



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

TESIS:

“Efecto de la restricción y suplementación crónica
de hierro en la función mitocondrial y el estrés
oxidante en riñones de ratas con diabetes
experimental”

Para obtener el grado de:
Maestro en Ciencias en Biología Experimental

Presenta:

Q.F.B. Donovan Javier Peña Montes

Director de Tesis:

D.C. Alfredo Saavedra Molina

Morelia, Mich. enero 2019

ÍNDICE

RESUMEN	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1 Diabetes Mellitus	10
1.2 Complicaciones de la diabetes	11
1.3 Enfermedad renal diabética	11
1.3.1 Vías hemodinámicas	12
1.3.2 Vías metabólicas	13
1.4 Disfuncionalidad mitocondrial en la enfermedad renal diabética.....	14
1.4.1 Componentes de la cadena respiratoria mitocondrial.....	15
1.4.2 Especies de reactivas de oxígeno	17
1.4.3 Producción mitocondrial de especies reactivas de oxígeno en la enfermedad diabética renal.....	17
1.4.4 Sistemas antioxidantes.....	19
1.5 Hierro	22
1.5.1 Restricción de hierro.....	24
2. JUSTIFICACIÓN	26
3. HIPÓTESIS	26
4. OBJETIVOS	27
4.1. Objetivo general	27
4.2. Objetivos particulares.....	27
5. MATERIALES Y METODOS	28
5.1. Animales	28
5.2. Diseño experimental.....	28
5.3. Inducción de la diabetes experimental	28

5.4.	Formulación de las dietas	29
5.6.	Determinación de creatinina y urea sérica	29
5.7.	Determinación de hierro en suero	29
5.8.	Aislamiento de mitocondrias de riñones.....	30
5.9.	Determinación de la respiración mitocondrial.....	30
5.10.	Determinación del potencial de membrana mitocondrial	30
5.11.	Determinación de la actividad de los complejos de la cadena transportadora de electrones	31
5.11.1.	Complejo I, NADH deshidrogenasa.....	31
5.11.2.	Complejo II, Succinato 2,6 DCCIP oxidorreductasa	31
5.11.3.	Complejos II+III, Succinato-citocromo c oxidorreductasa	32
5.11.4.	Complejo IV, Citocromo c oxidasa	32
5.12.	Determinación de especies reactivas de oxígeno.....	32
5.13.	Determinación de la actividad de la Superóxido Dismutasa Mitocondrial	32
5.14.	Determinación de los biomarcadores de estrés oxidante	33
5.14.1.	Peroxidación de lípidos	33
5.14.2.	Carbonilación de proteínas.....	33
5.15.	Determinación de glutatión	34
5.16.	Determinación de hierro <i>no</i> -hémico mitocondrial.....	34
5.17.	Inmunodetección, Western Blot	35
5.18.	Análisis estadístico	35
6.	RESULTADOS.....	35
6.1.	Efecto de la restricción y suplementación de hierro en la dieta en los parámetros fisiológicos	35

6.2. Efecto de la restricción y suplementación de hierro en la dieta en la respiración mitocondrial en riñones	38
6.3. Efecto de la restricción y suplementación en el potencial de membrana mitocondrial en riñones.....	40
6.4. Efecto de la restricción y suplementación de hierro en la dieta en la actividad de los complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial en riñones	41
6.5. Efecto de la restricción y suplementación de hierro en la dieta en la producción de especies reactivas de oxígeno en mitocondrias de riñones	43
6.6. Efecto de la diabetes experimental, la restricción y suplementación de hierro en los niveles de hierro <i>no</i> -hémico mitocondrial de riñones	44
6.7. Efecto de la restricción y suplementación de hierro en la dieta en la actividad y los niveles de expresión de la superóxido dismutasa mitocondrial en riñones	45
6.8. Efecto de la restricción y suplementación de hierro en la dieta en los niveles de peroxidación de lípidos y carbonilación de proteínas	46
6.9. Efecto de la restricción y suplementación de hierro en la dieta en los niveles glutatión total, oxidado y reducido en mitocondrias de riñones.....	47
7. DISCUSIÓN	49
8. CONCLUSIÓN	53
9. PERSPECTIVAS.....	53
10. REFERENCIAS.....	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación etiológica de la diabetes mellitus	10
Tabla 2. Efecto de la restricción y suplementación de hierro en los parámetros zoométricos y fisiológicos.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la patogénesis de la ERD.....	14
Figura 2. Estrés oxidante y el sistema de defensa antioxidante.....	21
Figura 3. Efecto de la restricción y suplementación de hierro en los niveles glucosa y peso corporal.....	37
Figura 4. Efecto de la restricción y suplementación de hierro en la respiración mitocondrial en mitocondrias de ambos riñones..	39
Figura 5. Efecto de la restricción y suplementación de hierro en el potencial de membrana mitocondrial de ambos riñones.	40
Figura 6. Efecto de la restricción y suplementación de hierro en la actividad de los complejos de la CTE..	42
Figura 7. Efecto en la producción de especies reactivas de oxígeno mitocondrial	43
Figura 8. Efecto de la diabetes experimental y la restricción o suplementación de hierro en los niveles de hierro mitocondrial	44
Figura 9. Efecto de la restricción y suplementación de hierro en la actividad y expresión de la SOD2..	45
Figura 10. Efecto de la restricción y suplementación de hierro en el estrés oxidativo mitocondria.....	46
Figura 11. Efecto de la restricción y la suplementación de hierro en los niveles de glutatión en mitocondrias	48

Bajo las condiciones más rigurosamente controladas de presión, temperatura, volumen, humedad y otras variables, un organismo hará siempre lo que le dé la gana”

Ley de Harvard.

A mi madre

Agradecimientos Institucionales

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y en particular al Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas y al Laboratorio de Bioquímica.

A la Universidad de Colima y en particular al Centro Universitario de Investigaciones Biomédicas.

Al Instituto de Investigaciones en Metalurgia y Materiales, en particular al Laboratorio de Molienda mecánica y Termo-gravimetría

Al Centro de Investigaciones Biomédicas de Michoacán-IMSS y en particular al Laboratorio de Neurofisiología Experimental.

Agradecimientos personales

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia por el apoyo incondicional. Al Dr. Alfredo Saavedra Molina por darme el espacio, la invitación y la oportunidad para desarrollar mi proyecto de maestría. Al técnico del laboratorio, Mónica Clemente Guerrero, por apoyarme. Así como, a los miembros de mi comité tutorial: Dr. Christian Cortés Rojo, Dra. Rocío Montoya Pérez, Dr. Jesús Campos García y al Dr. Rafael Salgado Garciglia, por el apoyo y el tiempo. A los Dres. Xóchitl Trujillo, Mónica Ríos y Miguel Huerta, así como a la M.C. Yolitzzy Cardenas de la Universidad de Colima. Finalmente, a mis compañeros de laboratorio: Claudia, Cristian, Manuel y a Maribel por *le mot juste*. A mis compañeros de generación de la MCBE Arturo, Alejandra G., Alejandra H, Melissa, Edgar, Eridani, Bricia.

RESUMEN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad de origen multifactorial y se caracteriza por incremento de glucosa en sangre (hiperglucemia) de manera crónica. La disfuncionalidad mitocondrial juega un papel importante en el desarrollo y patogénesis de la ERD. Por otra parte, el Fe desempeña un papel fundamental para el mantenimiento de las funciones celulares. Sin embargo, el exceso de Fe puede generar daños vía ERO en diferentes tejidos. No obstante, se desconoce la participación de la mitocondria en la relación entre los niveles de Fe y el desarrollo de ERD. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la restricción y la suplementación crónica de hierro en la dieta en la función y el estrés oxidante mitocondriales en riñones utilizando ratas Wistar macho con diabetes experimental. Ratas de 2 meses de edad con o sin diabetes experimental (STZ, 45 mg/Kg de masa corporal) fueron divididas en seis grupos y tratadas con dietas bajas en Fe (3 mg de Fe/Kg de alimento) o suplementadas con Fe (dieta estándar + 3 mg de Fe/Kg de MC) durante 8 semanas. El grupo diabético mostró un incremento de 2.5 del contenido de hierro mitocondrial comparado con el grupo control. La restricción de hierro crónica restaura la actividad de los complejos de la CTE y disminuye la peroxidación de lípidos, carbonilación de proteínas en un ≈ 45 y $\approx 60\%$, respectivamente, asimismo una disminución del $\approx 40\%$ en la producción de ERO y 2 veces menor de glutatión oxidado, así como, un incremento en la actividad y expresión de la SOD2, comparado con el grupo diabético. Mientras que la suplementación crónica de hierro incrementa los daños oxidantes. En conjunto, estos resultados sugieren que la DM experimental incrementa los niveles de Fe y daños oxidantes mitocondriales e induce disfunción mitocondrial, lo cual puede ser prevenido por la restricción de Fe en la dieta.

Palabras clave: Diabetes mellitus, estrés oxidante, mitocondria, restricción de hierro, hierro.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a multifactorial disease, characterized by a chronic increment in blood glucose (hyperglycemia). In parallel with the growing DM pandemic, there is an increasing in DM complication, such as diabetic kidney disease (DKD). On the other hand, iron plays an important role in all organism for the maintaining of the physiological homeostasis. However, in diabetes has been reported a disruption of iron metabolism leading to an iron accumulation in kidney. While iron reduction contributes to improving DKD by decreasing oxidative stress in the kidneys, however, the role of mitochondria in the course of iron restriction in the DKD is poorly studied. The aim of this study was to evaluate the effect of chronic iron restriction in the diet, and chronic iron supplementation booth in mitochondrial function and oxidative stress in kidneys mitochondria employing male Wistar rat with experimental diabetes. Two-old months rats with or without diabetes (STZ, 45 mg/Kg of BW) were employed. Rats were divided in six groups and treated with low iron diet (3 mg of Fe/Kg of chow) or supplemented with iron (standard normal diet + 3 mg of Fe/Kg of BW) for 8 weeks. Experimental diabetes mellitus with STZ increase non-heme iron content in kidney mitochondria and chronic iron restriction restores the complexes electron transport chain (ETC) activities, and decreases lipid-peroxidation and protein carbonylation ≈ 45 and $\approx 60\%$, respectively. As well, a $\approx 40\%$ decrease in mitochondrial ROS production and a 2 times decrement of GSSG, as well an increased in SOD2 activity and expression compared with the diabetic group. In contrast, chronic iron supplementation increases the oxidative damages. Taken together, these results suggest that experimental DM increases mitochondrial iron, and iron restriction in the diet restores mitochondrial functionality and prevents mitochondrial oxidative damage in rat kidney.

Keywords: Diabetes mellitus, oxidative stress, mitochondria, iron restriction, iron.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Diabetes Mellitus

La diabetes mellitus (DM) es un desorden metabólico heterogéneo caracterizado por la presencia de hiperglucemia debido a perturbaciones en la secreción de insulina, defectos en las acciones de la insulina o ambos (Punthakee *et al.*, 2018). La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a la diabetes mellitus en 4 grandes grupos: diabetes tipo 1 (DM1), diabetes tipo 2 (DM2), diabetes gestacional (DG) y otros tipos específicos de diabetes (tabla 1) (OMS, 2017). La hiperglucemia crónica de la diabetes se asocia con complicaciones a largo plazo que afectan a diversos órganos y tejidos como los ojos, nervios, riñones, hígado y corazón (Punthakee *et al.*, 2018). Además de la hiperglucemia, la diabetes se caracteriza por la desregulación del medio metabólico como la hiperlipidemia, hipoinsulinemia en el caso de DM1 mal controlada, así como hiperinsulinemia y resistencia a la insulina en la DM2. Asimismo, se presenta un incremento de la concentración de citocinas circulantes, productos avanzados de glucosilación (PAG) y estrés oxidante sistémico.

Tabla 1. Clasificación etiológica de la diabetes mellitus (OMS, 2017; Punthakee *et al.*, 2018)

Diabetes tipo 1, engloba la diabetes que es principalmente el resultado de la destrucción de las células beta pancreáticas con una deficiencia de insulina, propensa a la cetoacidosis. Esta forma incluye casos debidos a proceso autoinmunes y aquellos a los cuales se desconoce la etiología de la destrucción de las células beta pancreáticas.
Diabetes tipo 2, puede variar desde una predominante resistencia a la insulina con una deficiencia relativa de insulina hasta defectos predominantes en la secreción de la insulina con resistencia a la insulina. La cetoacidosis no es común.
Diabetes gestacional, se refiere a intolerancia a la glucosa que comienza o es reconocida por primera vez durante el embarazo.
Otros tipos específicos, incluye una amplia variedad condiciones poco comunes, principalmente formas genéticas específicas de diabetes o diabetes asociada con otras enfermedades o por el uso de ciertos fármacos.

1.2 Complicaciones de la diabetes

Todas las formas de diabetes se caracterizan por hiperglucemia crónica y el desarrollo acelerado de la enfermedad macrovascular aterosclerótica que afecta las arterias que suministran sangre al corazón, cerebro y extremidades, e incrementar el riesgo de infarto al miocardio y amputaciones. Además, la diabetes se asocia con el desarrollo de patologías microvasculares específicas de la diabetes, en los nervios periféricos, retina, y en los riñones. Como consecuencia de estas patologías microvasculares, la diabetes es causal predominantemente de ceguera, neuropatías debilitantes y enfermedad renal terminal (Brownlee, 2001; Punthakee et al., 2018).

1.3 Enfermedad renal diabética

Los riñones desarrollan funciones críticas en el organismo, como la homeostasis de fluidos y la eliminación de residuos metabólicos a través de la filtración sanguínea y la excreción/absorción de solutos y agua. La nefrona es la unidad funcional de los riñones, comprende dos partes principales: el corpúsculo renal y los túbulos renales. El ultrafiltrado es modificado secuencialmente en los glomérulos, e ingresa a los túbulos a través de reabsorción y secreción selectiva de solutos (Hebert *et al.*, 2001). En general, el túbulo se encuentra dividido de manera amplia en: el segmento del túbulo proximal es responsable de la reabsorción de la masa del filtrado; mientras que, en el segmento intermedio, la orina es concentrada. Por otra parte, en los segmentos de los túbulos distales se realiza un ajuste del equilibrio ácido-base. Este proceso es vital para la regulación en los niveles de electrolitos, osmolaridad, presión sanguínea, y el balance del pH y de hecho, trastornos en las funciones de la nefrona da lugar a una amplia variedad de enfermedades (Dodd y Davidson, 2016). La enfermedad renal diabética (ERD) o nefropatía diabética es una complicación tanto en diabetes tipo 1 como en diabetes tipo 2 y una causa frecuente de muerte en pacientes diabéticos (Tervaert *et al.*, 2010; Martínez-Castelao *et al.*, 2015). En el mundo, la diabetes es la causa más común ($\approx 85\%$) de enfermedad renal terminal (ERT), incluyendo México. En pacientes diabéticos, y aproximadamente el 45%, desarrollan manifestaciones clínicas de ERD (Cooper,

1998; Gheith *et al.*, 2016). La ERD se caracteriza por pérdida de proteínas (en particular albumina), metabolitos y iones en la orina, así como un incremento en la perfusión, generando un incremento de la filtración glomerular y de la presión intraglomerular, además, los cambios patológicos resultan en microalbuminuria inicial, la cual progresa a una proteinuria más extensa, con pérdida de la filtración tubular y por último falla renal (Tervaert *et al.*, 2010).

La patogénesis y la progresión de la ERD es probablemente resultado de la interacción entre vías hemodinámicas y metabólicas que se encuentran alteradas durante la diabetes y que se encuentran asociadas con la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la respuesta humoral (fig. 1) (Cooper, 1998; Tervaert *et al.*, 2010). La hiperglucemia es el evento iniciador que provoca cambios estructurales y funcionales como la hiperfiltración glomerular, hipertrofia tubular epitelial y microalbuminuria, seguido por el desarrollo y engrosamiento de la membrana basal glomerular, acumulación de matriz mesangial, proteinuria y finalmente glomeruloesclerosis (Tervaert *et al.*, 2010; Vinod, 2012;)

1.3.1 Vías hemodinámicas

Los cambios en la hemodinámica glomerular ocurren en estados tempranos de la ERD, los cuales incluyen daños por hiperfiltración e hiperfusión (Hostetter, 2003; Tervaert *et al.*, 2010). Existe una disminución tanto en la resistencia arteriolar aferente como eferente, siendo más del lado aferente, lo cual conduce a un aumento en la presión capilar del glomérulo, que incrementa el gradiente de la presión hidrostática capilar, así como un incremento de flujo glomerular plasmático (Hostetter, 2003). La hiperperfusión y la hiperfiltración glomerular también se encuentran relacionadas a factores como los prostanoïdes, óxido nítrico, péptido natriurético auricular (ANP), hormona de crecimiento, glucagón, insulina, angiotensina II (ANG-II) (Vinod, 2012). Los cambios que conducen a la glomeruloesclerosis son la presión intraglomerular elevada, el aumento de la producción de la matriz celular mesangial y el engrosamiento de la membrana basal glomerular. La hiperglucemia estimula la síntesis de ANG-II, lo que afecta la hemodinámica, el control trófico, inflamatorio y profibronogénico en células renales

(Chen *et al.*, 2001; Wolf *et al.*, 2003). Los factores que median los daños por hiperfiltración incluyen los factores de crecimiento endotelial (VEGF) y las citocinas como el factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β) (Chen *et al.*, 2001). El factor clave en la degeneración vascular durante la diabetes puede ser atribuido a TGF- β , a través del incremento en la producción de NO vía un incremento en la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y aumento en la síntesis de arginina (Sharma *et al.*, 2003; Tsuchida *et al.*, 2002). Las alteraciones en la hemodinámica glomerular debido al esfuerzo cortante y la tensión mecánica, inducen la liberación de citocinas y factores de crecimiento autocrinos y/o paracrinos (Anderson *et al.*, 1986). El estrés hemodinámico propicia cambios estructurales en la ERD a través de la activación local de citocinas y factores de crecimiento. Además, el incremento en la reabsorción de cloruro de sodio en los túbulos proximales o en el asa de Henle, da lugar a un incremento en la tasa de filtración a través de la macula densa y por hipertrofia de los túbulos que median la reabsorción de sodio y cloruro, estos mecanismos pueden ser centrales para este proceso, al vincular nuevamente los cambios estructurales y las adaptaciones hemodinámicas en la ERD (Thomson, 2004).

