophagy protects against cisplatin-induced apoptosis of renal tubular epithelial cells by improving mitochondrial function. *Oncotarget* 8, 20988–21000. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15470>
- Zhao, Y., Tang, G., Tang, Q., Zhang, J., Hou, Y., Cai, E., Liu, S., Lei, D., Zhang, L., & Wang, S., 2016. A Method of Effectively Improved  $\alpha$ -Mangostin Bioavailability. *Eur. J Drug Metab Pharmacokinetics*, 41(5), 605–613. <https://doi.org/10.1007/s13318-015-0283-4>
- Zhou, J., Kang, Y., Chen, L., Wang, H., Liu, J., Zeng, S., & Yu, L., 2020. The Drug-Resistance Mechanisms of Five Platinum-Based Antitumor Agents. *Front. Pharmacol.*, 11, 343. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00343>

Zuk, A., Bonventre, J.V., 2016. Acute Kidney Injury. *Annu. Rev. Med.* 67, 293–307.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-med-050214-013407>

## 11. ARTÍCULOS PUBLICADOS



Article

### The Protective Effect of Alpha-Mangostin against Cisplatin-Induced Cell Death in LLC-PK1 Cells is Associated to Mitochondrial Function Preservation

Laura María Reyes-Fermin <sup>1</sup>, Sabino Hazael Avila-Rojas <sup>1</sup>, Omar Emiliano Aparicio-Trejo <sup>1</sup>, Edilia Tapia <sup>2</sup>, Isabel Rivero <sup>3</sup> and José Pedraza-Chaverri <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, Faculty of Chemistry, National Autonomous University of Mexico (UNAM), Mexico City 04510, Mexico; laura\_refe@yahoo.com.mx (L.M.R.-E.); shaggy\_goose@hotmail.com (S.H.A.-R.); emilianoaparcio91@gmail.com (O.E.A.-T.)

<sup>2</sup> Department of Nephrology and Laboratory of Renal Pathophysiology, National Institute of Cardiology "Ignacio Chávez", Mexico City 14080, Mexico; ediliatapia@hotmail.com

<sup>3</sup> Department of Pharmacy, Faculty of Chemistry, UNAM, Mexico City 04510, Mexico; riveroic@yahoo.com.mx

\* Correspondence: pedraza@unam.mx; Tel/Fax: +52-55-5622-3878

Received: 12 April 2019; Accepted: 13 May 2019; Published: 15 May 2019



**Abstract:** Cis-dichlorodiammineplatinum II (CDDP) is a chemotherapeutic agent that induces nephrotoxicity by different mechanisms, including oxidative stress, mitochondrial dysfunction, autophagy, and endoplasmic reticulum stress. This study aimed to evaluate if the protective effects of the antioxidant alpha-mangostin ( $\alpha$ M) in CDDP-induced damage in proximal tubule Lilly laboratory culture porcine kidney (LLC-PK1) cells, are related to mitochondrial function preservation. It was found that  $\alpha$ M co-incubation prevented CDDP-induced cell death. Furthermore,  $\alpha$ M prevented the CDDP-induced decrease in cell respiratory states, in the maximum capacity of the electron transfer system (E) and in the respiration associated to oxidative phosphorylation (OXPHOS). CDDP also decreased the protein levels of voltage dependence anion channel (VDAC) and mitochondrial complex subunits, which together with the reduction in E, the mitofusin 2 decrease and the mitochondrial network fragmentation observed by MitoTracker Green, suggest the mitochondrial morphology alteration and the decrease in mitochondrial mass induced by CDDP. CDDP also induced the reduction in mitochondrial biogenesis observed by transcription factor A, mitochondria (TFAM) decreased protein-level and the increase in mitophagy. All these changes were prevented by  $\alpha$ M. Taken together, our results imply that  $\alpha$ M's protective effects in CDDP-induced toxicity in LLC-PK1 cells are associated to mitochondrial function preservation.

**Keywords:** alpha-mangostin; cisplatin; nephrotoxicity; mitochondria function; mitophagy

#### 1. Introduction

Cis-dichlorodiammineplatinum II (CDDP) is a platinum compound frequently used in many types of cancers [1,2]. However, the main side-effect of CDDP is its nephrotoxicity, especially in proximal tubule epithelial cells. It is estimated that 20 to 30% of patients treated with CDDP developed transient episodes of acute kidney injury, which can progress to chronic kidney disease, depending on the dose and individual pharmacokinetics [2]. The CDDP-toxicity mechanisms involve DNA damage, oxidative stress, mitochondrial damage, endoplasmic reticulum (ER) stress, autophagy, and apoptotic cell death [3,4].

