



**INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR
de Ciudad Hidalgo**

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA POLIDATINA EN LA
ACTIVIDAD DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE
ELECTRONES, Y LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES
REACTIVAS DE OXÍGENO EN MITOCONDRIAS DE HÍGADO
DE RATA WISTAR”**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA BIOQUÍMICA

PRESENTA:

ITZEL REYNA BOLAÑOS

ASESOR ACADEMICO:

D.C. CHRISTIAN CORTES ROJO

CO-ASESORA:

YHOANA LAURA LEON MARQUEZ

CD. HIDALGO, MICH. SEPTIEMBRE, 2026

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En ciudad Hidalgo, Michoacán el día 25 del mes de septiembre del año 2026, el (la) que suscribe Itzel Reyna Bolaños.

Alumno(a) del programa de Ingeniería Bioquímica con **número de control** B16030386, manifiesta que es autor(a) intelectual del trabajo de tesis bajo la dirección del D.C. Christian Cortés Rojo y cede los derechos del trabajo intitulado “Evaluación del efecto de la polidatina en la actividad de la cadena de transporte de electrones, y la producción de especies reactivas de oxígeno en mitocondrias de hígado de rata wistar” al TecNM / Instituto Tecnológico Superior de Ciudad Hidalgo para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráfico o de datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y del director del trabajo. Este puede obtenerse escribiendo a la siguiente dirección: **subdireccion_academica@cdhidalgo.tecnm.mx**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá expresar su agradecimiento correspondiente y citar la fuente.



Itzel Reyna Bolaños

Nombre y Firma



INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE CIUDAD HIDALGO

Lugar y fecha: Ciudad Hidalgo, Michoacán a 10 de septiembre del 2026

Asunto: Liberación de proyecto para la Titulación Integral

C. SALVADOR OROZCO MONTES

JEFE (A) DE DIVISIÓN DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

P R E S E N T E

Por este medio informo que ha sido liberado el siguiente proyecto para la titulación Integral

Nombre del estudiante y/o egresado:	Itzel Reyna Bolaños
Carrera:	Ingeniería Bioquímica
Número de control:	B16030386
Nombre del Proyecto	"Evaluación del efecto de la polidatina en la actividad de la cadena de transporte de electrones, y la producción de especies reactivas de oxígeno en mitocondrias de hígado de rata wistar"
Producto:	Tesis Profesional

Agradezco de antemano su valioso apoyo en esta importante actividad para la formación profesional de nuestros egresados.

ATENTAMENTE

 Yhoana L. León Márquez	 Cynthia V. Bartolo Guzmán	 Irving Hernández Hernández
Nombre y firma del asesor	Nombre y firma del revisor	Nombre y firma del revisor

Dedicatoria

A **Dios**, por su infinito amor y sabiduría que ha manifestado conmigo durante todo este tiempo. “Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente; no temas ni desmayes, porque Jehová tu Dios estará contigo en donde quiera que vayas” Josué 1:9.

A mis padres **Héctor y Karina**, por todo su apoyo, confianza y motivación a lo largo de toda mi formación académica. Gracias por sus consejos, por escucharme y darme todo lo necesario para poder llegar a este momento tan importante en mi vida. Este logro también es de ustedes.

A **Leonardo Aldair**, por todo su amor incondicional durante todos estos años. Eres de gran bendición en mi vida.

A mi hermana **Jarintzy Yunuén**, por ser mi compañera de vida y de formación académica durante. Hemos compartido momentos alegres y de tristezas, pero siempre nos tenemos la una a la otra.

A mis abuelitas **Lolita y Gloria**, por su apoyo y cariño incondicional.

Agradecimientos

Al **Instituto Tecnológico Superior de Ciudad Hidalgo** por formarme como profesionalista durante todos estos años en el área de Ingeniería Bioquímica.

Al **Dr. Christian Cortés**, por su apoyo, confianza, consejos, amistad y conocimiento brindado durante todo este tiempo. Gracias por permitirme ser parte de su gran equipo de investigación.