1.3.2 Vías metabólicas

El transporte activo es un importante regulador de la formación de la matriz extracelular en las células mesangiales. El transportador de glucosa-1 (GLUT-1) es un regulador clave de la entrada de glucosa en las células del riñón y la glucosa es capaz de activar diferentes vías metabólicas permitiendo la expansión mesangial y la producción de la matriz celular mesangial, inducción de la apoptosis en las células mesangiales y de cambios estructurales (Mishra *et al.*, 2005). Los productos de glucosilación avanzada no enzimática producidos en el medio diabético, producen la activación de la proteína cinasa C (PKC), e incrementan la actividad de la vía de los polioles, y que junto a los cambios hemodinámicos resultan en la activación de VEGF, TGF-beta, las interleucinas 1 (IL-1), IL6 e IL8, así como del factor de necrosis tumoral TNF- α . Todas estas vías interactúan durante la ERD provocando la permeabilidad de la membrana basal glomerular a la albumina e incrementar la

acumulación de matiz extracelular, y como resultado, un incremento de proteinuria, glomeruloesclerosis, y finalmente fibrosis tubulointersticial (Vinod, 2012)

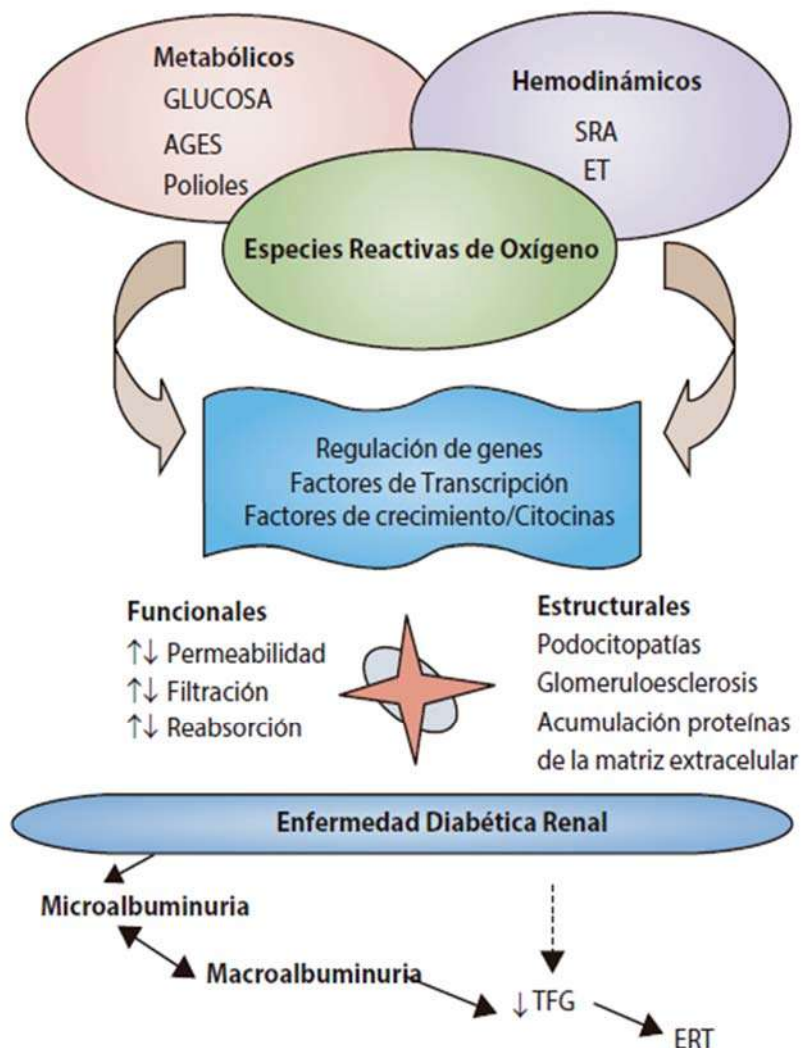


Figura 1. Esquema de la patogénesis de la ERD. La patogénesis de la ERD es el resultado de anormalidades metabólicas y hemodinámicas durante la diabetes que interactúan entre sí, así como con varias rutas dependientes de ERO. Ambas provocan activan factores de transcripción que se encuentran influenciados por interacciones entre estímulos metabólicos, factores hemodinámicos y la generación de especies reactivas de oxígeno durante la diabetes. AGE, productos avanzados de glucosilación, ECM, matriz extracelular, ET, endotelina, TFG, tasa de filtración glomerular, SRA, sistema renina-angiotensina, ERT, enfermedad renal terminal. Modificado de Cao y Cooper, 2011.

1.4 Disfuncionalidad mitocondrial en la enfermedad renal diabética

Debido a los altos requerimientos de energía y oxígeno de los riñones, la función mitocondrial y renal se encuentran íntimamente relacionados (Schiffer y Friederich-Persson, 2017). La disfuncionalidad mitocondrial participa de manera central en el

desarrollo y la progresión de la ERD (Forbes y Thorburn, 2018). Los riñones poseen una alta densidad mitocondrial y en reposo, son los segundos mayores consumidores de oxígeno molecular en el cuerpo, después del corazón. La mayoría del oxígeno es metabolizado dentro de la mitocondria por la fosforilación oxidativa (OXPHOS), para producir ATP a través del flujo de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) (Bhargava y Schnellmann, 2017; Schiffer y Friederich-Persson, 2017; Forbes y Thorburn, 2018). La respiración aerobia inicia con la producción de piruvato a partir de glucosa por vía de la glucólisis. El piruvato es convertido a acetil-CoA (a través de la piruvato deshidrogenasa en la matriz mitocondrial, la cual alimenta el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) (Nicholls, 2013). La disfuncionalidad de la mitocondria conduce a una disminución en la producción de ATP, alteraciones celulares y estructurales, y la pérdida de la función renal (Forbes y Thorburn, 2018)

1.4.1 Componentes de la cadena respiratoria mitocondrial

La cadena respiratoria mitocondrial de mamíferos está conformada por cinco grandes complejos enzimáticos denominados complejo I (NADH: ubiquinona oxidorreductasa), complejo II (succinato: ubiquinona oxidorreductasa), complejo III (ubiquinol-citocromo c reductasa), complejo IV (citocromo c oxidasa) y complejo V (F₁F₀ ATP sintasa) (Althoff *et al.*, 2011). Los complejos I, III, y IV utilizan la energía de los electrones durante las reacciones de transferencia para bombear protones fuera de la matriz mitocondrial a través de la membrana interna. El resultante gradiente de protones es utilizado para la síntesis de ATP por el complejo V (ATP sintasa). Los electrones son lanzados entre los complejos de la cadena respiratoria por el ubiquinol (un acarreador de electrones liposoluble) y el citocromo c (un acarreador proteico de electrones de 12 kDa) (Althoff *et al.*, 2011).

1.4.1.1 Complejo I, NADH: ubiquinona oxidorreductasa

La cadena respiratoria mitocondrial de mamíferos está conformada por cinco grandes complejos enzimáticos denominados complejo I (NADH:ubiquinona oxidorreductasa), complejo II (succinato:ubiquinona oxidorreductasa), complejo III (ubiquinol-citocromo c oxidorreductasa) y complejo IV (citocromo c oxidasa) (Althoff

et al., 2011). Las reacciones redox que ocurren en los complejos I, III, y IV son lo suficientemente exergónicas para impulsar el bombeo de protones hacia el espacio intermembrana. El gradiente de protones resultante es utilizado por la F1F0 ATP sintasa para la síntesis de ATP. Los electrones son transferidos entre los complejos de la cadena respiratoria por la ubiquinona, un acarreador de electrones liposoluble, y el citocromo *c*, un acarreador proteico de electrones de 12 kDa (Althoff *et al.*, 2011).

1.4.1.2 Complejo II, succinato: Ubiquinona oxidorreductasa

El complejo II (succinato: ubiquinona oxidorreductasa) cataliza la transferencia de electrones del succinato (vía FADH₂) hacia la UQ y, por lo tanto, representa un importante entrecruzamiento del metabolismo celular, al interconectar el ciclo de los ácidos tricarboxílicos con la cadena respiratoria, a diferencia del complejo I no transloca protones (Cecchini, 2003). El complejo II consiste en 4 subunidades codificadas por el núcleo. La cabeza hidrofílica del CII está conformada por la subunidad SDHA, unida covalentemente al FAD y la subunidad SDHB, que contiene tres centros Fe-S. Las subunidades SDHC y SDHD forman parte del anclaje hidrofóbico a la membrana y son el sitio de unión del citocromo *b* (Sun *et al.*, 2005).

1.4.1.3 Complejo III, ubiquinol-citocromo *c* reductasa

El complejo III o ubiquinol-citocromo *c* reductasa transfiere electrones desde el ubiquinol (UQH₂) re-oxidando a UQ en un proceso denominado ciclo Q proveniente de los complejos I o II y otras deshidrogenasas Q-relacionadas hacia el citocromo *b* y a continuación al citocromo *c*. El complejo III posee 11 subunidades estructurales y tres de estas subunidades poseen grupos redox el citocromo *b*, citocromo *c*₁ y una proteína Fe-S de Rieske (Rich y Marechal, 2010; Quinlan *et al.*, 2011).

1.4.1.4 Complejo IV, citocromo *c* oxidasa

El complejo IV (citocromo *c* oxidasa) cataliza la transferencia de electrones provenientes del citocromo reducido producido por el complejo III en oxígeno molecular (O₂). Esta reducción de dos moléculas de agua requiere la transferencia de 4 electrones del citocromo *c* junto con 4 protones desde la matriz. Este complejo está constituido por 13 diferentes subunidades, y la forma activa de la enzima es un

dímero con forma de Y. Las tres mayores subunidades del complejo IV son COXI, II, y III son codificadas por el genoma mitocondrial, y forman el núcleo funcional de la enzima y posee 4 centros redox (2 hemo (citocromo a y a_3) y 2 átomos de cobre (CuA y CuB)) (Capaldi, 1990). Esta reacción genera un gradiente de protones y de carga a través de la membrana mitocondrial interna (Rich y Marechal, 2010).

1.4.2 Especies de reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) se derivan del oxígeno y tienen mayor reactividad que el O_2 . La ERO primaria es el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el cual se genera por la reducción del O_2 por un electrón. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se produce por la reducción del $O_2^{\cdot-}$ por dismutación. El radical hidroxilo (OH^{\cdot}) surge del intercambio de electrones entre el $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 a través de la reacción de Haber-Weiss o por reducción del H_2O_2 por la reacción de Fenton. Cuando son generadas bajo condiciones estrictamente reguladas, las ERO, en particular el $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 , pueden actuar como moléculas de señalización para regular procesos fisiológicos (crecimiento celular, diferenciación, metabolismo, entre otras). Este tipo de señalización se le denomina señalización redox. El estrés oxidante es definido como la generación excesiva de ERO que exceden las capacidades antioxidantes para contrarrestarlas, lo que provoca la oxidación de macromoléculas tales como lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN (Forbes, 2008).

1.4.3 Producción mitocondrial de especies reactivas de oxígeno en la enfermedad diabética renal

Bajo condiciones normales, 0.1-0.2% del consumo de oxígeno mitocondrial es debido a la producción de ERO (Kushnareva *et al.*, 2002; St-Pierre *et al.*, 2002; Schiffer y Friederich-Persson, 2017). La mitocondria es una fuente importante de ERO en la mayoría de las células de mamíferos (Murphy, 2009). La producción excesiva de ERO contribuye al daño mitocondrial en un amplio rango de patologías como en la DM, pero también forma parte de la señalización retrograda entre la mitocondria, el citosol y el núcleo bajo condiciones fisiológicas normales (Droge, 2002; Ballaban *et al.*, 2005).

La producción de ERO varía entre diferentes segmentos de la nefrona, el brazo ascendente del asa de Henle (mTAL) es el sitio predominante de producción de superóxido en el riñón. La NADPH oxidasa ha sido reportada como la mayor fuente de producción de superóxido en el mTAL y el flujo tubular y luminal de Na⁺ se encuentra correlacionado con la producción de ERO en este segmento. Además, existe mayor producción de ERO en los túbulos proximales comparado con los túbulos distales en la nefrona. De hecho, la inhibición de la NADPH oxidasa induce la inhibición de la producción de ERO, esta diferencia puede ser atribuida a la alta actividad de la NADPH oxidasa en los túbulos proximales (Garvin y Hong, 2008; Cowley *et al.*, 2015). La mayor proporción mitocondria/volumen nuclear en los túbulos proximales debido al largo tamaño de la célula, indican que una producción basal de ERO *por mitocondria*, es probablemente menor (Hall *et al.*, 2009). Esto concuerda con un bajo potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) y al reducido contenido de la cadena transportadora de electrones en los túbulos proximales (Hall *et al.*, 2009).

En el riñón diabético con modelos experimentales de diabetes y en pacientes diabéticos, incrementan el daño inducido por ERO observado a través de biomarcadores de estrés oxidante como el 2-isoprostano, 8-hidroxi-2-desoxiguanosina, nitrotirosina y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). En una visión central en la ERD, se ha propuesto al superóxido mitocondrial como la mayor fuente de estrés oxidante en el medio diabético (Nishikawa *et al.*, 2000). Debido a que la hiperglucemia celular puede promover una excesiva captación de piruvato por la mitocondria y, por lo tanto, un incremento de los sustratos que alimentan la CTE, lo que resulta en hiperpolarización de la membrana mitocondrial y un incremento de la producción de superóxido. La producción de superóxido mitocondrial es regulada fuertemente por el potencial de membrana (Korshunov *et al.*, 1997; Starkov y Fiskum, 2003; Lambert y Brand, 2004). De hecho, *in vivo*, en mitocondrias de riñón en ratones db/db diabéticos, así como en mitocondrias aisladas de animales con diabetes experimental y cultivos celulares bajo condiciones de hiperglucemia, muestran un incremento de la producción de ERO (Rosca *et al.*, 2005; Quijano *et al.*, 2007; Coughlan *et al.*, 2009;

Galvan *et al.*, 2017; Schiffer y Friederich-Persson, 2017). En mitocondrias aisladas de la corteza renal de ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina, la glucosilación de proteínas mitocondriales, se asocia con la disminución de la actividad del complejo III y un incremento en la producción de ERO (Rosca *et al.*, 2005). Además, un incremento del NADH derivado del metabolismo de glucosa incrementa la producción de superóxido en células mesangiales de ratas diabéticas, en células endoteliales de aorta, en condiciones hiperglucémicas de cultivo resultan en un incremento del metabolismo de glucosa, incremento del potencial de membrana mitocondrial y de la producción de superóxido, así como un incremento en la producción de H_2O_2 , mientras que la reducción del potencial de membrana o inhibiendo la actividad de la cadena transportadora de electrones disminuye la producción de ERO (Quijano *et al.*, 2007).

1.4.4 Sistemas antioxidantes

Las disfunciones mitocondriales, especialmente aquellas causadas por daños en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos o en la respiración mitocondrial, así como la deficiencia en los sistemas antioxidantes, inducen rutas de señalización retrogradadas. Son el resultado en configuraciones transcripcionales y metabólicas como en el metabolismo de carbohidratos y de nitrógeno para que las células sean capaces de responder a los defectos en las mitocondrias y para mantener los niveles basales de ERO durante la respiración y el metabolismo. Por ello, los organismos han evolucionado varios mecanismos antioxidantes para modular las ERO. Por lo tanto, las mitocondrias poseen sistemas de defensa antioxidante para contrarrestar la formación excesiva de ERO (fig. 2) (Bhargava y Schnellmann, 2017). La superóxido dismutasa 2 (SOD2) es un ejemplo de defensa antioxidante, la cual convierte el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Weisigery Fridovich, 1973). Además, la transcripción de genes que codifican para enzimas antioxidantes como la SOD2, catalasa y glutatión peroxidasa son activados por el factor nuclear eritroide 2 (NRF2) en respuesta al estrés oxidante, al proveer de un mecanismo para prevenir la producción excesiva de ERO (Teruya *et al.*, 2013). La importancia de estos sistemas de defensa antioxidante es la de mantener la producción óptima de ATP y sostener la función mitocondrial y de esta manera,

la función renal (Bhargava y Schnellmann, 2017). Otro de los mecanismos de defensa antioxidante importante en la mitocondria involucra al glutatión. El glutatión es un tripéptido (γ -glumatil-cisteín-glicina) nucleófilo que puede existir en una forma reducida (GSH) o en su forma oxidada como disulfuro de glutatión (GSSG). La mitocondria contiene su propia reserva de glutatión con una concentración similar a la reserva citosólica (10-14 mM), el glutatión mitocondrial (GSHm), el cual no solo ayuda en disminuir los excesivos niveles de ERO, sino también previene la liberación de citocromo c de la membrana interna (Marí *et al.*, 2012; Ribas *et al.*, 2014). El GSHm interactúa directamente con el $O_2^{\cdot-}$ y es oxidado a GSSG en un 90%, sin embargo, una interacción directa del GSH produce radical sulfinil ($RSO\bullet$) y participar en la regeneración de $O_2^{\cdot-}$, por tanto, SOD2 es requerida para la detoxificación directa del $O_2^{\cdot-}$ (Winterbourn y Metodiewa, 1994; Lushchak, 2012). Otro de los componentes de detoxificación mitocondrial involucrados con el glutatión es la glutatión peroxidasa (GPX), la cual se encuentra ubicada tanto en citoplasma como en mitocondria y utiliza GSH para reducir el H_2O_2 en agua, resultando en GSSG como subproducto (Handy *et al.*, 2009). El GSSG no puede salir de la mitocondria y es reducido nuevamente a GSH por la glutatión reductasa (GR), para la reutilización o eliminación, la conversión de GSSG a GSH requiere de NADPH, requiriendo de comunicación cruzada entre este mecanismo y la vía de las pentosas fosfato que produce NADPH para mantener los niveles de GSH (Lushchak, 2012). En conjunto,

estos mecanismos son la función crucial de prevenir un exceso en los niveles de ERO y mantener la funcionalidad mitocondrial (Bhargava y Schnellmann, 2017).