In recent years, the use of biomolecules with antioxidant activity has been widely studied to mitigate the nephrotoxic effects induced by CDDP [5]. Alpha-mangostin ( $\alpha$ M), a bioactive compound with direct antioxidant properties that can be extracted from the *Garcinia mangostana* tree, has been broadly used in



## Review

## Natural antioxidants' effects on endoplasmic reticulum stress-related diseases

Laura María Reyes-Fermín, Omar Emiliano Aparicio-Trejo, Sabino Hazael Avila-Rojas, Tania Gómez-Sierra, Elena Martínez-Klimova, José Pedraza-Chaverri\*

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



## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
ER stress  
Oxidative stress  
Natural antioxidants  
Diseases

## ABSTRACT

Endoplasmic reticulum (ER) stress is a normal molecular process induced by the over-accumulation of misfolded or unfolded proteins. ER stress induces the unfolded protein response (UPR), which reduces global protein synthesis, increases ER capacity and protein degradation, to restart ER homeostasis, allowing cell survival. However, the over-induction of UPR can also trigger inflammatory processes, tissue damage and cell death. ER stress is involved in several pathologies, like endothelial dysfunction, diabetes and heart, liver, kidney or neurological diseases. Although the progression of these diseases is the result of several pathological mechanisms, oxidative stress has been widely related to these pathologies. Moreover, ER stress can establish a progressive pathological cycle with oxidative stress. Therefore, the use of natural antioxidants, able to modulate both oxidative and ER stress, can be a new strategy to mitigate these diseases. This review is focused on the effects of natural antioxidant compounds on ER stress in endothelial dysfunction, diabetes and heart, liver, kidney or neurological diseases.

## 1. Introduction

The endoplasmic reticulum (ER) is the largest membrane-bound organelle of the cell. It is highly dynamic and has several roles in cellular function, including: calcium homeostasis, synthesis of lipids and their distribution, as well as synthesis, folding, modification and transport of proteins (Almanza et al., 2019; Bravo et al., 2013; Malhi and Kaufman, 2011). In order to become properly folded and post-translationally modified (e.g. disulfide bond formation), proteins have to enter the ER lumen (as encoded by a signal sequence), to be processed by chaperones and folding proteins. Afterwards, the proteins are secreted, packed and transported to their final destinations. Although this process is tightly regulated, some proteins might get misfolded, forming aggregates that are degraded by the ER-associated degradation (ERAD) pathway as part of the unfolded protein response (UPR) (Malhi and Kaufman, 2011). Several processes or stimuli such as ischemia, hypo- and hyperglycemia, exposure to heavy metals, chemotherapeutic agents or antibiotics, can disrupt ER homeostasis, triggering a condition denominated as "ER stress" (Almanza et al., 2019; Bravo et al., 2013). In response to ER stress, UPR signaling is activated to restore

homeostasis, triggering in turn, general protein synthesis decrease, misfolded protein degradation by ERAD, as well as increased chaperones content and function (Malhi and Kaufman, 2011). Furthermore, the expression of genes involved in the antioxidant response, autophagy and apoptosis, is also induced (Dufey et al., 2014; Song et al., 2017; Urta et al., 2013). UPR acts as a protective mechanism against moderate ER stress levels. However, when severe ER stress is induced, the UPR response can be overwhelmed, triggering ER stress-apoptosis signaling (Almanza et al., 2019; Song et al., 2017; Vacaru et al., 2014).

In the last decades, ER stress has been implicated in several diseases, like endothelial dysfunction, diabetes and heart, liver, kidney or neurological diseases. Therefore, ER stress prevention can be an important therapeutic target to mitigate these diseases (Almanza et al., 2019; Dufey et al., 2014; Maamoun et al., 2019; Malhi and Kaufman, 2011). Although the progression of these diseases is the result of several pathological mechanisms, oxidative stress has been widely related to them, furthermore, the relationship between oxidative stress and ER stress has been established directly (by oxidative stress-induced protein misfolding) and indirectly (by pathological redox signaling and mitochondrial damage). It is known that oxidative stress participates in

\* Corresponding author.

Email addresses: [laura\\_mfe@yahoo.com.mx](mailto:laura_mfe@yahoo.com.mx) (L.M. Reyes-Fermín), [emilianoaparcio91@gmail.com](mailto:emilianoaparcio91@gmail.com) (O.E. Aparicio-Trejo), [shaggy\\_goose@hotmail.com](mailto:shaggy_goose@hotmail.com) (S.H. Avila-Rojas), [taniag21@gmail.com](mailto:taniag21@gmail.com) (T. Gómez-Sierra), [eklimova@ic.unam.mx](mailto:eklimova@ic.unam.mx) (E. Martínez-Klimova), [pedraza@unam.mx](mailto:pedraza@unam.mx) (J. Pedraza-Chaverri).

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111229>

Received 25 October 2019; Received in revised form 20 February 2020; Accepted 22 February 2020

Available online 24 February 2020

0278-6915/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.