A mi amiga **Paola** por ser mi compañera y por su valiosa amistad durante todo este tiempo, por los momentos alegres y difíciles que atravesamos para llegar a este momento.

A mis asesoras **IBQ Cynthia Bartolo y M.C. Yhoana León** por brindarme sus conocimientos y asesorías a lo largo de mi formación académica y en la realización de este trabajo.

A mis compañeras de laboratorio **Marce, Eridani, Paola y Marlen** por todos los momentos inolvidables y su apoyo. Mi estancia no hubiera sido lo mismo sin ustedes.

Resumen

Las mitocondrias tienen gran importancia debido a las funciones esenciales que realizan en la célula como es la generación de ATP y respiración celular. Dichas funciones son llevadas a cabo por los complejos que integran la cadena de transporte de electrones CTE mediante reacciones de oxido- reducción. Debido a esto, se consideran una de las principales generadoras de Especies reactivas de oxígeno ERO, las cuales son moléculas producidas continuamente como subproductos del metabolismo aerobio de los organismos, y al generarse una alta producción pueden dañar biomoléculas importantes como el ADN, lípidos y proteínas, generar estrés oxidativo y además de desencadenar un proceso de muerte celular conocido como apoptosis.

No obstante, los antioxidantes son compuestos que ayudan a neutralizar la producción de ERO por lo tanto el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antioxidante de la polidatina, en la producción de ERO y la actividad de los cuatro complejos de la CTE, utilizando mitocondrias de hígado de rata sujetas a estrés oxidativo inducido por Fe^{2+} . La polidatina es un polifenol que ha tenido gran relevancia en los últimos años por sus efectos antioxidantes y antiinflamatorios en enfermedades crónico degenerativas. Los resultados mostraron ese efecto antioxidante de la polidatina al restablecer la actividad de los cuatro complejos de la CTE incluso a niveles iguales o mayores al control. En el complejo I, la actividad aumentó 1.98 veces, 1.43 veces en el complejo II, 4.88 veces en el complejo III y 2.65 en el caso del complejo IV. En condiciones de Fe^{2+} y polidatina. Con base a estos resultados se puede argumentar que la polidatina disminuyó la generación de ERO y restableció la actividad de los cuatro complejos de la CTE, lo que resalta la capacidad antioxidante y protectora de esta molécula en mitocondrias sujetas al estrés oxidativo.

Índice

Índice de figuras	1
Introducción	2
2. Antecedentes	4
2.1. Composición y estructura de la mitocondria	4
2.2. Especies reactivas de oxígeno	4
2.3. Estrés oxidativo	6
2.4. Cadena de transporte de electrones	6
2.4.1. Complejo I NADH deshidrogenasa o NADH:ubiquinona oxidoreductasa.....	7
2.4.2. Complejo II succinato deshidrogenasa o succinato: ubiquinona oxidoreductasa	8
2.4.3. Complejo III ubiquinol:citocromo c oxidoreductasa.....	9
2.4.4. Complejo IV citocromo c oxidasa.....	11
2. 5. Enfermedades relacionadas con las ERO en el hígado.....	11
2.6. Terapias con antioxidantes	11
2.7. Antioxidante polidatina.....	12
3. Justificación.....	14
4. Hipótesis	15
5. Objetivos.....	15
5.1. Objetivo general	15
5.2. Objetivos específicos.....	15
6. Materiales y métodos	16
6.1. Modelo experimental	16
6.2. Aislamiento de mitocondrias	16
6.3. Tratamientos.....	16
6.4. Determinación de la actividad de los complejos de la CTE.....	17
6.4.1. Complejo I	17
6.4.2. Complejo II	18
6.4.3. Complejo III.....	18
6.4.4. Complejo IV	18
6.5. Especies reactivas de oxígeno	19
6.6 Análisis estadístico.....	19
7. Resultados.....	20
7.1. Efecto de la polidatina en la inhibición de la actividad de los complejos de la CTE por el estrés oxidativo	20

7.2 Efectos de la polidatina en la producción de ERO en mitocondrias sujetas a estrés oxidativo	24
9. Conclusión	28
Bibliografía.....	29
Anexos	33