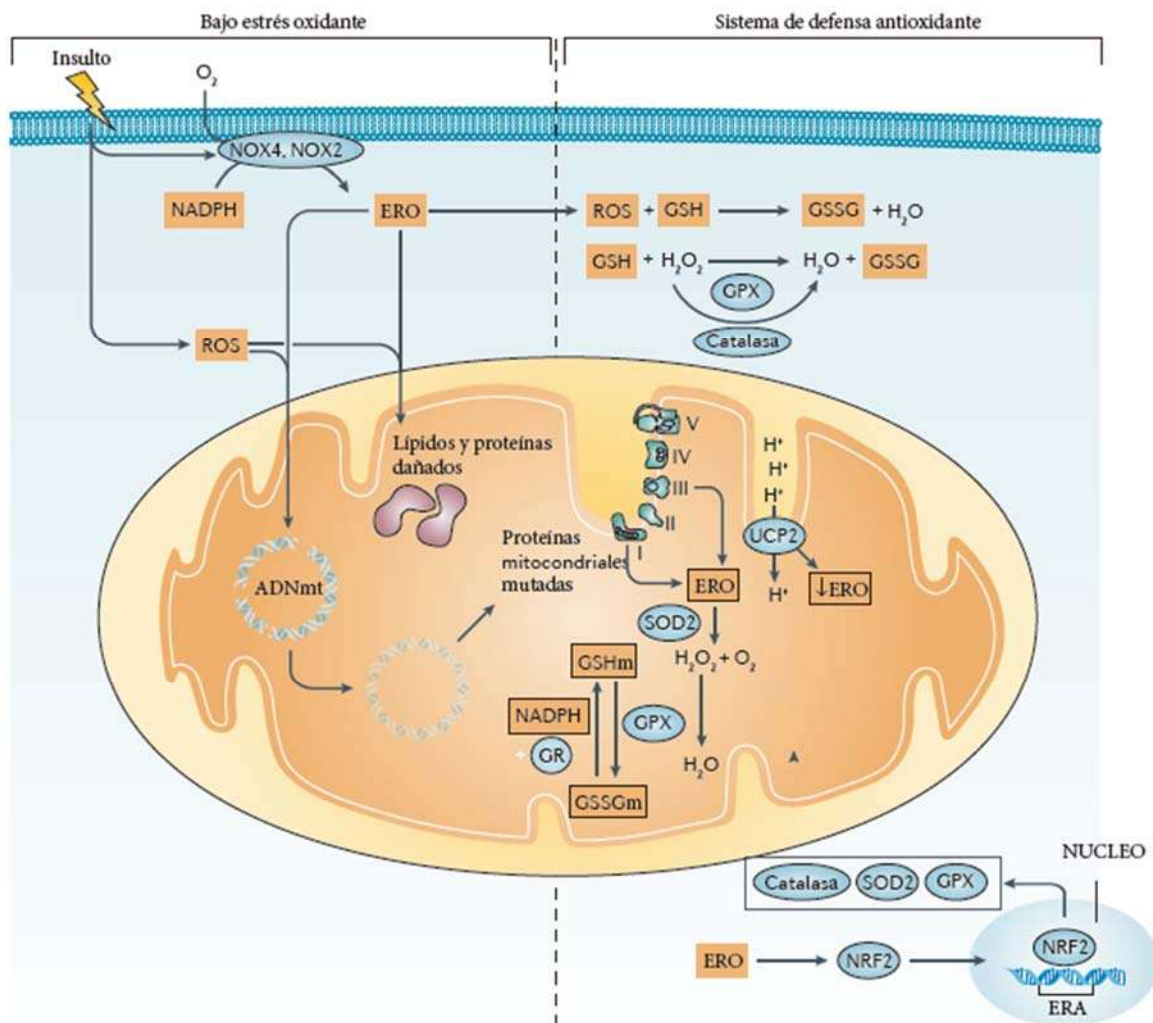


Figura 2. Estrés oxidante y sistema de defensa antioxidante. Los daños pueden incrementar la producción de ERO citosólicos y mitocondriales. NOX2 y NOX4 contribuyen en la producción de ERO. La producción excesiva de ERO genera daños en el ADN mitocondrial (ADNm), lípidos y proteínas. Modificaciones en el ADNm producen proteínas mitocondriales aberrantes y alterar la síntesis proteica, además, las ERO activan al factor nuclear eritroide 2 (NRF2), el cual es translocado hacia el núcleo y se une a los elementos de respuesta antioxidante (ARE) para activar la transcripción de genes que codifican para enzimas como la SOD2, GPX y catalasa. SOD2 reduce el anión superóxido en H₂O₂ y oxígeno. La catalasa se encuentra en el citoplasma y GPX se localiza tanto en el citoplasma como en la mitocondria, reduciendo H₂O₂ en agua. GPX también oxida glutatión reducido (GSHm), resultando en glutatión oxidado (GSSG) como subproducto de la reducción del H₂O₂. El GSSGm es convertido nuevamente a GSHm por la GR en un proceso dependiente de NADPH en la mitocondria. La actividad de la UCP2 es desacoplar y disipar la fuerza protón motriz disminuyendo la producción de ERO. Modificado de Bhargava y Schnellmann, 2017.

1.5 Hierro

La importancia del metabolismo del hierro se extiende más allá de las áreas tradicionales de la eritropoyesis y la nutrición. Además, representa un factor clave en patología, cardiología, oncología, enfermedades neurológicas e infecciosas. Los niveles de hierro de un individuo están determinados por una combinación de factores nutricionales, ambientales y genéticos. Los niveles normales de hierro aseguran la disponibilidad para una óptima actividad metabólica y funcionamiento del sistema inmune, y al mismo tiempo, impide su utilización por microorganismos y células tumorales.

El hierro es adquirido en la dieta en las formas hémicas o en sales de hierro y es inicialmente absorbido en el intestino el cual es un modulador clave de las concentraciones de hierro en el organismo (Ganz, 2013; Duck y Connor, 2016). El transportador de metales divalente-1 (DMT1) y la ferroportina-1 (Fpn) transportan el hierro a través de la mucosa duodenal hasta el flujo sanguíneo (Fuqua *et al.*, 2012). El flujo mediado por la Fpn es facilitado por una ferroxidasa ligada a membrana, la hefaestina, la cual oxida el Fe^{2+} a Fe^{3+} (Steere *et al.*, 2012). En el suero, dos Fe^{3+} se unen a la apo-transferrina (apo-Tf) y da lugar a la holo-transferrina (holo-Tf), que es transportada por el organismo. La hepcidina es una hormona peptídica producida por los hepatocitos en respuesta a un exceso de hierro, induciendo la degradación celular de Fpn, y de este modo atenúa la absorción duodenal de hierro (Ganz y Nemeth, 2012). El receptor de transferrina-1 (TfR1) es una proteína transmembranal, el cual se une a la holo-Tf formando un complejo que es endocitado en un endosoma (Lambe *et al.*, 2009). Dentro del endosoma el Fe^{3+} es reducido a Fe^{2+} en seis pasos por la proteína transmembranal del antígeno epitelial-3 (STEAP3, una metalorreductasa) y el Fe^{2+} es disociado de la transferrina (Tf). El Fe^{2+} es entonces exportado hacia el citoplasma a través de DMT1 mientras que la Tf es reciclada. El Fe^{2+} puede ser utilizado para el metabolismo o secuestrado/almacenado por la ferritina para prevenir la participación del hierro en reacciones redox evitando así la toxicidad (Roualt, 2006; Duck y Connor, 2016).

El grado de variación en ambos extremos del estado normal hierro puede tolerarse, sin alterar este delicado equilibrio y es probablemente el factor crítico para comprender cómo los cambios en el estado del hierro pueden predisponer a una amplia variedad de trastornos como la diabetes mellitus (Swaminathan *et al.*, 2007; Simcox, 2013). El hierro es fundamental para una amplia gama de funciones celulares como el ciclo celular, crecimiento, replicación, metabolismo y para la síntesis/reparación de ADN y para proteínas que requieren hierro como las proteínas hierro-azufre y hemo que son abundantes en la mitocondria (Crichton, 2016; Pilo y Angelucci, 2017). Sin embargo, la capacidad para ganar y perder electrones da al hierro la posibilidad de participar en la generación de radicales libres potencialmente dañinos como el radical $\text{OH}\cdot$ a través de la reacción de Fenton (Graf *et al.*, 1984). El radical hidroxilo es una de las especies químicas más reactiva en sistemas biológicos. Cuando se encuentra en exceso, no solo es capaz de dañar lípidos, proteínas y a la mitocondria, sino también daños oxidativos en el ADN, incluyendo modificaciones de bases y ruptura en las cadenas del ADN (Inoue y Kawanishi, 1987; Dizdaroglu *et al.*, 1991; Dizdaroglu y Jaruga, 2012). Por tanto, los niveles celulares de hierro deben estar delicadamente balanceados. Para mantener los niveles celulares de hierro apropiados y evitar la sobrecarga en el organismo, las células han desarrollado sofisticados sistemas asegurando un balance en la homeostasis del hierro celular (Mühlenhoff *et al.*, 2015). Un metabolismo del hierro estrechamente regulado es esencial, por lo que alteraciones o sobreexpresiones en moléculas relacionadas con el hierro pueden tener consecuencias importantes para la salud (Heeney *et al.*, 2004; Hentze *et al.*, 2010). Defectos en las proteínas involucradas en el transporte del hierro en mamíferos, regulación o utilización en la mitocondria, se encuentran fuertemente asociadas con enfermedades crónico-degenerativas, ya sea con anemia crónica o sobrecarga sistémica como la hemocromatosis o tejido dependiente de hierro, así como en la ataxia de Friedreich (Harris *et al.*, 1995; Ward *et al.*, 2005; Kaplan *et al.*, 2011; Lane *et al.*, 2015). En el caso de sobrecarga de hierro los efectos citotóxicos de niveles elevados de hierro resultan en daño crónico y progresivo a tejido y, por último, en fallo del órgano involucrado (Papanikolaou *et al.*, 2005; Muñoz *et al.*, 2011).

En eucariontes, las mitocondrias son el principal sitio de utilización de hierro y por consiguiente, los orgánulos de mayor consumo, ya que albergan abundantemente proteínas dependientes de hierro que desempeñan funciones en la cadena de transporte de electrones (complejos I-IV), ciclo de los ácidos tricarbónicos (aconitasa), entre otras. Además, son sitios centrales para la síntesis de cofactores con contenido de hierro (Mühlenhoff *et al.*, 2015). El paso inicial en la biosíntesis de grupos hemo y el paso final, la inserción del hierro ferroso en la protoporfirina IX, están localizados en la mitocondria. Las proteínas con cofactores de hierro están involucradas en una amplia variedad de rutas metabólicas, y la deficiencia de grupos hemo es letal a menos que la demanda celular sea suministrada por una vía externa (Rouault, 2012; Pain y Dancis, 2014; Lill *et al.*, 2015). Además, la mitocondria lleva a cabo el ensamblaje y la exportación de los centros hierro-azufre, los cuales son esenciales para la maduración de todas las proteínas con cofactores hierro-azufre (Fe/S), localizados en la mitocondria, citosol o en el núcleo (Lill *et al.*, 2015). La maduración de las proteínas extra-mitocondriales requieren de la exportación de pequeñas cantidades de soluto que es producido por el sistema mitocondrial de biogénesis de los centros hierro-azufre (ISC) y exportado a través del transportador ABC mitocondrial Atm1 hacia el citosol para ser utilizado por el sistema de ensamblaje citosólico de proteínas Fe/S para la formación de proteínas Fe/S citosólicas y nucleares (Rouault, 2012). Diversas proteínas Fe/S citosólicas y nucleares desempeñan funciones esenciales en la traducción (p. ej. la proteína ABC Rli1), para la síntesis y reparación del ADN (polimerasa y helicasas) y en otros aspectos de la estabilidad del genoma. Por ende, muchos de los 17 bien conocidos miembros del sistema mitocondrial ISC son esenciales para la viabilidad celular, y mutaciones en los genes que codifican para los miembros del ISC están asociados con enfermedades recesivas con complejos neurodegenerativos, hematológicos y metabólicos (Lill *et al.*, 2015).

1.5.1 Restricción de hierro

Una influencia recíproca entre el metabolismo de hierro y la diabetes se ha observado en la frecuencia de apariciones de diabetes en la hemocromatosis hereditaria (HH) (Swaminathan *et al.*, 2007). En humanos y en modelos animales

de HH, sobrecargas de hierro en células beta del páncreas, resultan en estrés oxidante y en una disminución en la capacidad de secreción de insulina con un incremento sobrecompensatorio en la sensibilidad de insulina que es reversible con la reducción de hierro en el organismo (Fernández-Real *et al.*, 2005). Un incremento en las concentraciones de ferritina sérica, un indicador del estatus de hierro en el organismo, se encuentra correlacionado positivamente con el riesgo de desarrollar diabetes. Un exceso de hierro ha sido implicado en la patogénesis de la diabetes y sus complicaciones, además, se ha reportado que un elevado porcentaje (85%) de personas que padecen DM2 poseen 3-4 veces más niveles de hierro en suero, con elevada saturación de transferrina, comparados con la población en general (Thomas *et al.*, 2004; Fumeron *et al.*, 2006). De hecho, a través de terapias de quelación y/o flebotomías, se logra una disminución de hiperinsulinemia, hiperglucemia y se mejora la función hepática en pacientes con DM2 y con hígado graso no alcohólico, asimismo, una mejoría en la dislipidemia y el perfil de lípidos en roedores con DM experimental y con HCV-dislipidemia, además, en animales con enfermedad renal experimental, una restricción de hierro en la dieta promueve una disminución de los daños glomerulares y una disminución de los daños oxidantes en roedores con ERD (Franchini *et al.*, 2006; 2008Cooksey *et al.*, 2010; Minamiyama *et al.*, 2010; Naito *et al.*, 2012; Naito *et al.*, 2013; Morita *et al.*, 2015; Marquez-Ibarra *et al.*, 2016; Conigliaro *et al.*, 2017). Así como también, la progresión de la ERD, al disminuir el estrés oxidante y los posibles eventos en los que el hierro participa en reacciones citotóxicas de Fenton y como consecuencia, en hemodinámica glomerular y en otros modelos de daño renal por sobrecarga de proteína (Remuzzi *et al.*, 1997; Ikeda *et al.*, 2013; Ikeda *et al.*, 2017).

2. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad renal diabética (ERD) es la causa principal de insuficiencia renal en el mundo. Los defectos en la funcionalidad mitocondrial son centrales en el desarrollo de la ERD y el incremento de la producción de especies reactivas. Se ha propuesto una participación importante del metabolismo del hierro en las complicaciones de la diabetes, vía estrés oxidante. Por un lado, la restricción del hierro en la dieta disminuye los daños oxidativos en riñones de animales con diabetes experimental y promueve una mejoría en la ERD. La sobrecarga de hierro se asocia con daños oxidantes y en una disminución en la capacidad de secreción de insulina. Sin embargo, la participación del hierro, tanto por restricción como por suplementación en la ERD, específicamente en la función mitocondrial del riñón, no ha sido del todo elucidada. Este trabajo pretende evaluar el efecto en la modificación del hierro en la dieta en la función y el estrés oxidante mitocondrial en riñones de ratas con diabetes experimental.

3. HIPÓTESIS

La restricción crónica de hierro en la dieta restaura la función mitocondrial y el estrés oxidante en mitocondrias de riñones de ratas con diabetes.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar el efecto de la restricción crónica de hierro en la dieta y la suplementación crónica de hierro en la función y el estrés oxidante en mitocondrias en riñones de ratas con diabetes experimental.

4.2. Objetivos particulares

1. Determinar el efecto de la restricción y la suplementación de hierro crónica. en la función mitocondrial de riñones de ratas diabéticas
2. Evaluar el efecto de la restricción y la suplementación de hierro crónica en la producción de ERO en mitocondrias de riñones de ratas diabéticas.
3. Determinar si la restricción y suplementación de hierro crónica modifica los niveles de hierro no hémico mitocondrial de riñones de ratas diabéticas.
4. Evaluar el efecto de la restricción y suplementación de hierro crónica en el estrés oxidante mitocondrial de riñones de ratas con diabetes.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho de dos meses de edad con un peso de entre 220-250 g. Se adaptaron durante 7 días en el bioterio del IIQB en cajas de acrílico a temperatura controlada con ciclos de 12 h luz/oscuridad, con alimento y agua *ad libitum*, siguiendo las recomendaciones técnicas de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, “ESPECIFICACIONES TECNICAS PARA LA PRODUCCION, CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO” de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación y del Comité de Bioseguridad y Bioética del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas.

5.2. Diseño experimental

Un total de 42 ratas fueron aleatoriamente divididas en 6 grupos de 7 ratas cada uno: Grupo Control (Dieta estándar); Diabéticas (Dieta estándar); NRH (Normoglucémicas + restricción de hierro); DRH (Diabéticas + restricción de hierro); NSH Normoglucémicas + dieta estándar + 3 mg de hierro elemental/Kg de masa corporal (MC)); DSH (Diabéticas + dieta estándar + 3 mg de hierro elemental/Kg de MC).