Índice de figuras

Figura 1. Cadena de transporte de electrones (Tomado y modificado de Kadenbach, 2012).	7
Figura 2. Estructura de la NADH:ubiquinona oxidoreductasa o complejo I. Tomado de (L. Nelson & M. Cox, 2009).	8
Figura 3. Ciclo Q del complejo III. Tomado de (L. Nelson & M. Cox, 2009).	10
Figura 4. Estructura química de la polidatina (Q. H. Du et al., 2013).	13
Figura 5. Efecto de la polidatina en la actividad del complejo I de la CTE de mitocondrias de hígado de rata sujetas a estrés oxidativo. .	20
Figura 6. Efecto de la polidatina en la actividad del complejo II de la CTE de mitocondrias de hígado de rata sujetas a estrés oxidativo. .	21
Figura 7. Efecto de la polidatina en la actividad del complejo III de la CTE de mitocondrias de hígado de rata sujetas a estrés oxidativo. .	22
Figura 8. Efecto de la polidatina en la actividad del complejo IV de la CTE de mitocondrias de hígado de rata sujetas a estrés oxidativo..	23
Figura 9. Efecto de la polidatina en la generación de ERO de mitocondrias de hígado de rata sujetas a estrés oxidativo..	24

Introducción

Las mitocondrias son orgánulos complejos de doble membrana que desempeñan distintas funciones como el metabolismo energético, la homeostasis de calcio, la supervivencia y la muerte celular. No obstante, su principal función es generar la mayor parte de la demanda energética de la célula mediante la producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa.

El metabolismo celular comprende la utilización de carbohidratos, grasas y proteínas con el fin de obtener energía mediante algunos procesos como el catabolismo de la glucosa, la β -oxidación de ácidos grasos, y la desaminación oxidativa de los aminoácidos. Asimismo, las moléculas provenientes de estos procesos se utilizan en el ciclo de Krebs para generar sustratos que ingresen a la cadena transportadora de electrones (CTE) y se lleve a cabo la fosforilación oxidativa. A grandes rasgos, la CTE se encuentra embebida en de la membrana interna de la mitocondria (MIM) y está constituida por cuatro complejos proteicos. Parte de la CTE está en contacto con la matriz mitocondrial donde se lleva a cabo el ciclo de Krebs, en el que se genera NADH y FADH₂. Estas coenzimas reducidas donan electrones a la CTE en los complejos I y II, respectivamente. Los electrones donados por el NADH y el FADH₂ se transfieren a la coenzima Q (CoQ), un transportador liposoluble de electrones, a través de los complejos I y II, respectivamente. La CoQ reducida generada por los complejos I y II transfiere sus electrones al complejo III mediante una oxidación bifurcada llevada a cabo por un centro Fe-S del complejo III. Uno de los electrones reduce a una molécula de CoQ y el electrón restante es transferido a la subunidad citocromo *c*₁. Esta subunidad es la encargada de reducir al citocromo *c*, el cual es una proteína de transporte de electrones entre el complejo III y el complejo IV. A su vez, este último complejo une oxígeno molecular y lo reduce a H₂O con los electrones obtenidos de la oxidación del citocromo *c*. La energía obtenida por la transferencia de electrones en los complejos I, III y IV se utiliza para generar un gradiente electroquímico de H⁺ a través de la MIM, cuya energía es utilizada por una F₁F₀ ATP sintasa en la MIM para la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato (Pi) (Nolfi-Donagan et al., 2020).

El flujo de electrones en la CTE puede disminuir por el daño oxidativo en las proteínas de la CTE, en el ADN mitocondrial y en la MIM, dando lugar a la fuga de

electrones de los centros redox de los complejos y su reacción con el O_2 para producir al radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y otras especies reactivas del oxígeno (ERO) secundarias. Aproximadamente del 0.2% al 2% del oxígeno consumido por las células es convertido por las mitocondrias en ERO, haciendo de la CTE el principal sitio de producción de ERO en las células (Paradies, 2014). Las ERO se consideran subproductos tóxicos del metabolismo aeróbico y la causa principal del daño macromolecular. Las ERO generadas en la CTE pueden causar daño en sus propias proteínas y en la MIM, lo que genera un círculo vicioso de mayor producción de ERO y menor producción de ATP. A su vez, la sobreproducción de ERO estimula procesos que dañan a los tejidos en diversas enfermedades crónico-degenerativas como es el caso de la diabetes, la hipertensión, el cáncer, el síndrome metabólico, el envejecimiento, etc. (Paradies, 2014).

A este respecto, se han identificado algunos compuestos con acción antioxidante en plantas que se utilizan en la medicina tradicional en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo mitocondrial. Un ejemplo es la polidatina, también llamada Piceid, la cual es proveniente de la planta *Polygonum cuspidatum* Sieb. Se ha comprobado que la polidatina a través de sus propiedades antiinflamatorias, antiapoptóticas y antioxidantes tiene un efecto protector en diversas enfermedades como la diabetes, trastornos del aprendizaje, discapacidades cardíacas, isquemia cerebral, daño hepático, así como en otras enfermedades neurodegenerativas (Koneru et al., 2017). Sin embargo, no es claro si el efecto protector de la polidatina contra el daño mitocondrial en condiciones de estrés oxidativo esté relacionado directamente con la protección de la actividad de los complejos de la CTE contra el estrés oxidativo, y por consecuencia, una disminución de la producción de ERO en la CTE. Por lo tanto, se pretende evaluar el efecto protector de la polidatina contra el daño oxidativo en la actividad de la CTE y la producción de ERO en la mitocondria.

2. Antecedentes

2.1. Composición y estructura de la mitocondria

Las mitocondrias son orgánulos citoplasmáticos los cuales llevan a cabo un papel fundamental en la síntesis de ATP, el equilibrio redox y otros procesos biológicos como la homeostasis de iones, la expresión de genes nucleares, el recambio de proteínas, la modificación postraducciona de proteínas y la apoptosis (Bozi et al., 2020). Cada mitocondria se compone de un aproximado de 800 a 1000 copias de ADNmt que se heredan de la madre y se empaquetan en nucleoproteínas (Bhatti et al., 2017).

De igual manera, la mitocondria consta de dos membranas, una externa (MEM) y una interna (MIM), las cuales cumplen importantes funciones. En la MEM ocurre un intercambio de metabolitos con el citosol, mientras que la MIM contribuye a que las mitocondrias no liberen agentes nocivos hacia el citosol como ERO y ADNmt (Bartolák-Suki et al., 2017). La MIM es impermeable a la mayoría de iones, ácidos orgánicos y moléculas polares para poder mantener la diferencia de cargas eléctricas que constituyen el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) necesario para la síntesis de ATP y el transporte activo de metabolitos hacia la matriz. Asimismo, en el espacio que rodea la MIM se localiza la matriz mitocondrial donde se lleva a cabo el ciclo de Krebs, el cual produce NADH y FADH para suplir de electrones a los complejos I y II, respectivamente. Los electrones se mueven a lo largo de los complejos respiratorios de la CTE, mientras que los protones se transportan desde la matriz hacia el espacio intermembrana a través de los complejos I, III y IV con la energía de las reacciones redox de los complejos, generando una diferencia de cargas, denominado $\Delta\psi_m$ y un gradiente de protones que genera una diferencia de pH a través de la MIM, los cuales en conjunto se denominan fuerza protonmotriz (Bartolák-Suki et al., 2017).

2.2. Especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son moléculas que se forman de oxígeno, el cual, al reducirse de manera monovalente en el metabolismo oxidativo

mitocondrial, formando especies químicas altamente reactivas e inestables (Kudryavtseva AV et al., 2016).

Entre las principales ERO se destacan el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($OH^{\bullet}$), el oxígeno singulete ($^1O_2$) y el ácido hipocloroso ($HOCl$) (Viada Pupo Esther et al., 2017).