5.3. Inducción de la diabetes experimental

Las ratas se mantuvieron en ayuno durante 16 h. Posteriormente, a cada rata se le administró estreptozotocina (STZ) 45 mg/Kg de MC preparada *in situ* en buffer de citratos (0.1 M, pH 4.5) 1.0 mL/Kg masa corporal (MC) por vía intraperitoneal (Tesch & Allen, 2007). Al quinto día se les determinó la concentración de glucosa en sangre con un glucómetro *Accu-Check Performa* (Roche), solo los individuos con una concentración de glucosa ≥ 300 mg/dL fueron incluidos (los individuos control y normoglucémicos fueron tratados de la misma forma inyectados por vía intraperitoneal únicamente con buffer de citratos). Todos los tratamientos se iniciaron 2 semanas después de la inyección con estreptozotocina o el vehículo (Tervaert, 2007).

5.4. Formulación de las dietas

La dieta estándar (Teklad Global 2018S, ENVIGO) está formulada con un contenido de 200 mg de hierro elemental/kg de alimento. La dieta bajo en hierro (D03072501 Research Diets, Inc. New Brunswick, NJ, USA), con un contenido de 3 mg de hierro elemental/Kg alimento (Anexo I). La dieta estándar se suplementó vía oral con 3 mg de hierro elemental/kg de MC utilizando hierro polimaltosado (Takeda, Mexico) para la suplementación con hierro de acuerdo a Marquéz-Ibarra *et al.*, 2016.

5.5. Determinación de hemoglobina

Al término de los tratamientos, los animales fueron sacrificados por decapitación y se obtuvo una muestra de sangre en un tubo heparinizado (80 USP de heparina de litio). El contenido de hemoglobina (Hb) se determinó utilizando el método de Drabkin, 10 μ L de sangre fueron adicionados a 2.5 mL de solución reactiva (0.012 mM $K_3[Fe(CN)_6]$, 1.54 mM de KCN y 0.04 mM K_2HPO_4) y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. La densidad óptica se registró a 540 nm en un espectrofotómetro UV/Vis Perkin-Elmer Lambda 18. Los resultados de Hb se expresaron como mg/dL y se calcularon utilizando hemoglobina bovina como estándar.

5.6. Determinación de creatinina y urea sérica

Los niveles de creatinina y urea sérica se determinaron utilizando kits comerciales siguiendo las especificaciones del fabricante y son expresados como mg/dL (DiaSys, Diagnostic Systems GmbH).

5.7. Determinación de hierro en suero

100 μ L de suero se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se mezclaron con 200 μ L de una solución fresca de 1.4 M HCl, después se incubaron a 60°C durante 2 h. A continuación, se adicionaron 250 μ L de solución cromógena (0.52 mM Ferrozina, 1.5 M acetato de amonio, y 1 M de ácido ascórbico), después se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. La densidad óptica se registró a 562 nm en un espectrofotómetro UV/Vis Perkin-Elmer Lambda 18. Los resultados

de hierro se expresan como $\mu\text{g/dL}$ y se calcularon utilizando FeCl_3 como estándar (Riemer *et al.*, 2004)

5.8. Aislamiento de mitocondrias de riñones

El aislamiento de mitocondrias se realizó de acuerdo al método modificado de Saavedra-Molina y Devlin (1997). Los riñones se extrajeron y se suspendieron en 25 mL de buffer de aislamiento 1 (manitol 200 mM, sacarosa 70 mM, MOPS 2 mM y EGTA 1 mM), y se trituró, después se homogeneizaron en un tubo Potter-Elvehjem con un vástago de teflón, y se centrifugó a $500 \times g$ durante 10 min a 4°C , el sobrenadante se decantó y centrifugó a $6,300 \times g$ durante 10 min a 4°C , después el precipitado se resuspendió cuidadosamente en buffer de aislamiento 2 (manitol 220 mM, sacarosa 70 mM, MOPS 2 mM, pH 7.4) frío con albumina (0.2%) y se centrifugó a $10,500 \times g$ durante 10 min a 4°C . Finalmente, el precipitado se resuspendió en 1 mL de buffer de aislamiento 2. El contenido de proteína mitocondrial se determinó rutinariamente con el método de Biuret, (utilizando albumina sérica bovina como estándar (Gornall *et al.*, 1949).

5.9. Determinación de la respiración mitocondrial

1.0 mg/mL^{-1} de proteína de mitocondrias recién aisladas se resuspendieron en buffer (10 mM HEPES, 100 mM KCl, 3 mM KH_2PO_4 , 3 mM MgCl_2). Se adicionó como sustrato respiratorio a las mitocondrias 10 mM glutamato+malato (G+M) o 10 mM de succinato y se registró el consumo basal de oxígeno durante 90 s polarográficamente con un electrodo de oxígeno tipo Clark acoplado a un monitor de oxígeno (5300A Biological Oxygen Monitor, YSI, Ohio, EUA); después, se añadió 1 mM de ADP (estado 3) para estimular la respiración en estado fosforilante y se monitoreó durante 120 s, después, se adicionaron $0.5 \mu\text{g}$ de oligomicina (estado 4) sensible a oligomicina y se monitoreó durante 90 s. Finalmente, se adicionaron los inhibidores antimicina A (complejo III) ($1 \mu\text{g}$) y KCN (complejo IV) (1 mM) (Estabrook *et al.*, 1967). El cociente respiratorio (CR) se calculó dividiendo el estado 3/estado 4.

5.10. Determinación del potencial de membrana mitocondrial

El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) se midió espectrofluorométricamente utilizando *o*-safranina. 0.5 mg/mL^{-1} de proteína mitocondrial de mitocondrias recién

aisladas fueron resuspendidas en un volumen final de 2 mL de buffer (10 mM HEPES, 100 mM KCl, 3 mM KH_2PO_4 , 3mM MgCl_2), a continuación se añadió 5 μM de safranina y la fluorescencia basal se monitoreó a Ex/Em= 495/586 nm, apertura= 5 nm (en modo: baja sensibilidad) durante 60 s, después, se energizaron con 10 mM G+M o succinato 10 mM, el cambio en la fluorescencia se monitoreó durante 180" y después se añadió CCCP para abatir el $\Delta\Psi_m$. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias de fluorescencia de safranina (Figueira *et al.*, 2012).

5.11. Determinación de la actividad de los complejos de la cadena transportadora de electrones

La actividad del complejo I se realizó en mitocondrias permeabilizadas por congelación y las actividades de los complejos II, II-III, y IV se realizaron en mitocondrias solubilizadas con Tritón X-100 al 10% en buffer hipotónico (100 mM KCl, 10 mM MgCl_2 y 5 μM de Tris base pH 7.5.) y resuspendidas en buffer de fosfato (50 mM KH_2PO_4 , pH 7.6) (BF) (Ortiz-Ávila *et al.*, 2013).

5.11.1. Complejo I, NADH deshidrogenasa

La actividad del complejo I se determinó espectrofluorométricamente. Se utilizaron 0.1 mg/mL^{-1} de proteína mitocondrial resuspendidas en BF y se incubaron durante 7 min con 1 mM KCN, y 1 μg de antimicina A. Después se añadió 10 μM de ferrocianuro de potasio y se registró la fluorescencia basal durante 60 s a Ex/Em =352/464, apertura= 5 nm, (en modo: alta sensibilidad), posteriormente se añadió 100 μM de β -NADH y se monitoreo durante 240 s en un espectrofluorómetro Shimadzu RF-5301 PC, (Ortiz-Ávila *et al* 2013).

5.11.2. Complejo II, Succinato 2,6 DCCIP oxidorreductasa

0.3 mg/mL^{-1} de proteína mitocondrial fue resuspendida en BF y se incubó 7 min con 10 μM de rotenona, 1 mM de KCN, y 1 μg de antimicina A. Después se adicionó 80 μM de DCCIP, y se registró la absorbencia durante 60 s a 600 nm. Por último, se adicionó 10 mM de succinato, y la reducción del 2,6 DCIP se monitoreó durante 240 s en un espectrofotómetro UV/Vis Perkin-Elmer Lambda 18. Se utilizó el coeficiente de extinción molar del DCCIP (ϵ) 19.1 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ para calcular la actividad (Cortés-Rojo *et al.*, 2007).

5.11.3. Complejos II+III, Succinato-citocromo c oxidoreductasa

Se resuspendieron 0.3 mg/mL^{-1} de proteína mitocondrial en BF y se incubaron 7 min con $10 \text{ }\mu\text{M}$ de rotenona, 1 mM de KCN. Después se añadieron $250 \text{ }\mu\text{g}$ de citocromo C oxidado, y se monitoreó durante 60 s a 550 nm , y se adicionó 10 mM de succinato, la reducción del citocromo c se monitoreó durante 240 s en un espectrofotómetro UV/Vis Perkin-Elmer Lambda 18. Se utilizó el coeficiente de extinción molar del citocromo c reducido (ϵ) $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para calcular la actividad (Cortés-Rojo *et al.*, 2007).

5.11.4. Complejo IV, Citocromo c oxidasa

Se utilizaron 0.3 mg/mL^{-1} de proteína mitocondrial. Las mitocondrias fueron resuspendidas en BF y se incubaron 7 min con $10 \text{ }\mu\text{M}$ de rotenona y $1 \text{ }\mu\text{g}$ de antimicina A. Posteriormente, se adicionó $125 \text{ }\mu\text{g}$ de citocromo c reducido con ditionita de sodio, y la oxidación del citocromo c se monitoreó a 550 nm en un espectrofotómetro UV/Vis Perkin-Elmer Lambda 18. La reacción se detuvo con la adición de 1 mM de KCN. Se utilizó el coeficiente de extinción molar del citocromo c reducido (ϵ) $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para calcular la actividad (De Piña, 1989).

5.12. Determinación de especies reactivas de oxígeno

La producción de especies reactivas de oxígeno se determinó de acuerdo a Ortiz-Ávila *et al.*, 2015, utilizando 2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H_2DCFDA). 0.3 mg/mL^{-1} de proteína mitocondrial se resuspendió en buffer (10 mM HEPES, 100 mM KCl, 3 mM KH_2PO_4 , 3 mM MgCl_2) e incubaron con $12.5 \text{ }\mu\text{M}$ de H_2DCFDA durante 15 min. Después se registró la fluorescencia basal durante 1 min a Ex/Em $485/520 \text{ nm}$ y se adicionó 5 mM de G+M y el incremento de la fluorescencia se monitoreó durante 60 min (Ortiz-Ávila, 2013). Los resultados se expresan como unidades arbitrarias de 2', 7'-diclorofluoresceína (DCF).

5.13. Determinación de la actividad de la Superóxido Dismutasa Mitocondrial

La actividad de la enzima Superóxido dismutasa (SOD2) se determinó utilizando el kit comercial SOD-WST (Sigma 19160). Brevemente, 0.1 mg/mL^{-1} de proteína mitocondrial se resuspendieron en $200 \text{ }\mu\text{L}$ de buffer de trabajo WST y se adicionaron

20 μL de solución de trabajo enzimática. Posteriormente, se incubaron 30 min a 37°C y se leyeron a 450 nm utilizando un lector de microplacas Multiskan FC, Thermo Scientific, los resultados de la actividad de la SOD2 son expresados como unidades de SOD y se calcularon utilizando como estándar SOD de *Escherichia coli*.

5.14. Determinación de los biomarcadores de estrés oxidante

5.14.1. Peroxidación de lípidos

Para corregir la interferencia con azúcares libres en el buffer de aislamiento, las mitocondrias se lavaron dos veces con buffer de fosfatos salino, 7.4 pH (PBS) (proporción de muestra 1:20 en PBS), y posteriormente, se les determinó el contenido de proteína. Después, 0.3 mg/mL^{-1} de proteína mitocondrial se resuspendió en PBS (pH 7.4) y se añadió 0.01 % de BHT para prevenir la formación no específica de cromóforos. A continuación, se adicionó ácido tricloroacético 15%, 0.25 M HCl y ácido tiobarbitúrico 0.375%, y se incubó 20 min a 90°C , después se centrifugó a $6,300 \times g$ durante 5 min. La densidad óptica se registró a 532 nm en un espectrofotómetro UV/Vis Perkin-Elmer Lambda 18 (Buege y Aust, 1978). Se utilizó el coeficiente de extinción molar (ϵ) $156 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para calcular la concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

5.14.2. Carbonilación de proteínas

Se suspendieron 0.3 mg/mL^{-1} de proteína mitocondrial en PBS (pH 7.4) y 10% TCA, después se centrifugaron a $5000 \times g$ durante 10 min. Al precipitado se le adicionó 10 mM 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) en 2 M de HCl, y se incubó durante 10 min. Posteriormente, se lavó 3 veces con acetato de etilo/etanol (1:1), después se resuspendió en SDS al 10% y se registró la densidad óptica a 360 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV/Vis UV-2550. Se preparó un blanco individual para cada una de las muestras con 2 M de HCl, el valor de la absorbencia del blanco fue restada de la muestra con DNPH. Se utilizó el coeficiente de extinción molar (ϵ) $0.022 \text{ }\mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para calcular la concentración de proteínas carboniladas (Wehr y Levine, 2013).

5.15. Determinación de glutatión

La determinación del contenido de glutatión total (GSht) se realizó de acuerdo a Rahman *et al.* (2006). 0.2 mg/mL⁻¹ de proteína mitocondrial se resuspendió en 0.5 mL de 0.6 % ácido sulfosalicílico, 0.1% Triton-X100 en 0.1 M de buffer de fosfato-5 mM EDTA, pH 7.5 (BFE), y se sonicó durante 30 segundos en baño de hielo, posteriormente, se congeló a -70°C y descongeló 2 veces a continuación, se centrifugó a 8000 x g. Después, 100 µL del sobrenadante se mezclaron con 100 µM de DTNB y 0.1 U de glutatión reductasa (GR) a un volumen final de 1 mL BFE. La reacción se inició con la adición de 50.0 µM de β-NADPH y se monitoreó durante 5 min a 412 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV/Vis UV-2550. El contenido de glutatión oxidado (GSSG) se realizó después de la derivatización del GSH incubando la muestra con 0.2% de 4-vinilpiridina durante 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad. El glutatión reducido (GSH) se calculó restando el GSSG del GSht.

5.16. Determinación de hierro *no*-hémico mitocondrial

El contenido de hierro *no*-hémico se determinó a través de dos métodos, un método colorimétrico (y con espectrometría de absorción atómica de flama (FAAS)). 1.0 mg/mL⁻¹ de proteína mitocondrial se resuspendió en 100 µL de agua desionizada y se mezcló con 150 µL de solución liberadora de hierro fresca (1 M HCl y 10% de ácido tricloroacético y se incubaron a 95°C durante 1 hora. Después, se atemperaron y se centrifugaron a 10,000 x g durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, 100 µL del sobrenadante fueron mezclados con 400 µL de solución cromógena (0.508 mM de ferrozina, 1.5 M de acetato de sodio, 1 M de ácido ascórbico). La densidad óptica se registró a 562 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV/Vis UV-2550 (Seo *et al.*, 2008). Para la determinación por FAAS se utilizaron 1000 µL del sobrenadante fueron inyectados al espectrómetro de absorción atómica Perkin-Elmer 3100 con flama oxidante de acetileno-aire (azul claro) (presión de gas 0.1 Kg/cm²) y aire (presión de gas 1.5 kg/cm²) y se detectó a 248.3 nm con una apertura de 0.7 nm. El contenido de hierro *no*-hémico fue calculado utilizando FeCl₃ como estándar y se expresa como µg de hierro/g de proteína.

5.17. Inmunodetección, Western Blot

60 µg de proteína mitocondrial se resolvieron por electroforesis en geles de poli(acrilamida-duodecil sulfato de sodio) (SDS-PAGE) (12%) y se transfirieron en membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) y se bloquearon con leche descremada al 5% (Carnation, Nestlé, USA) durante 1 h a 4°C, y se analizaron con los siguientes anticuerpos: anti-SOD2 (1:1000), anti-TOM20 (translocase of the outer membrane 20) (1:1000). Posteriormente, se lavaron con TBS-T y fueron incubados con el anticuerpo secundario oveja anti-ratón IgG-HRP (1:10,000). Las imágenes fueron adquiridas en un fotodocumentador ChemiDoc XRS+ y procesadas utilizando el software ImageLab (Bio-rad, USA).

5.18. Análisis estadístico

Todos los resultados fueron analizados con el programa GraphPad Prism 7.0 utilizando el análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías y son expresados como la media ±E.E.

6. RESULTADOS

6.1. Efecto de la restricción y suplementación de hierro en la dieta en los parámetros fisiológicos

El peso y la glucosa en sangre fueron monitoreados semanalmente (figura, 3A, 3B). Al final de los tratamientos (8 semanas), el grupo control mantuvo una ganancia de masa corporal significativa ($p < 0.0001$) con respecto al grupo diabético, así como los grupos diabéticos con restricción de hierro (DRH) y suplementación de hierro (DSH) muestran una disminución de masa corporal al igual que el grupo diabético (Tabla 2). Los grupos normoglucémicos con restricción de hierro (NRH) y con suplementación de hierro (NSH), no mostraron modificación en la masa corporal, con respecto al grupo control (Tabla 2). Los niveles de glucosa sanguínea en las ratas diabéticas mostraron un incremento de 6.5 veces de los niveles de glucosa en sangre, con respecto al grupo control normoglucémico (Tabla 2), mientras que el

grupo DRH mostró una disminución significativa en los valores de glucosa, con respecto al grupo diabético ($p=0.001$) (Tabla 2). Sin embargo, esta disminución no iguala los valores del grupo control. Los grupos NRH y NSH mostraron valores semejantes a los del grupo control en los niveles de glucosas (Tabla 2). El peso relativo de los riñones de los grupos de ratas diabética, DRH y DSH mostraron un incremento significativo con respecto al grupo control y no se encontraron modificaciones en los grupos NRH y NSH con respecto al grupo control. Se encontró una disminución significativa en los niveles de hemoglobina en ambos grupos con restricción de hierro en la dieta ($p=0.0001$ y 0.0007 , normoglucémico y diabético, respectivamente), con respecto al grupo control, así como del grupo diabético (fig. 3A), mientras que ambos grupos (normoglucémico y diabético) suplementados con hierro mostraron incremento del 20% y 17% en los niveles de hemoglobina, con respecto al grupo normoglucémico. El grupo diabético no mostró ninguna modificación en los niveles de hemoglobina con respecto al grupo control. Además, se determinaron los niveles de hierro sérico y se encontró un incremento significativo del 61.5% en el grupo diabético con respecto al grupo normoglucémico control. Los grupos con restricción de hierro mostraron una disminución del 35% y con respecto al control. Únicamente en el grupo diabético suplementado con hierro se mostró una diferencia significativa con respecto al grupo control y el grupo diabético ($p<0.0001$ y $p=0.0042$, respectivamente).