La formación de las ERO se basa principalmente en dos procesos: la reducción monovalente del O_2 y la activación de las NADPH oxidasas, las cuales son enzimas cuya actividad catalítica es la producción de radical $O_2^{\bullet-}$ utilizando NADPH como donador de electrones. La mayoría de las ERO se generan a través del escape de electrones de la CTE mitocondrial, dando lugar a la reducción del O_2 por la CoQ para formar $O_2^{\bullet-}$, el cual se convierte espontanea o enzimáticamente a H_2O_2 y $OH^{\bullet}$ (Hardeland, 2017).

Las ERO son resultantes de la transferencia de energía al ATP y de electrones al oxígeno, siendo altamente reactivas y dañinas para los organismos vivos. Las ERO como el $^1O_2$, el $O_2^{\bullet-}$, el H_2O_2 y el $OH^{\bullet}$ son intermediarios esenciales en algunos procesos fisiológicos como lo son la fotosíntesis, la respiración y señalización celular. Además, los niveles dentro de las células están controlados a través de enzimas tales como la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa, la catalasa y antioxidantes como el ácido ascórbico, la cisteína, el glutatión, la bilirrubina y los carotenoides (Wu et al., 2014).

Asimismo, las ERO al producirse de manera inevitable en organismos fotosintéticos causan daño oxidativo al reaccionar con biomoléculas, pero también tienen la función de actuar como señales celulares (Mattila et al., 2015). Las acciones biológicas de las ERO son selectivas debido a que su reactividad depende de las condiciones de reacción, por ejemplo, algunas ERO como el $OH^{\bullet}$ que al tener una actividad química muy alta son capaces de oxidar la mayoría de las moléculas orgánicas. En cuanto al H_2O_2 tiene una reactividad moderada, lo que le permite migrar lejos del sitio de producción (Mattila et al., 2015)

2.3. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es un desequilibrio entre la producción de ERO y la capacidad de los sistemas antioxidantes de neutralizarlas. La CTE mitocondrial es una de las principales fuentes de ERO nocivas como lo es el anión radical $O_2^{\cdot-}$ responsable del estrés oxidativo en función de la edad (Janikiewicz et al., 2018). Afecta principalmente componentes celulares como lípidos, proteínas y ADN. Además, está relacionado con diversas enfermedades degenerativas como lo son la diabetes, cáncer, trastornos cardiovasculares o enfermedades neurodegenerativas (Cichoz-Lach & Michalak, 2014).

2.4. Cadena de transporte de electrones

La CTE (Figura 1) cumple un papel importante en el metabolismo energético celular y es el sitio donde se lleva a cabo la fosforilación oxidativa. Se encuentra situada en la MIM y se conforma de cuatro complejos enzimáticos los cuales son una NADH: ubiquinona oxidorreductasa (NADH deshidrogenasa, CI, complejo I), una succinato: ubiquinona oxidorreductasa (CII, complejo II), ubiquinol: citocromo c oxidorreductasa (CIII o complejo III) y citocromo c oxidasa (CIV, complejo IV) (Guan et al., 2022). Están formados por diversos polipéptidos los cuales contienen una serie de cofactores redox unidos a las proteínas como lo son las flavinas (FMN o FAD en los complejos I y II, respectivamente), así como centros hierro - azufre [Fe - S] en los complejos I, II y III, además de grupos hemo en los complejos II, III, y IV) (Canizal García Melina, 2015). La CTE contiene dos transportadores de electrones móviles que son la ubiquinona (CoQ) y el citocromo c (Cit c) (Guan et al., 2022).