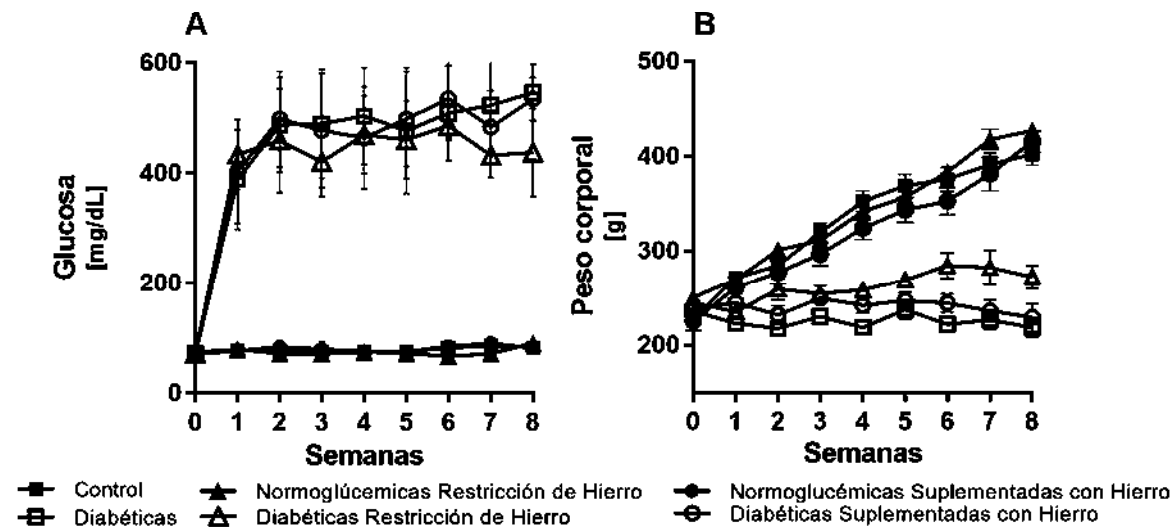


Figura 3. Efecto de la restricción y suplementación de hierro en los niveles glucosa y peso corporal. (A). Niveles de glucosa en sangre, y (B) Peso corporal, curso temporal durante las 8 semanas. Los resultados son representados como la media \pm E.E. ANOVA, Tukey $P \leq 0.05$

Tabla 2. Efecto de la restricción y suplementación de hierro en los parámetros zoométricos y fisiológicos

	Control	Diabéticas	NRH	DRH	NSH	DSH
Peso [g]	401.7 \pm 11.62 ^a	218.3 \pm 10.49 ^b	426.9 \pm 11.22 ^a	272.3 \pm 14.69 ^b	415.6 \pm 8.37 ^a	229.1 \pm 12.31 ^b
Glucosa [mg/dL]	82.71 \pm 3.22 ^c	546.4 \pm 19.43 ^a	90.83 \pm 2.85 ^c	437.8 \pm 39.67 ^b	82.14 \pm 2.69 ^c	534.6 \pm 14.64 ^a
Peso relativo [mg/Kg]	6.20 \pm 0.15 ^b	11.69 \pm 0.60 ^b	6.11 \pm 0.24 ^b	10.84 \pm 0.65 ^a	5.03 \pm 0.086 ^a	9.86 \pm 0.70 ^a
Urea sérica [mg/dL]	18.61 \pm 1.56 ^b	31.11 \pm 3.04 ^a	15.33 \pm 0.86 ^b	20.63 \pm 3.44 ^b	20.23 \pm 1.30 ^b	30.98 \pm 2.95 ^{ab}
Creatinina sérica [mg/dL]	0.21 \pm 0.02 ^b	1.34 \pm 0.25 ^a	0.19 \pm 0.03 ^b	0.35 \pm 0.07 ^b	0.30 \pm 0.02 ^b	0.48 \pm 0.16 ^b
Hemoglobina [g/dL]	15.84 \pm 0.20 ^b	15.43 \pm 0.18 ^b	11.51 \pm 0.55 ^c	11.74 \pm 1.10 ^c	19.05 \pm 0.70 ^a	18.61 \pm 0.50 ^a
Hierro serico [μ g/dL]	67.54 \pm 2.84 ^c	110 \pm 6.01 ^b	44.99 \pm 2.20 ^{cd}	43.52 \pm 1.94 ^c	84.85 \pm 5.226 ^c	139.9 \pm 7.857 ^a

Los resultados son representados como la media \pm E.E. ANOVA, Tukey, letras diferentes representan diferencias entre grupos ($p \leq 0.05$). NRH, normoglucémicas con restricción de hierro; DRH, diabéticas con restricción de hierro; NSH, normoglucémicas con suplementación de hierro; DSH, diabéticas con suplementación de hierro.

6.2. Efecto de la restricción y suplementación de hierro en la dieta en la respiración mitocondrial en riñones

Al término de los tratamientos, se determinó el consumo de oxígeno mitocondrial dependiente de G+M o de succinato en mitocondrias aisladas de ambos riñones, como se muestra en la fig. 4. El grupo diabético mostró un incremento en el estado 3 respiratorio en presencia de ADP, con respecto al grupo control con G+M o succinato (fig. 4A). Así como del estado 4 respiratorio tras la adición de oligomicina ($0.5 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) (fig. 4B). Mientras que el cociente respiratorio (estado 3/estado 4) fue significativamente inhibido en el grupo diabético (fig. 4C). Los grupos normoglucémico y diabético no mostraron diferencias, con respecto al grupo control tanto en el estado 3 respiratorio como en el estado 4, por tanto, la restricción de hierro restaura la respiración mitocondrial, mientras que el grupo normoglucémico suplementado con hierro mostró un discreto incremento en el estado 3 y 4, con respecto al grupo control. A su vez, el grupo diabético con suplementación de hierro mostró al igual que el grupo diabético, un incremento tanto en el estado 3 como en el 4.

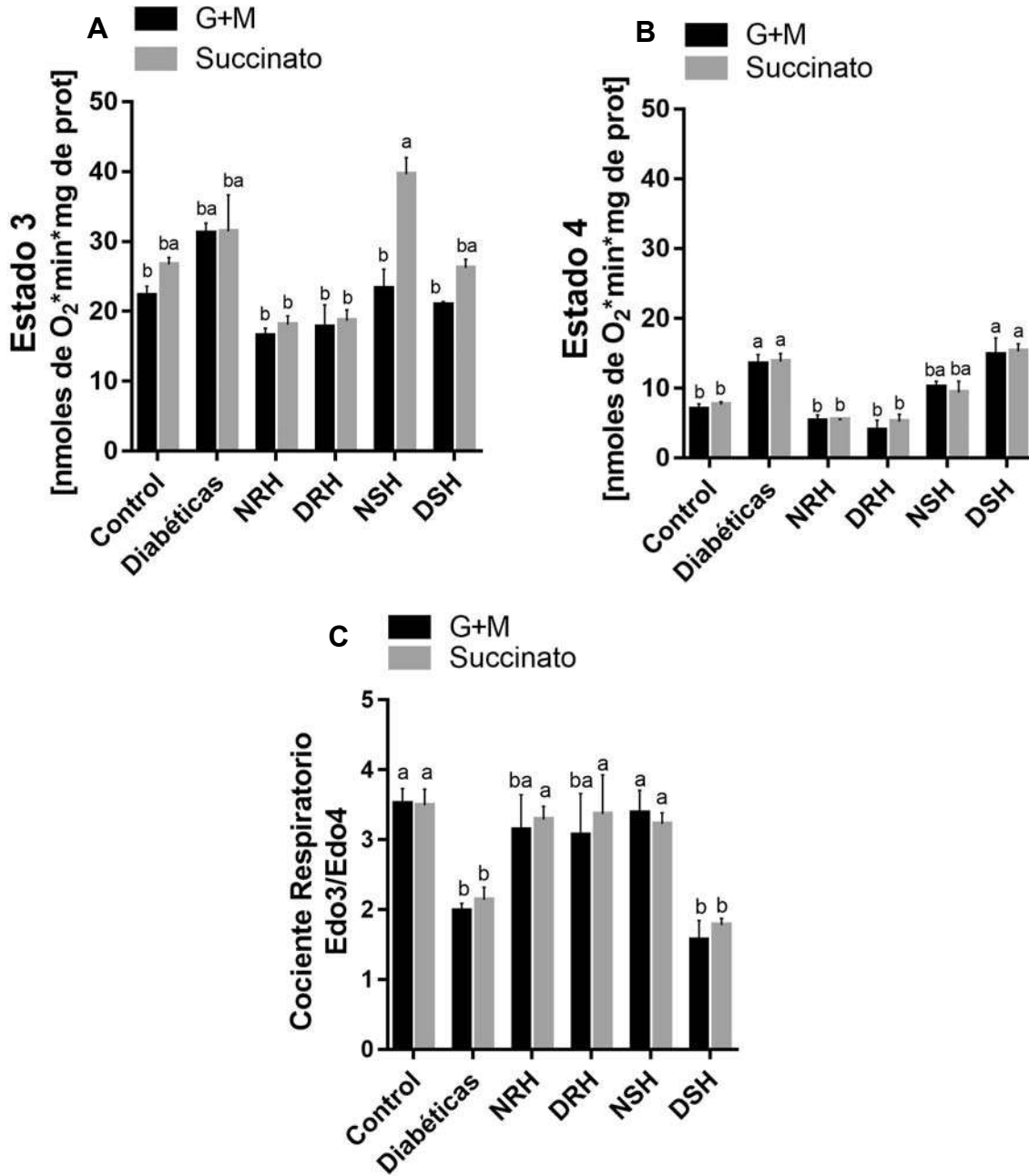


Figura 4. Efecto de la restricción y suplementación de hierro en la respiración mitocondrial en mitocondrias de ambos riñones. **(A)** Estado 3 respiratorio (ADP), **(B)** Estado 4 respiratorio (oligomycin), **(C)** Cociente respiratorio (Edo 3/Edo 4). ■ Mitocondrias energizadas con glutamato + malato 10 mM (G+M), ■ Mitocondrias energizadas con succinato 10 mM. NRH, normoglucémica con restricción de hierro; DRH, diabética con restricción de hierro; NSH, normoglucémica suplementadas con hierro; DSH, diabéticas suplementadas con hierro. Los resultados son representados como la media \pm E.E. ANOVA, Tukey, letras diferentes representan diferencias entre grupos ($p \leq 0.05$). DE, dieta estándar, DRH, dieta con restricción de hierro; DSH, dieta suplementada con hierro.

6.3. Efecto de la restricción y suplementación en el potencial de membrana mitocondrial en riñones

Para evaluar el efecto de la restricción o suplementación de hierro en la dieta en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), se determinó utilizando dos sustratos respiratorios, dependiente de G+M o succinato, como se muestra en la figura 5. Se mostró un incremento significativo en el $\Delta\Psi_m$ en mitocondrias pertenecientes al grupo diabético con G+M, como con succinato, con respecto al grupo normoglucémico control, ambos grupos (normoglucémicos y diabéticos) con restricción no mostraron diferencias con el grupo normoglucémico control, mientras que ambos grupos (normoglucémicos y diabéticos) con suplementación de hierro mostraron un incremento significativo del $\Delta\Psi_m$ (fig. 5).

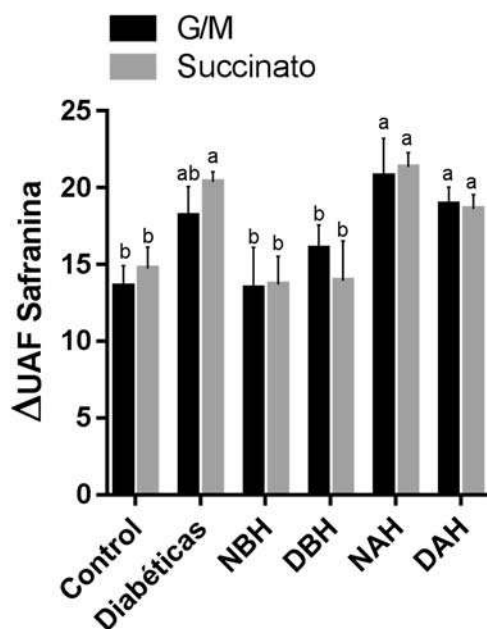


Figura 5. Efecto de la restricción y suplementación de hierro en el potencial de membrana mitocondrial de ambos riñones. ■ Mitocondrias energizadas con glutamato + malato 10 mM (G+M), ■ Mitocondrias energizadas con succinato 10 mM. NRH, normoglucémica con restricción de hierro; DRH, diabética con restricción de hierro; NSH, normoglucémica suplementadas con hierro; DSH, diabéticas suplementadas con hierro. Los resultados son representados como la media \pm E.E. ANOVA, Tukey, letras diferentes representan diferencias entre grupos ($p \leq 0.05$) DE, dieta estándar, DRH, dieta con restricción de hierro; DSH, dieta suplementada con hierro

6.4. Efecto de la restricción y suplementación de hierro en la dieta en la actividad de los complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial en riñones

Para determinar el impacto de las dietas de hierro en la actividad de la cadena de transporte de electrones (CTE), se evaluó la actividad de los complejos proteicos como se muestra en la figura 7. Se encontró un moderado incremento en la actividad de los complejos I y II en mitocondrias del grupo diabético, con respecto al grupo control (fig. 6A, 6B). Mientras que el grupo diabético con restricción de hierro, no mostró diferencia en la actividad del complejo I, con respecto al grupo control y mostró una disminución significativa en la actividad del complejo II, con respecto al grupo diabético. Además, se encontró una disminución significativa en la actividad en el segmento II+III y el complejo IV) en el grupo diabético (fig. 6C, D). Esta disminución en la actividad del segmento II+III es restaurada en el grupo diabético con restricción de hierro, no así la actividad del complejo IV, mientras que en el grupo normoglucémico suplementado con hierro, las actividades de los complejos no se modificaron, con respecto al grupo control. El grupo diabético suplementado con hierro mostró al igual que el grupo diabético, un incremento en la actividad de los complejos I y II, y un incremento en la actividad en el segmento II+III y en el complejo IV (fig. 6A, B, C, D).

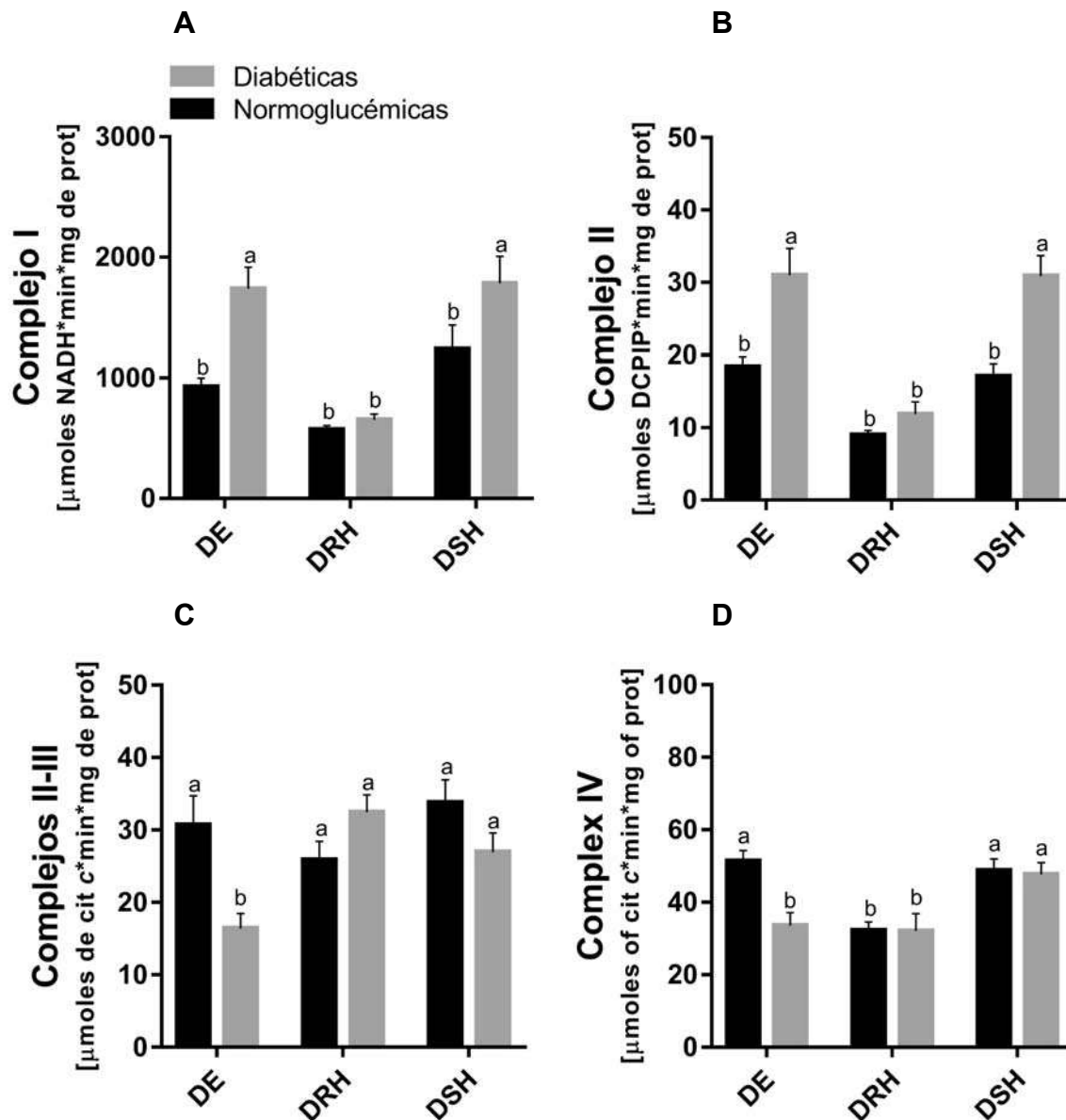


Figura 6. Efecto de la restricción y suplementación de hierro en la actividad de los complejos de la CTE. (A) Actividad del Complejo I, NADH: Ubiquinona oxidorreductasa; (B) Actividad del Complejo II, succinato deshidrogenasa; (C) Actividad del Complejo III, ubiquinol-citocromo c reductasa; (D) Actividad del Complejo IV, citocromo c oxidasa. Los resultados son representados como la media \pm E.E. ANOVA, Tukey, letras diferentes representan diferencias entre grupos ($p < 0.05$). DE, dieta estándar, DRH, dieta con restricción de hierro; DSH, dieta suplementada con hierro.