En la CTE los electrones donados por el NADH y el $FADH_2$ son transferidos a los complejos I y II, respectivamente. Posteriormente, estos electrones se transfieren a los complejo III y IV, el cual reduce al O_2 que es el aceptor final de electrones (Bhatti et al., 2017)

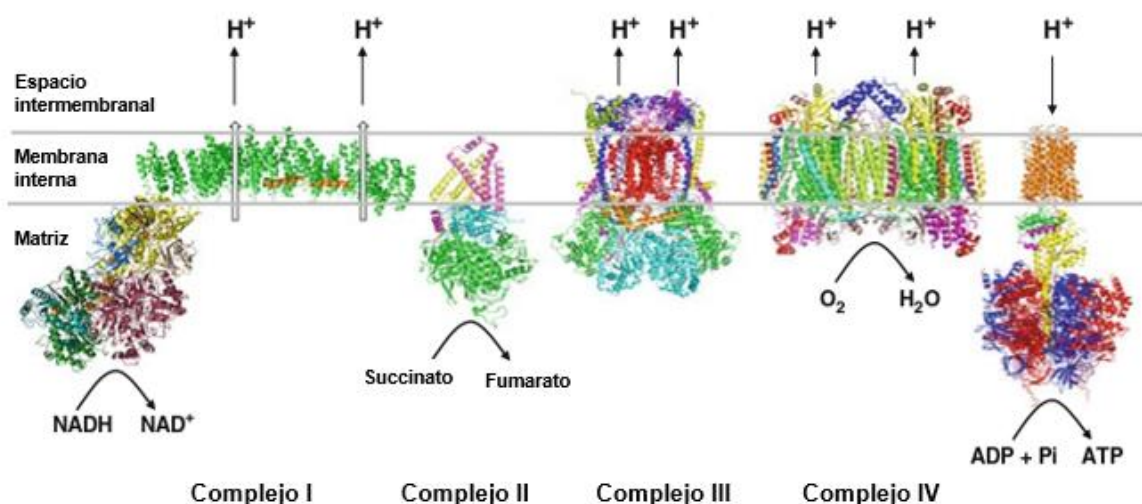


Figura 1. Cadena de transporte de electrones (Tomado y modificado de Kadenbach, 2012).

2.4.1. Complejo I NADH deshidrogenasa o NADH:ubiquinona oxidorreductasa

El complejo I (Figura 2) cumple un rol central en el metabolismo que consiste en oxidar el NADH en NAD^+ en la matriz mitocondrial, el cual es producido en el ciclo de Krebs y en la β oxidación de los ácidos grasos (Sousa et al., 2018).

En mamíferos está constituido por 45 subunidades y es la enzima más grande de la CTE. Contiene dos dominios principales: un brazo de hidrofílico que sobresale en la matriz mitocondrial, el cual transfiere electrones del NADH a la CoQ (Fernandez-Vizarra & Zeviani, 2021). A través de un grupo flavín mononucleótido (FMN) unido de manera no covalente y como cofactores redox mínimo ocho centros hierro-azufre [Fe-S]. El otro dominio es un brazo de membrana incrustado en la membrana interna el cual es responsable de la traslocación de protones (Fernandez-Vizarra & Zeviani, 2021).

El brazo hidrofílico está compuesto por siete subunidades centrales que son NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1 y NDUFV 2. El brazo de la membrana se compone de siete unidades hidrofóbicas (ND1- 6 y ND4L) codificadas por el genoma mitocondrial (Zhao et al., 2019).

El complejo I cataliza la transferencia de electrones desde el NADH localizado en la matriz mitocondrial hasta la CoQ, la cual es soluble en la membrana interna y

sirve como un transportador móvil que transferirá los electrones hacia el complejo III (Konigsberg Fainstein, 2008). El sitio de unión de la CoQ se localiza en la unión del brazo de la membrana y el brazo de la matriz. donde la CoQ se reduce a ubiquinol (QH_2) (Zhao et al., 2019). Además, se induce el transporte vectorial de cuatro protones a través de la membrana interna mitocondrial (Sousa et al., 2018a).

Al ser uno de los principales generadores de ERO, el complejo I está relacionado con diversos trastornos hereditarios y degenerativos (Wirth et al., 2016).