6.5. Efecto de la restricción y suplementación de hierro en la dieta en la producción de especies reactivas de oxígeno en mitocondrias de riñones

La producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en mitocondrias aisladas de ambos riñones (fig. 7) mostraron un incremento dos veces mayor en la producción de ERO, con respecto a las ratas normoglucémicas control, al energizarse con G+M. Resultados similares se obtuvieron con el grupo de ratas diabéticas con suplementación de hierro. Por otra parte, el grupo de ratas diabéticas con restricción de hierro mostró una disminución significativa del $\approx 40\%$ en la producción de ERO, con respecto al grupo diabético a valores cercanos a los del grupo normoglucémico control. Los grupos normoglucémicos con restricción y suplementación de hierro no mostraron modificación en la producción de ERO con respecto al grupo control.

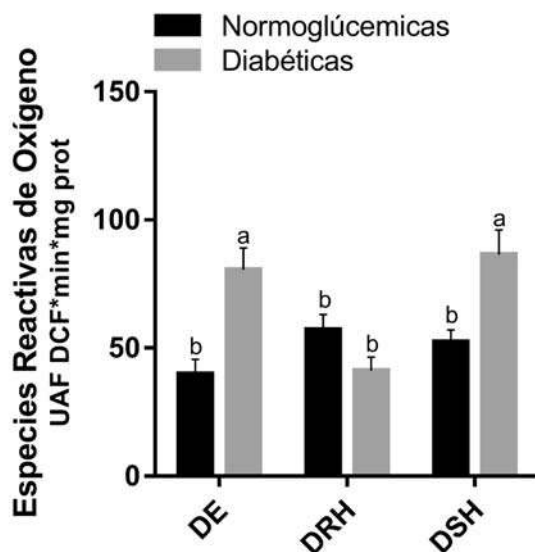


Figura 7. Efecto en la producción de especies reactivas de oxígeno mitocondrial. Los resultados son representados como la media \pm E.E. ANOVA, Tukey, letras diferentes representan diferencias entre grupos ($p \leq 0.05$). DE, dieta estándar, DRH, dieta con restricción de hierro; DSH, dieta suplementada con hierro

6.6. Efecto de la diabetes experimental, la restricción y suplementación de hierro en los niveles de hierro *no*-hémico mitocondrial de riñones

Para estudiar cambios en la acumulación de hierro mitocondrial se determinaron los niveles de hierro *no*-hémico utilizando dos enfoques por espectrometría de absorción atómica de llama (FAAS) y colorimetría como se muestran en las figuras 8A y 8B, r. Las ratas del grupo diabético mostraron un incremento de 2.5 veces en el contenido de hierro *no*-hémico mitocondrial en ambos enfoques. Mientras que las ratas diabéticas con restricción de hierro mostraron niveles similares a los del grupo control.

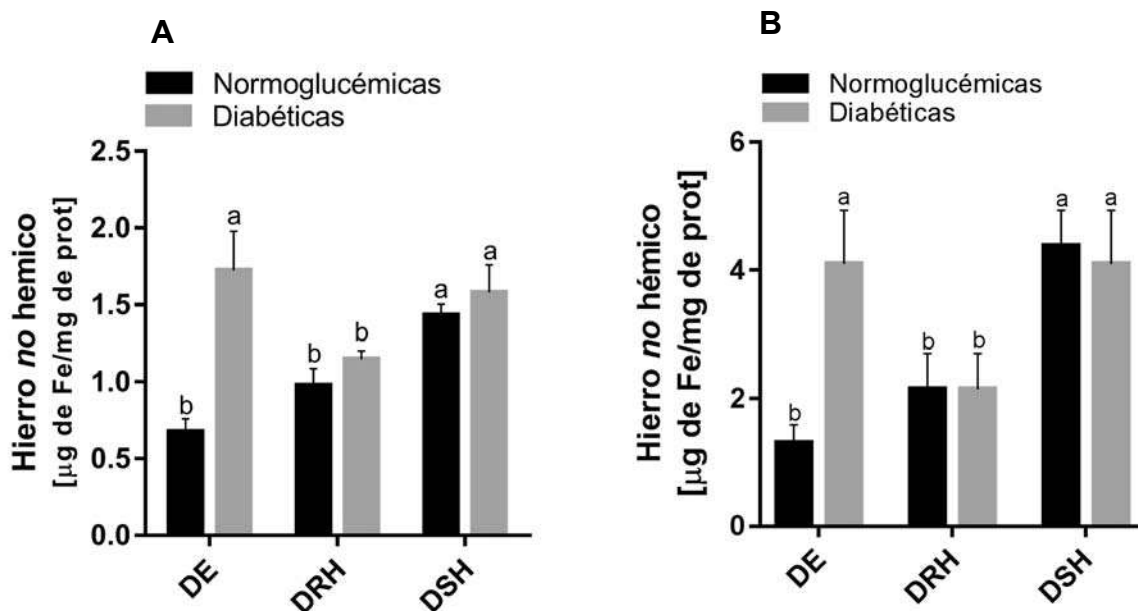


Figura 8. Efecto de la diabetes experimental y la restricción o suplementación de hierro en los niveles de hierro mitocondrial. **(A)** Colorimétrico, **(B)** FAAS. Los resultados son representados como la media \pm E.E. ANOVA, Tukey, letras diferentes representan diferencias entre grupos ($p \leq 0.05$). DE, dieta estándar, DRH, dieta con restricción de hierro; DSH, dieta suplementada con hierro.

6.7. Efecto de la restricción y suplementación de hierro en la dieta en la actividad y los niveles de expresión de la superóxido dismutasa mitocondrial en riñones

La actividad y los niveles de expresión de SOD2 en mitocondrias aisladas en el grupo diabético, mostró una disminución significativa de la actividad (fig. 9A), con respecto al grupo control, sin embargo, los niveles de expresión son semejantes (fig. 9B). Por otra parte, la actividad de la SOD2 en los grupos normoglucémico con restricción de hierro, así como normoglucémicos y diabéticos suplementados con hierro, no mostraron modificación, con respecto al grupo control en la actividad de la SOD2, ni modificación en los niveles de expresión, mientras que en el grupo diabético con restricción de hierro incremento los niveles de expresión como de la actividad de la SOD2. No obstante, en el grupo diabético suplementado con hierro mostró un incremento en los niveles de expresión sin que incrementara la actividad de esta.

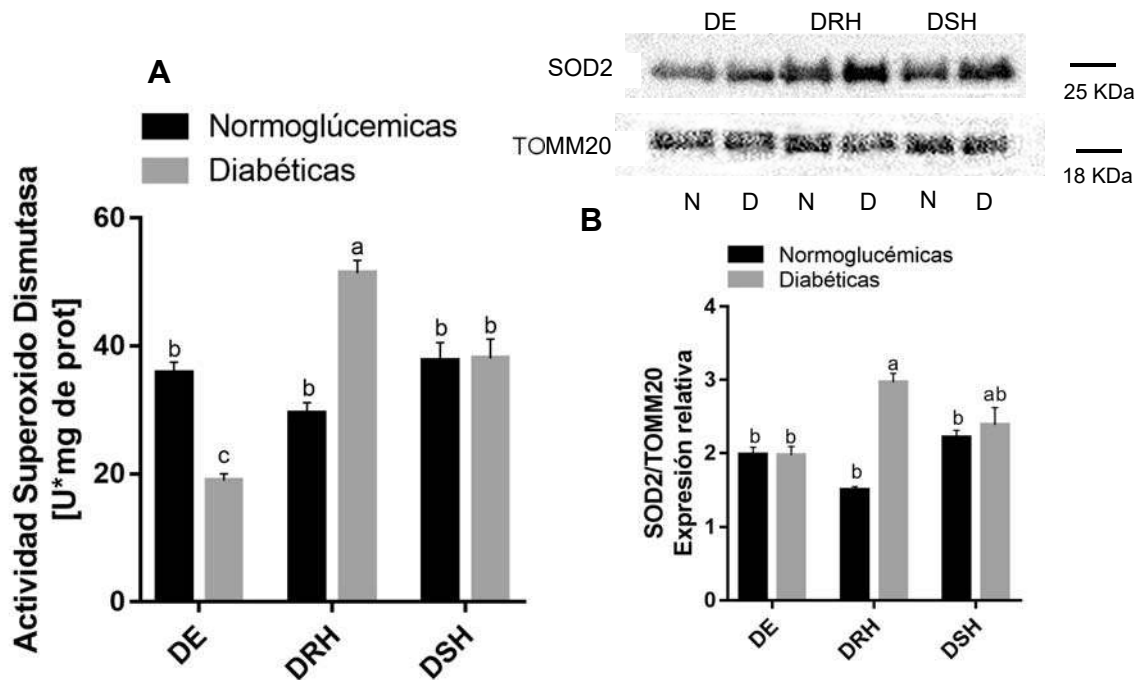


Figura 9. Efecto de la restricción y suplementación de hierro en la actividad y expresión de la SOD2. **(A)** Actividad de SOD2, **(B)** Niveles de expresión relativa de SOD2. Los resultados son representados como la media \pm E.E. ANOVA, Tukey, letras diferentes representan diferencias entre grupos ($p \leq 0.05$). DE, dieta estándar, DRH, dieta con restricción de hierro; DSH, dieta suplementada con hierro.

6.8. Efecto de la restricción y suplementación de hierro en la dieta en los niveles de peroxidación de lípidos y carbonilación de proteínas

Para estudiar si la restricción o suplementación de hierro poseen un efecto sobre el estrés oxidante mitocondrial, se determinaron los niveles de peroxidación de lípidos y carbonilación de proteínas como biomarcadores de estrés oxidante en mitocondrias de ambos riñones (fig. 10A, fig. 10B, respectivamente). Se observó un incremento del $\approx 68\%$ en los niveles de peroxidación de lípidos en el grupo diabético, con respecto al grupo control. Este incremento también se observó en el grupo diabético suplementado con hierro del $\approx 90\%$. El grupo diabético con restricción de hierro mostró una disminución del $\approx 45\%$. Además, se encontró un incremento en el contenido de proteínas carboniladas en los grupos diabético de dos veces, y en ambos grupos suplementados con hierro, (1 y 0.5 veces, respectivamente) con respecto al grupo control mientras que la restricción de hierro en la dieta disminuye el contenido de proteínas carboniladas ocasionado por la diabetes en un $\approx 60\%$.

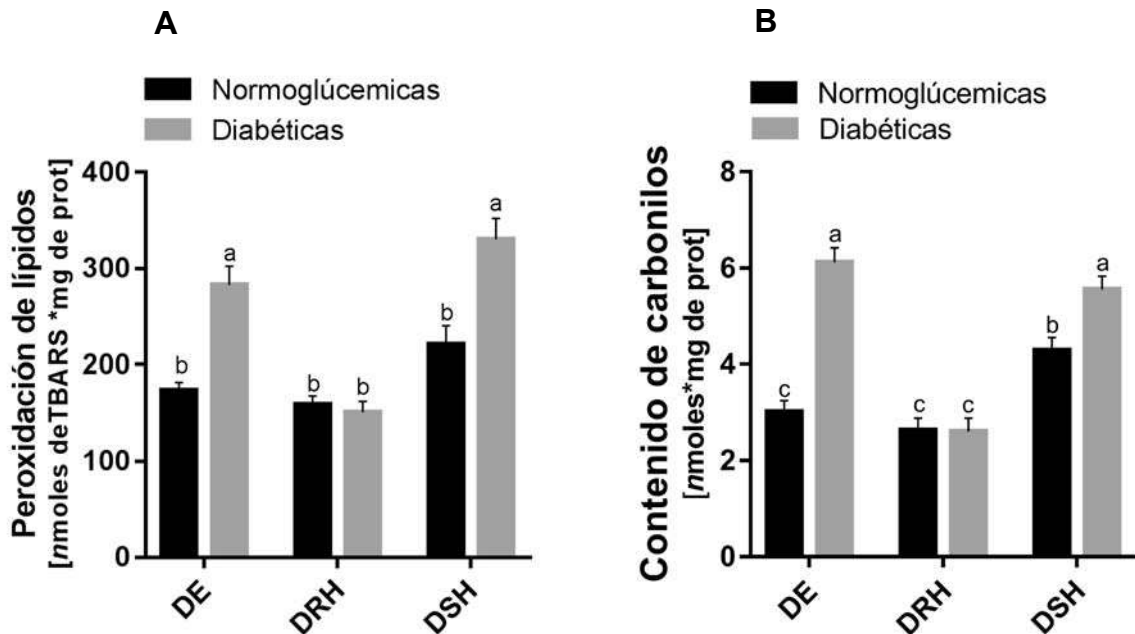


Figura 10. Efecto de la restricción y suplementación de hierro en el estrés oxidativo mitocondria. **(A)** Niveles de peroxidación de lípidos, **(B)** niveles de carbonilación de proteínas. Los resultados son representados como la media \pm E.E. ANOVA, Tukey, letras diferentes representan diferencias entre grupos ($p \leq 0.05$). DE, dieta estándar, DRH, dieta con restricción de hierro; DSH, dieta suplementada con hierro.

6.9. Efecto de la restricción y suplementación de hierro en la dieta en los niveles glutatión total, oxidado y reducido en mitocondrias de riñones

Para determinar el estado y contenido de glutatión, se determinaron los niveles de glutatión total, oxidado y reducido, así como la relación GSH/GSSG como se muestra en la figura 11. En ningún grupo se observaron modificaciones en el nivel de glutatión total mitocondrial, con respecto al grupo control (fig. 11A). El grupo diabético mostró un incremento de 2 veces en los niveles de GSSG_m, con respecto al grupo control. De esta misma forma, el grupo diabético suplementado con hierro, mostró un incremento de 3.5 veces GSSG_m. Los grupos normoglucémicos con restricción y suplementación de hierro no mostraron modificaciones en los niveles de GSSG_m. Mientras que el grupo diabético con restricción de hierro mostró una disminución de 2 veces en los niveles de GSSG_m, con respecto al grupo diabético a valores similares a los del grupo control ($p < 0.9909$) (fig. 11B). Los niveles de glutatión reducido mitocondrial (GSH_m) en el grupo diabético, muestran una disminución de 3 veces con respecto al grupo control. En los grupos normoglucémicos con restricción y suplementación de hierro no se encontraron modificaciones, con respecto al grupo control en los niveles de GSH_m. A su vez, los grupos diabético con restricción de hierro y suplementación no mostró una disminución en los niveles de GSH_m, con respecto al grupo control y al mismo tiempo un incremento con respecto el grupo diabético (fig. 11C). Además, se calculó la relación entre el GSH_m y el GSSG_m como se muestra en la figura 11D. el grupo diabético mostró una disminución en el cociente debido a un incremento en los niveles de GSSG_m con respecto al GSH_m, mientras que durante la restricción de hierro tanto en el grupo normoglucémico como en el diabético no se observaron diferencias con respecto al grupo control. Ambos grupos (normoglucémico y diabético), no mostraron modificaciones estadísticamente significativas en la relación GSH/GSSG con respecto al control ($p = 0.613$ y 0.355 , respectivamente), pero sí con respecto al grupo diabético.