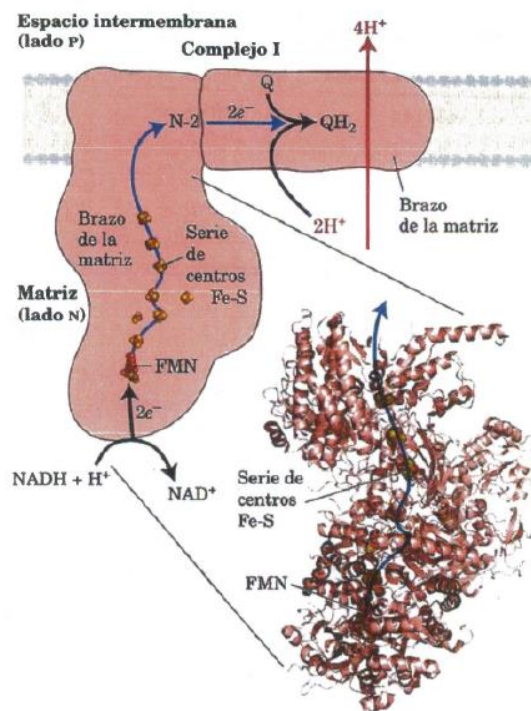


Figura 2. Estructura de la NADH:ubiquinona oxidorreductasa o complejo I. Tomado de (L. Nelson & M. Cox, 2009).

2.4.2. Complejo II succinato deshidrogenasa o succinato: ubiquinona oxidorreductasa

El complejo II es el único complejo de la CTE que no transloca protones a través de la MIM, además, forma parte del ciclo de Krebs donde cataliza la oxidación de succinato a fumarato, al igual que la reducción de CoQ a QH_2 , el cual es un sustrato para el complejo III. De este modo el complejo II es un punto de convergencia entre el ciclo de Krebs y la CTE (Sousa et al., 2018a).

Asimismo, consta de cuatro subunidades. La subunidad SDHA es la subunidad más grande y contiene un sitio activo con dinucleótido de flavina adenina (FAD) unido covalentemente, el cual acepta los electrones del succinato. La subunidad SDHB contiene tres centros hierro - azufre organizados linealmente que median la transferencia de electrones a la molécula de ubiquinona ubicada en el sitio de unión a CoQ, en conjunto con SDHB, SDHC y SDHD. Las subunidades SDHC y SDHD unen al complejo II a la MIM (Hadrava Vanova et al., 2020).

2.4.3. Complejo III ubiquinol:citocromo c oxidorreductasa

Este complejo (Figura 3) constituye la parte central de la CTE. Acepta dos electrones de la CoQ reducida (CoQH₂) transfiriendo uno al citocromo *c* a través de un conjunto de subunidades catalíticas y el otro a una molécula de CoQ a través de un citocromo *b* (Fernandez-Vizarra & Zeviani, 2021). Este complejo es un dímero simétrico con tres subunidades centrales que están muy conservadas desde bacterias hasta mamíferos. En mamíferos, pueden estar presentes hasta ocho subunidades supernumerarias para un total de 11 subunidades por monómero en la enzima de mamífero. De igual manera, se conforma de unas subunidades catalíticamente activas conservadas las cuales son el citocromo *b* (cit *b*) con dos hemo de tipo *b* (*b_L* y *b_H*), el citocromo *c*₁ (cit *c*₁), con un hemo de tipo *c*, y una proteína hierro - azufre (ISP) de Rieske que contiene un grupo [2Fe – 2S] de alto potencial redox (Sousa et al., 2018b). Estos hemos tienen diferentes afinidades electrónicas ya que se encuentran en distintos entornos polipeptídicos. Por ejemplo, el hemo *b_L*, al estar localizado en una agrupación de hélices cerca de la cara citoplasmática de la membrana, tiene menor afinidad por los electrones que el hemo *b_H* el cual se encuentra cerca del lado de la matriz (Canizal García Melina, 2015). La transferencia de electrones en este complejo se lleva mediante el ciclo Q (Figura 3), donde el QH₂ se oxida a ubisemiquinona (QH•) después de ser oxidado por el centro [2Fe – 2S] y dos protones se liberan en el espacio intermembrana. El centro [2Fe – 2S] transfiere un electrón al cit *c*₁ para posteriormente transferirlo al cit *c*. El radical QH• formado en el sitio Q_o transfiere al segundo electrón al cit *b_L* el cual lo transfiere al cit *b_H* y ya una vez reducido transfiere el electrón a la CoQ del sitio Q_i formando un radical QH•. En el último paso del ciclo Q la segunda molécula de QH₂ se oxida en el sitio Q_o y se

transfieren los otros dos protones, y un electrón se transfiere al grupo (2Fe – 2S) y el otro electrón al cit b_H y finalmente a la $QH^{\bullet-}$ para obtener QH_2 (Zhao et al., 2019).