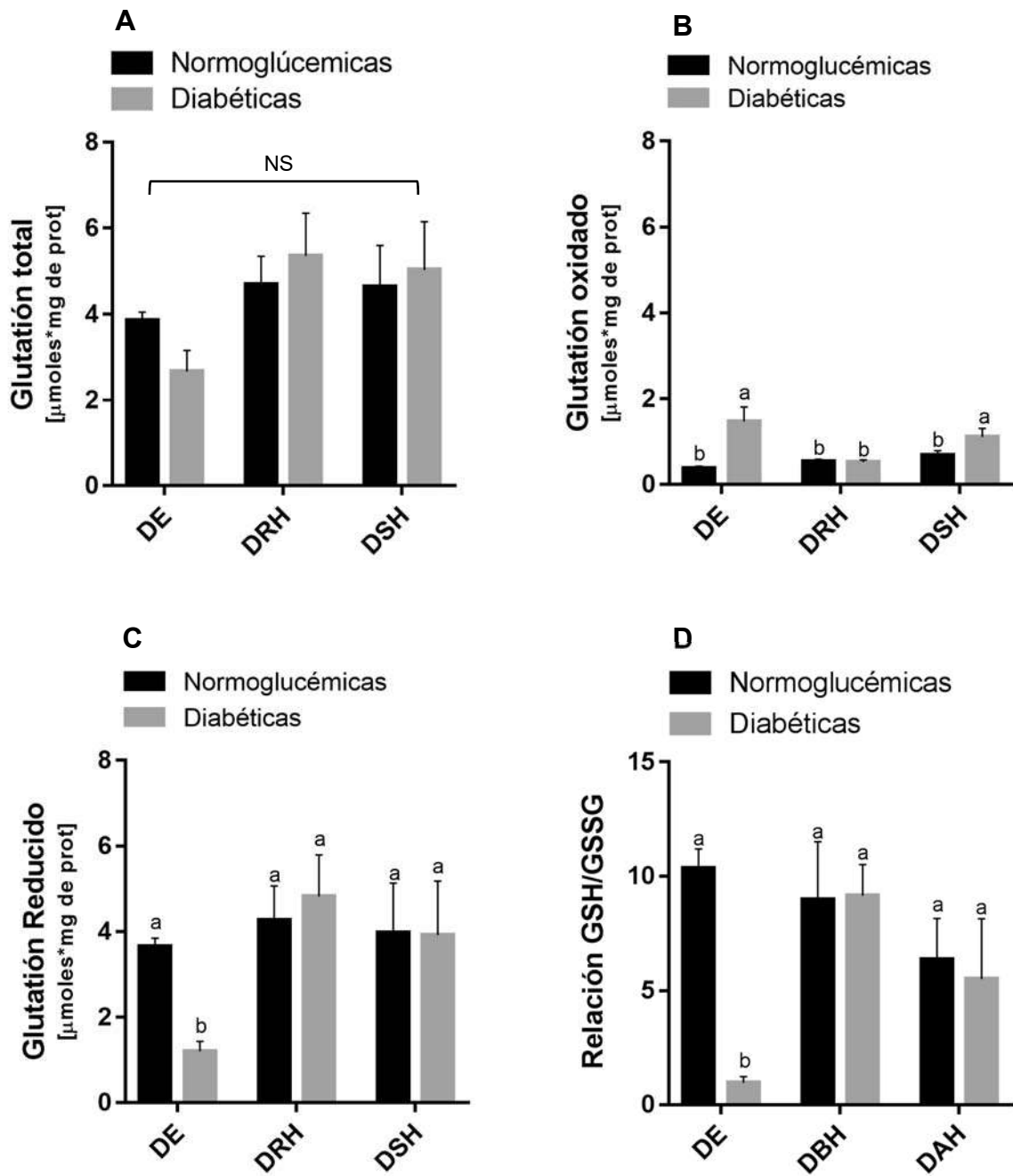


Figura 11. Efecto de la restricción y la suplementación de hierro en los niveles de glutatión en mitocondrias. **(A)** Niveles de glutatión total; **(B)** Glutatión oxidado (GSSG); **(C)** Glutatión reducido (GSH); **(D)** Relación GSH/GSSG. Los resultados son representados como la media \pm E.E. ANOVA, Tukey, letras diferentes representan diferencias entre grupos, NS, no existen diferencias estadísticas ($p < 0.05$). DE, dieta estándar, DRH, dieta con restricción de hierro; DSH, dieta suplementada con hierro.

7. DISCUSIÓN

Previamente, se ha reportado que una restricción de hierro en animales con diabetes mejora considerablemente los efectos deletéreos de la enfermedad, mejorando tanto la secreción, como la sensibilidad a la insulina (Minamiyama *et al.*, 2010; Cooksey *et al.*, 2010; Marqués-Ibarra *et al.*, 2016). Por otra parte, la exposición materna durante la gestación por el uso de suplementos de hierro y en edades tempranas, así como, la sobrecarga de hierro, se encuentran asociadas con la aparición de diabetes mellitus tanto tipo 1 como tipo 2, asimismo con la aparición de complicaciones durante la diabetes (Fernandez-Real *et al.* 2005; Simcox y McClain, 2013; Størdal *et al.*, 2018). Recientemente, la ERD es considerada como la causa más común de ERT y la causa más importante de morbilidad y mortalidad en pacientes con DM (OMS, 2017). Un incremento en los niveles de hierro renal se ha reportado durante la diabetes tanto en humanos, así como en roedores con diabetes experimental y síndrome metabólico; además, se ha observado que un incremento en los niveles de hierro como en la β -talasemia aceleran la aparición de la ERD. Este incremento en los niveles de hierro a nivel renal está correlacionado con los niveles de proteinuria, y el incremento de productos de desecho como la creatinina, urea y otros marcadores de fallo renal en la diabetes (Harris *et al.*, 1995; Nankivell *et al.*, 1995; Domínguez *et al.*, 2015). Este incremento en los niveles de creatinina y urea (tabla 2) y la prevención en el incremento de estos a través de la restricción de hierro en la dieta se ha reportado en roedores diabetes y ERT, junto con una disminución en los niveles de proteinuria y de la presión sanguínea sistólica (Ikeda *et al.*, 2012; Matsumoto *et al.*, 2013; Naito *et al.*, 2017).

En este estudio, se reporta por primera vez que la diabetes experimental con STZ incrementa los niveles de hierro *no*-hémico mitocondrial en riñones (fig. 6A, B) lo que indica que la diabetes es causal de una aceleración en la sobrecarga de hierro en mitocondrias, que puede ser atribuido a defectos en el manejo del hierro vía IRP1/2 y un incremento en la absorción de hierro debido a la disminución en la síntesis de hepcidina (Ward *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2014; Gosh *et al.*, 2015). Asimismo, se ha reportado un incremento particular en los niveles de hierro mitocondrial en enfermedades crónicas degenerativas y en el envejecimiento en

diversos órganos como el cerebro, corazón e hígado, y este incremento en los niveles de hierro mitocondrial está estrechamente relacionado con la disfuncionalidad mitocondrial a nivel de fosforilación oxidativa y daños oxidativos en órganos altamente demandantes de energía, como en la enfermedad de Huntington y en la ataxia de Friedrich (Puccio *et al.*, 2001; Seo *et al.*, 2013, Agrawal *et al.*, 2018), mientras que la quelación de hierro promueve una mejoría en la funcionalidad mitocondrial y un rescate de los procesos cognoscitivos afectados en la enfermedad de Huntington y alteraciones motoras (Agrawal *et al.*, 2018). Las modificaciones hemodinámicas, el estrés oxidante, los daños oxidativos y la modificación en la actividad de enzimas antioxidantes, así como el incremento en la producción de ERO, juegan un papel importante en la patogénesis de la ERD (Forbes *et al.*, 2008, Broedbaek *et al.*, 2011). Además, las anomalías en la funcionalidad mitocondrial son un componente común en la fisiopatología de la enfermedad, ya que la energética mitocondrial se encuentra alterada en la diabetes, así como alteraciones en los complejos de la CTE. Estas modificaciones, aunado al incremento en la utilización de O₂ en el medio diabético para sostener la demanda energética y la función renal, son fundamentales para la formación de ERO, contribuyendo a un incremento en la generación de ERO a nivel citosólico y mitocondrial (Raza, 2011; Galvan *et al.*, 2017; Forbes y Thorburn, 2018). Por tanto, hipotetizamos que la disminución en los niveles de hierro en la dieta restaura la funcionalidad mitocondrial en el medio diabético, mientras que un incremento a través de la suplementación incrementa los daños oxidativos. En el presente estudio, se encontró un incremento en la actividad de los complejos mitocondriales I y II (fig. 6A, 6B) en el grupo diabético, así como en ambos grupos suplementados con hierro. Este incremento en el grupo diabético puede deberse a un incremento en el flujo de electrones en la mitocondria debido a la carga excesiva de sustrato por la hiperglucemia y la excesiva demanda de oxígeno en los riñones para sostener la producción de ATP y mantener la función renal (Raza *et al.*, 2011, Schiffer y Friederich-Persson, 2017).

El incremento en la actividad del complejo II en las ratas suplementadas con hierro (fig. 6B), además puede ser causado por un incremento en la expresión y la

actividad del complejo II que ha sido reportado durante la sobrecarga de hierro, así como de otras proteínas pertenecientes al TCA, como la aconitasa, a través de la regulación de la expresión por los elementos de respuesta al hierro (IRE) (Templeton y Liu, 2003). Este incremento de la actividad de los complejos I y II es revertido en el grupo diabético con restricción de hierro, la modulación de la actividad del complejo I, ha sido reportado que promueve una mejoría en el estado redox, a través de la normalización del potencial de membrana, mientras que una modulación en la actividad del complejo II durante la diabetes contribuye a normalizar la producción de ERO y el potencial de membrana mitocondrial (Nishikawa *et al.*, 2010; Starkov y Fiskum, 2003; Zhang *et al.*, 2015). Este incremento de la actividad de los complejos de la CTE se relaciona directamente con un incremento en el consumo de oxígeno mitocondrial en el grupo diabético (fig. 4). Esto se ha reportado como parte de la disminución en la eficiencia metabólica y una alta demanda de oxígeno en el riñón (Hansell *et al.*, 2018). Igualmente, se ha reportado una disminución en la actividad del complejo III mitocondrial en riñones durante la diabetes debido a modificaciones postraduccionales relacionadas con el estrés oxidante, la cual se encuentra estrechamente relacionada con un incremento en la producción mitocondrial de ERO (Rosca *et al.*, 2005; Munusamy *et al.*, 2009; Raza *et al.*, 2011; Ortiz-Ávila *et al.*, 2013; Ortiz-Ávila *et al.*, 2017), y esta disminución de la actividad en el complejo III es prevenida tanto en el grupo con restricción de hierro, como en el grupo con el suplemento de hierro; no obstante, la normalización en la actividad del complejo III en el grupo diabético suplementado con hierro, no logra disminuir la producción de ERO (fig. 7). Esto puede deberse a un incremento del flujo de electrones desde los complejos I y II propiciando un incremento en la vida media de la ubisemiquinona en respuesta acumulativa en el complejo III y IV (Turens, 1985). Mientras que esta restauración en la función de los complejos mitocondriales se relaciona con una disminución en la producción de ERO en el grupo diabético con restricción de hierro, así como una disminución del potencial de membrana mitocondrial e incrementando el cociente respiratorio mitocondrial (figs. 7, 5, 4C). Una disminución en la producción de ERO y una restauración de la funcionalidad y homeostasis mitocondrial puede revertir el daño celular y la función

renal en la ERD (Bhargava y Schnellmann, 2017). Estos resultados sugieren que la restricción de hierro crónica contribuye disminuyendo los daños mitocondriales en riñones de ratas con diabetes experimental, lo que sugiere un efecto preventivo al disminuir el estrés oxidante disminuyendo los niveles peroxidación de lípidos, carbonilación y la producción de ERO y restaurando la relación GSH:GSSG e incrementando la actividad de la SOD2. Este resultado se relaciona con las observaciones en las que, al disminuir los niveles de hierro en el organismo, se previenen las lesiones a nivel renal y el estrés oxidante (Ikeda *et al.*, 2012), así como, una disminución de lesión del túbulo intersticial renal inducida por una sobrecarga de proteína. Estos efectos pueden ser explicados, además, por una inhibición en la señalización de los receptores a mineralocorticoides y al lograr una mejoría en las modificaciones hemodinámicas en la ERD, así como el estrés oxidante a través de la inhibición de la actividad de la NADPH oxidasa, al disminuir la expresión de la subunidad p22^{phox} (Tajima *et al.*, 2011; Naito *et al.*, 2012; Naito *et al.*, 2013). Adicionalmente, se ha reportado que la óxido nítrico sintasa (NOS) en riñón y en la vasculatura, se encuentra regulada positivamente en ratas con deficiencia de hierro incrementando la reactividad vascular (Ni *et al.*, 1997).

En contraste, la suplementación crónica de hierro incrementa los daños oxidantes en mitocondrias de riñones de ratas con diabetes experimental, además de incrementar la producción de ERO (fig. 7), y esta sobreproducción en el grupo diabético suplementado con hierro no logra ser contrarrestada por los sistemas antioxidantes mitocondriales como el GSH y SOD2 (fig. 11, 9) en riñones de ratas mientras que la suplementación de hierro en el grupo normoglucémico solamente incrementó el contenido de carbonilos (fig. 10B) sin incrementar los niveles de peroxidación de lípidos (fig. 10A), y sin modificar el estatus del glutatión mitocondrial (fig. 11). Además encontramos una disminución en la actividad de SOD2 pese a un incremento en los niveles de expresión en el grupo diabético suplementado con hierro, esto sugiere una inactivación de la SOD2 relacionada con el incremento de hierro en el organismo en el contexto diabético, esto ha sido reportado previamente durante condiciones de estrés o perturbaciones en la homeostasis del hierro en la que existe competitividad entre el manganeso y el hierro por el sitio de unión de la

apo-SOD2 e inactivando la enzima (Yang *et al.*, 2006; Culotta *et al.*, 2006). Estas observaciones sugieren una asociación directa entre el contenido de hierro en la alimentación, la disfuncionalidad mitocondrial y el estrés oxidante durante la diabetes mellitus experimental con STZ en mitocondrias de riñones.

8. CONCLUSIÓN

En conjunto, estos resultados demuestran que la diabetes experimental incrementa los niveles de hierro mitocondrial, y que la disminución en los niveles de hierro mitocondrial a través de una restricción de hierro en la dieta, restaura la funcionalidad mitocondrial y previene los daños oxidativos en mitocondrias de riñones de ratas.

9. PERSPECTIVAS

- Estudiar la participación de la frataxina y la ferritina mitocondrial durante la enfermedad renal diabética
- Estudiar el efecto de la restricción de hierro sobre los niveles de expresión de proteínas de la cadena de transporte de electrones y su regulación
- Determinar el efecto de la restricción de hierro en la morfología mitocondrial y mitofagia durante la diabetes
- Determinar el efecto del hierro en la SOD2 y apo-SOD2 de mamíferos
- Estudiar el efecto en diferentes segmentos de la nefrona en un modelo de diabetes tipo 2 utilizando un agente quelante
- Estudiar las modificaciones en la funcionalidad mitocondrial dependientes del sexo (macho y hembra) durante la restricción de hierro utilizando un agente quelante en un modelo de diabetes tipo 2.

10. REFERENCIAS

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

MCBE-IIQB

- Althoff, T., Mills, D. J., Popot, J. L., & Kühlbrandt, W. (2011). Arrangement of electron transport chain components in bovine mitochondrial supercomplex I1III2IV1. *J Eur Mol Biol Org*, 30(22), 4652-4664.
- Anderson, S., Rennke, H. G., & Brenner, B. M. (1986). Therapeutic advantage of converting enzyme inhibitors in arresting progressive renal disease associated with systemic hypertension in the rat. *J Clin Invest* (6), 1993-2000.
- Balaban, R. S., Nemoto, S., & Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120(4), 483-495.7
- Beilschmidt, L. K., & Puccio, H. M. (2014). Mammalian Fe–S cluster biogenesis and its implication in disease. *Biochimie*, 100, 48-60.
- Bhargava, P., y Schnellmann, R. G. (2017). Mitochondrial energetics in the kidney. *Nat Rev Nephrol*, 13(10), 629.
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414(6865), 813.
- Capaldi, R. A. (1990). Structure and function of cytochrome c oxidase. *Annu Rev Biochem*, 59(1), 569-596.
- Cecchini, G. (2003). Function and structure of complex II of the respiratory chain *Annu Rev Biochem*, 72(1), 77-109.
- Chen, S., Wolf, G., & Ziyadeh, F. N. (2001). The renin-angiotensin system in diabetic nephropathy. In: *The Renin-angiotensin System and Progression of Renal Diseases* (Vol. 135, pp. 212-221). Karger Publishers.
- Conigliaro, A., Costa, V., Amato, R., & Mancone, C. (2017). Data on the effects of low iron diet on serum lipid profile in HCV transgenic mouse model. *Data Brief*, 12, 22-25.
- Cooksey, R. C., Jones, D., Gabrielsen, S., Huang, J., Simcox, J. A., Luo, B., ... & McClain, D. A. (2010). Dietary iron restriction or iron chelation protects from diabetes and loss of β -cell function in the obese (ob/ob lep^{-/-}) mouse. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298(6), E1236-E1243.
- Cooper, M. E. (1998). Pathogenesis, prevention, and treatment of diabetic nephropathy. *Lancet*, 352(9123), 213-219.
- Cortés-Rojo, C., Calderón-Cortés, E., Clemente-Guerrero, M., Manzo-Ávalos, S., Uribe, S., Boldogh, I., & Saavedra-Molina, A. (2007). Electron transport chain of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria is inhibited by H₂O₂ at succinate-cytochrome c oxidoreductase level without lipid peroxidation involvement. *Free Radic Res*. 41(11), 1212-1223.

MCBE-IIQB

Crichton, R. (2016). Iron metabolism: from molecular mechanisms to clinical consequences. John Wiley & Sons Editorial. pp. 17-58.

Culotta, V. C., Yang, M., & O'Halloran, T. V. (2006). Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 1763(7), 747-758.

D'Autréaux, B., & Toledano, M. B. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(10), 813-824.

De Piña, M. Z., Villalobos-Molina, R., Saavedra-Molina, A., Riveros-Rosas, H., & Pina, E. (1989). Effects of moderate chronic ethanol consumption on rat liver mitochondrial functions. *Alcohol.* 6(1), 3-7.

Dizdaroglu, M., & Jaruga, P. (2012). Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Res,* 46(4), 382-419.

Dizdaroglu, M., Rao, G., Halliwell, B., & Gajewski, E. (1991). Damage to the DNA bases in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of ferric and cupric ions. *Arch Biochem Biophys.* 285(2), 317-324.

Dodd, R. C., & Davidson, A. J. (2016). Kidney Development, Disease, Repair and Regeneration, pp. 5-16.

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

Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev,* 82(1), 47-95.

Duck, K. A., & Connor, J. R. (2016). Iron uptake and transport across physiological barriers. *Biometals.* 29(4), 573-591.

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

Fernández-Real, J. M., Lopez-Bermejo, A., & Ricart, W. (2005). Iron stores, blood donation, and insulin sensitivity and secretion. *Clin Chem.* 51(7), 1201-1205.

Forbes, J. M., & Thorburn, D. R. (2018). Mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 14(5), 291.

Forbes, J. M., Coughlan, M. T., & Cooper, M. E. (2008). Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes,* 57(6), 1446-1454.

MCBE-IIQB

Franchini, M., Targher, G., Capra, F., Montagnana, M., & Lippi, G. (2008). The effect of iron depletion on chronic hepatitis C virus infection. *Hepatol Int*, 2(3), 335-340.

Fumeron, F., Péan, F., Driss, F., Balkau, B., Tichet, J., Marre, M., & Grandchamp, B. (2006). Ferritin and transferrin are both predictive of the onset of hyperglycemia in men and women over 3 years: the data from an epidemiological study on the Insulin Resistance Syndrome (DESIR) study. *Diabetes Care*, 29(9), 2090-2094.

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

Gheith, O., Farouk, N., Nampoory, N., Halim, M. A., & Al-Otaibi, T. (2016). Diabetic kidney disease: world wide difference of prevalence and risk factors. *J Nephroarmacol*. 5(1), 49.

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

Graf, E., Mahoney, J. R., Bryant, R. G., & Eaton, J. W. (1984). Iron-catalyzed hydroxyl radical formation. Stringent requirement for free iron coordination site. *J Biol Chem*. 259(6), 3620-3624.

Handy, D. E., Lubos, E., Yang, Y., Galbraith, J. D., Kelly, N., Zhang, Y. Y., ... & Loscalzo, J. (2009). Glutathione peroxidase-1 regulates mitochondrial function to modulate redox-dependent cellular responses *J Biol Chem*. 284(18), 11913-11921.

Hansell, P., Welch, W. J., Blantz, R. C., & Palm, F. (2013). Determinants of kidney oxygen consumption and their relationship to tissue oxygen tension in diabetes and hypertension. *Clin and Exp Pharmacol and Physiol*. 40(2), 123–137.

Harris, D. C., Tay, Y. C., Chen, J. U. C. H. U. A. N., Chen, L. I. G. U. A. N. G., & Nankivell, B. J. (1995). Mechanisms of iron-induced proximal tubule injury in rat remnant kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 269(2), F218-F224.

Hebert SC, Reilly Jr RF, Kriz W. (2001). Structural-functional relationships in the kidney. In: Schrier RW, editor. Diseases of the kidney and the urinary tract. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001. pp. 1035–67.

Heeney, M. M., & Andrews, N. C. (2004). Iron homeostasis and inherited iron overload disorders: an overview. *Hematol Oncol Clin North*. 18(6), 1379-1403.

Helal, I., Fick-Brosnahan, G. M., Reed-Gitomer, B., & Schrier, R. W. (2012). Glomerular hyperfiltration: definitions, mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8(5), 293-300.

MCBE-IIQB

Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U., Galy, B., & Camaschella, C. (2010). Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell*. 142(1), 24-38.

Hostetter, T. H. (2003). Hyperfiltration and glomerulosclerosis. In *Seminars in nephrol* (Vol. 23, No. 2, pp. 194-199). WB Saunders.

Ikeda, Y., Enomoto, H., Tajima, S., Izawa-Ishizawa, Y., Kihira, Y., Ishizawa, K., ... & Tamaki, T. (2012). Dietary iron restriction inhibits progression of diabetic nephropathy in db/db mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 304(7), F1028-F1036.

Ikeda, Y., Horinouchi, Y., Hamano, H., Hirayama, T., Kishi, S., Izawa-Ishizawa, Y., ... & Ishizawa, K. (2017). Dietary iron restriction alleviates renal tubulointerstitial injury induced by protein overload in mice. *Sci Rep*. 7(1), 10621.

Inoue, S., & Kawanishi, S. (1987). Hydroxyl radical production and human DNA damage induced by ferric nitrilotriacetate and hydrogen peroxide. *Cancer Res*. 47(24 Part 1), 6522-6527.

Kaplan, J., Ward, D. M., & De Domenico, I. (2011). The molecular basis of iron overload disorders and iron-linked anemias. *Int J Hematol*. 93(1), 14-20.

Kawanami, D., Matoba, K., & Utsunomiya, K. (2016). Signaling pathways in diabetic nephropathy. *Histol Histopathol*. 31(10), 1059-1067.

Korshunov S. S., Skulachev V. P., & Starkov A. A. (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett*. 416:15–18.

Lambert A. J., Brand M. D. (2004) Superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane. *Biochem J*. 382:511–517.

Lane, D. J. R., Merlot, A. M., Huang, M. H., Bae, D. H., Jansson, P. J., Sahni, S., ... & Richardson, D. R. (2015). Cellular iron uptake, trafficking and metabolism: key molecules and mechanisms and their roles in disease. *Acta Mol Cell Res*, 1853(5), 1130-1144.

Lash, L. (2015). Mitochondrial glutathione in diabetic nephropathy. *J Clin Med*. 4(7), 1428-1447.

Lill, R., Dutkiewicz, R., Freibert, S. A., Heidenreich, T., Mascarenhas, J., Netz, D. J., ... & Srinivasan, V. (2015). The role of mitochondria and the CIA machinery in the maturation of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins. *Eur J Cell Biol*. 94(7-9), 280-291.

Lushchak, V. I. (2012). Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J Amino Acids*. 2012, 1-26.

MCBE-IIQB

Marí, M., Morales, A., Colell, A., García-Ruiz, C., Kaplowitz, N., & Fernández-Checa, J. C. (2012). Mitochondrial glutathione: features, regulation and role in disease. *Biochim Biophys Acta*. 1830(5), 3317-28.

Márquez-Ibarra, A., Huerta, M., Villalpando-Hernández, S., Ríos-Silva, M., Díaz-Reval, M. I., Cruzblanca, H., ... & Trujillo, X. (2016). The effects of dietary iron and capsaicin on hemoglobin, blood glucose, insulin tolerance, cholesterol, and triglycerides, in healthy and diabetic Wistar rats. *PLoS one*, 11(4), e0152625.

Martínez-Castelao, A., Navarro-González, J. F., Górriz, J. L., & de Alvaro, F. (2015). The concept and the epidemiology of diabetic nephropathy have changed in recent years. *J Clin Med*, 4(6), 1207-1216.

Minamiyama Y, Takemura S, Kodai S, Shinkawa H, Tsukioka T, Ichikawa H, Naito Y, Yoshikawa T, Okada S. Iron restriction improves type 2 diabetes mellitus in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010; 298: E1140–1149.

Minamiyama, Y., Takemura, S., Kodai, S., Shinkawa, H., Tsukioka, T., Ichikawa, H., ... & Okada, S. (2010). Iron restriction improves type 2 diabetes mellitus in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 298(6), E1140-E1149.

Mishra, R., Emancipator, S. N., Kern, T., & Simonson, M. S. (2005). High glucose evokes an intrinsic proapoptotic signaling pathway in mesangial cells. *Kidney Int*. 67(1), 82-93.

Mühlenhoff, U., Hoffmann, B., Richter, N., Rietzschel, N., Spantgar, F., Stehling, O., ... & Lill, R. (2015). Compartmentalization of iron between mitochondria and the cytosol and its regulation. *Eur J Cell Biol*. 94(7-9), 292-308.

Munoz, M., Garcia-Erce, J.A., Remacha, A.F., 2011. Disorders of iron metabolism. Part II: Iron deficiency and iron overload. *J Clin Pathol*. 64, 287–296.

Munusamy, S., Saba, H., Mitchell, T., Megyesi, J. K., Brock, R. W., & MacMillan-Crow, L. A. (2009). Alteration of renal respiratory Complex-III during experimental type-1 diabetes. *BMC Endocr Disord*. 9(1), 2.

Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), 1-13.

Naito, Y., Fujii, A., Sawada, H., Hirotsu, S., Iwasaku, T., Eguchi, A., ... & Masuyama, T. (2012). Effect of iron restriction on renal damage and mineralocorticoid receptor signaling in a rat model of chronic kidney disease. *J Hypertens*, 30(11), 2192-2201.

MCBE-IIQB

- Naito, Y., Fujii, A., Sawada, H., Hirotsu, S., Iwasaku, T., Okuhara, Y., ... & Masuyama, T. (2013). Dietary iron restriction prevents further deterioration of renal damage in a chronic kidney disease rat model. *J Hypertens*, 31(6), 1203-1213.
- Nankivell, B. J., Tay, Y. C., Boadle, R. A., & Harris, D. C. H. (1994). Lysosomal iron accumulation in diabetic nephropathy. *Renal failure*, 16(3), 367-381.
- Ni, Z., Morcos, S., & Vaziri, N. D. (1997). Up-regulation of renal and vascular nitric oxide synthase in iron-deficiency anemia. *Kidney Int.* 52(1), 195-201.
- Nicholls, D. G. (2013). *Bioenergetics*. Academic Press.
- Nishikawa T., Edelstein D., Du X. L., Yamagishi S., Matsumura T., Kaneda Y. & Giardino, I. (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 404, 787–790.
- Ortiz-Avila O., Sámano-García C. A., Calderón-Cortés E., et al. Dietary avocado oil supplementation attenuates the alterations induced by type I diabetes and oxidative stress in electron transfer at the complex II-complex III segment of the electron transport chain in rat kidney mitochondria. *J Bioenerg Biomembr.* 2013;45(3):271–287.
- Ortiz-Avila, O., Esquivel-Martínez, M., Olmos-Orizaba, B. E., Saavedra-Molina, A., Rodríguez-Orozco, A. R., & Cortés-Rojo, C. (2015). Avocado oil improves mitochondrial function and decreases oxidative stress in brain of diabetic rats. *J Diabetes Res.* 2015: 1-9.
- Pain, D., Dancis, D., 2014. Fe/S cluster assembly and regulation in yeast. In: Rouault, T. (Ed.), *Iron–Sulfur Clusters in Chemistry and Biology*. Walter de Gruyter GmbH, Berlin/Boston, pp. 367–410.
- Papanikolaou, G., Tzilianos, M., Christakis, J. I., Bogdanos, D., Tsimirika, K., MacFarlane, J., ... & Nemeth, E. (2005). Heparin in iron overload disorders. *Blood*. 105(10), 4103-4105.
- Pilo, F., & Angelucci, E. (2017). A storm in the niche: Iron, oxidative stress and haemopoiesis. *Blood Rev.* 32(1), 29-35.
- Pitocco, D., Tesouro, M., Alessandro, R., Ghirlanda, G., & Cardillo, C. (2013). Oxidative stress in diabetes: implications for vascular and other complications. *Int J Mol Sci.* 14(11), 21525-21550.
- Premaratne, E., Verma, S., Ekinci, E. I., Theverkalam, G., Jerums, G., & MacIsaac, R. J. (2015). The impact of hyperfiltration on the diabetic kidney. *Diabetes Metabol.* 41(1), 5-17.
- Punthakee, Z., Goldenberg, R., Katz, P., & Diabetes Canada Clinical Practice Guidelines Expert Committee. (2018). Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes, Prediabetes and Metabolic Syndrome. *Can J Diabetes.* 42, S10-S15.

MCBE-IIQB

Quijano C., Castro L., Peluffo G., Valez V., Radi R. (2007). Enhanced mitochondrial superoxide in hyperglycemic endothelial cells: direct measurements and formation of hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293, H3404–H3414.

Quinlan, C. L., Treberg, J. R., & Brand, M. D. (2011). Handbook of the Biology of Aging. pp. 47-61.

Remuzzi, A., Puntorieri, S., Brugnetti, B., Bertani, T., & Remuzzi, G. (1991). Renoprotective effect of low iron diet and its consequence on glomerular hemodynamics. *Kidney Int.* 39(4), 647-652.

Ribas, V., García-Ruiz, C., & Fernández-Checa, J. C. (2014). Glutathione and mitochondria. *Front Pharmacol.* 5, 151.

Rich, P. R., & Maréchal, A. (2010). The mitochondrial respiratory chain. *Essays Bioch.* 47, 1-23.

Riemer, J., Hoepken, H. H., Czerwinska, H., Robinson, S. R., & Dringen, R. (2004). Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells. *Anal Biochem.* 331(2), 370-375.

Rosca M. G., Mustata T. G., Kinter M. T., Ozdemir A. M., Kern T. S., Szweda L. ... (2005). Glycation of mitochondrial proteins from diabetic rat kidney is associated with excess superoxide formation. *Am J Physiol Renal Physiol.* 289, F420–F430.

Rouault, T. A. (2012). Biogenesis of iron-sulfur clusters in mammalian cells: new insights and relevance to human disease. *Dis Model Mech.* 5(2), 155-164.

Saavedra-Molina, A., & Devlin, T. M. (1997). Effect of extra-and intra-mitochondrial calcium on citrulline synthesis. *Amino Acids*, 12(3-4), 293-298.

Schiffer, T. A., & Friederich-Persson, M. (2017). Mitochondrial reactive oxygen species and kidney hypoxia in the development of diabetic nephropathy. *Front Physiol.* 8, 211.

Sharma, K., Deelman, L., Madesh, M., Kurz, B., Ciccone, E., Siva, S., ... & Ma, X. (2003). Involvement of transforming growth factor- β in regulation of calcium transients in diabetic vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 285(6), F1258-F1270.

Starkov, A. A., & Fiskum, G. (2003). Regulation of brain mitochondrial H₂O₂ production by membrane potential and NAD (P) H redox state. *J Neurochem.* 86(5), 1101-1107.

Stockwell, B. R., Friedmann Angeli, J. P., Bayir, H., Bush, A. I., Conrad, M., Dixon, S. J. ... (2017). Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease. *Cell.* 171, 273–285.

Størdal, K., McArdle, H. J., Hayes, H., Tapia, G., Viken, M. K., Lund-Blix, N. A., ... & Njølstad, P. R. (2018). Prenatal iron exposure and childhood type 1 diabetes. *Sci Rep.* 8(1), 9067.

MCBE-IIQB

Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., ... & Rao, Z. (2005). Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell*. 121(), 1043-1057.

Swaminathan, S., Fonseca, V. A., Alam, M. G., & Shah, S. V. (2007). The role of iron in diabetes and its complications. *Diabetes Care*, 30(7), 1926-1933.

Tajima, S., Ikeda, Y., Sawada, K., Yamano, N., Horinouchi, Y., Kihira, Y., ... & Minakuchi, K. (2011). Iron reduction by deferoxamine leads to amelioration of adiposity via the regulation of oxidative stress and inflammation in obese and type 2 diabetes KKAY mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 302(1), E77-E86.

Templeton, D. M., & Liu, Y. (2003). Genetic regulation of cell function in response to iron overload or chelation. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 1619(2), 113-124.

Teruya, R., Ikejiri, A. T., Somaio Neto, F., Chaves, J. C., Bertolotto, P. R., Taha, M. O., & Fagundes, D. J. (2013). Expression of oxidative stress and antioxidant defense genes in the kidney of inbred mice after intestinal ischemia and reperfusion. *Acta Bras Cir*. 28(12), 848-855.

Tervaert, T. W. C., Mooyaart, A. L., Amann, K., Cohen, A. H., Cook, H. T., Drachenberg, C. B., ... & Joh, K. (2010). Pathologic classification of diabetic nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 21(4), 556-563.

Tervaert, T. W. C., Mooyaart, A. L., Amann, K., Cohen, A. H., Cook, H. T., Drachenberg, C. B., ... & Joh, K. (2010). Pathologic classification of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 21(4) 556-563.

Tesch, G. H., & Allen, T. J. (2007). Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy (Methods in Renal Research). *Nephrology*, 12(3), 261-266.

Thomson, S. C., Vallon, V., & Blantz, R. C. (2004). Kidney function in early diabetes: the tubular hypothesis of glomerular filtration. *Am J Physiol Renal Physiol*. 286(1), F8-F15.

Tsuchida, K. I., Cronin, B., & Sharma, K. (2002). Novel aspects of transforming growth factor-beta in diabetic kidney disease. *Nephron*. 92(1), 7-21.

Turrens, J. F., Alexandre, A., & Lehninger, A. L. (1985). Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys*. 237(2), 408-414.

Vinod, P. B. (2012). Pathophysiology of diabetic nephropathy. *Clinical Queries: Nephrology*, 1(2), 121-126.

Wang, H., Li, H., Jiang, X., Shi, W., Shen, Z., & Li, M. (2014). Hepcidin is directly regulated by insulin and plays an important role in iron overload in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*, 63(5), 1506-1518.

MCBE-IIQB

- Ward, D. T., Hamilton, K., Burnand, R., Smith, C. P., Tomlinson, D. R., & Riccardi, D. (2005). Altered expression of iron transport proteins in streptozotocin-induced diabetic rat kidney. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 1740(1), 79-84.
- Wehr, N. B., & Levine, R. L. (2013). Quantification of protein carbonylation. *Cell Senescence: Methods and Protocols*, 265-281.
- Weisiger, R. A., & Fridovich, I. (1973). Mitochondrial superoxide dismutase site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem.* 248(13), 4793-4796.
- Wills, E. D. (1969). Lipid peroxide formation in microsomes. Relationship of hydroxylation to lipid peroxide formation. *Biochem J.* 113(2), 333-341.
- Wolf, G., Butzmann, U., & Wenzel, U. O. (2003). The renin-angiotensin system and progression of renal disease: from hemodynamics to cell biology. *Nephron Physiol.* 93(1), p3-p13.
- Yang, M., Cobine, P. A., Molik, S., Naranuntarat, A., Lill, R., Winge, D. R., & Culotta, V. C. (2006). The effects of mitochondrial iron homeostasis on cofactor specificity of superoxide dismutase 2. *EMBO J.* 25(8), 1775-1783.
- Zhang, L., Zhang, S., Maezawa, I., Trushin, S., Minhas, P., Pinto, M., ... & Kanekiyo, T. (2015). Modulation of mitochondrial complex I activity averts cognitive decline in multiple animal models of familial Alzheimer's disease. *EBioMedicine*, 2(4), 294-305.