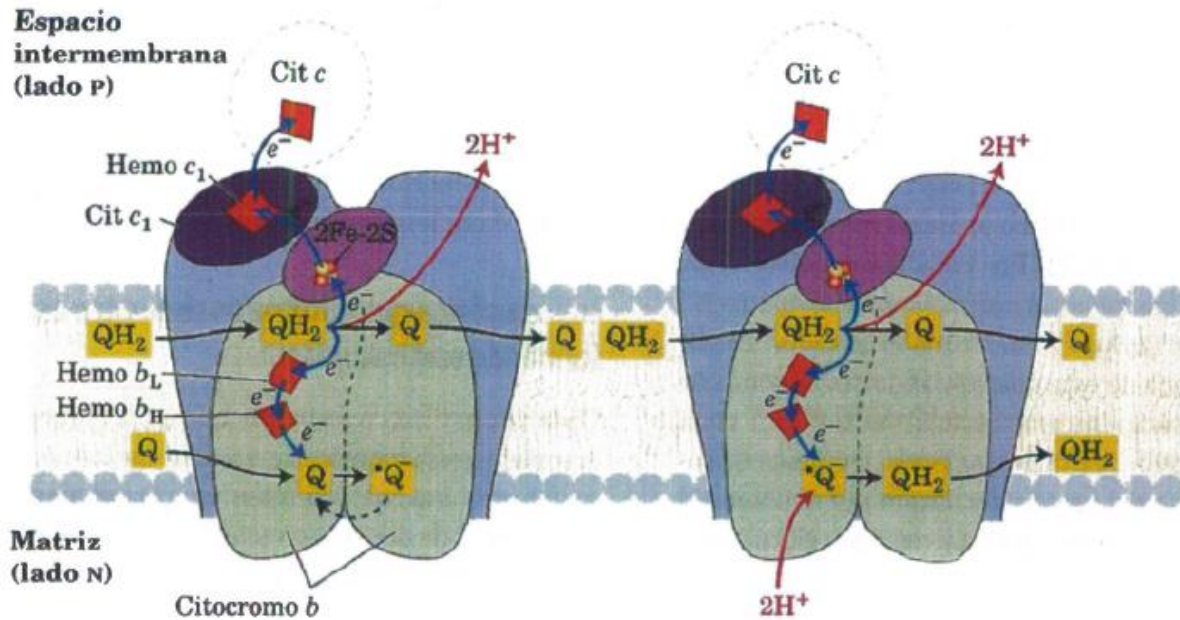


Figura 3. Ciclo Q del complejo III. Tomado de (L. Nelson & M. Cox, 2009).

2.4.4. Complejo IV citocromo c oxidasa

El complejo IV es la oxidasa terminal en la cadena respiratoria mitocondrial donde reduce el O_2 a H_2O mientras bombea protones a través de la membrana interna mitocondrial (Sousa et al., 2018b). Consta de 13 subunidades con cuatro centros metálicos redox activos. Estos centros incluyen Cu_A , un hemo de tipo a, además de un centro binuclear compuesto por un hemo a_3 y un Cu_B (Vikramdeo et al., 2022). El hemo a y a_3 tienen diferentes potenciales redox ya que se encuentran localizados en diferentes entornos dentro del complejo IV. La secuencia del flujo de electrones es desde el citocromo c $\rightarrow Cu_A \rightarrow$ hemo a $\rightarrow$ hemo $a_3 \rightarrow Cu_B \rightarrow O_2$. El hemo a_3 y el Cu_B se encuentran adyacentes y forman el centro activo donde el O_2 se reduce a H_2O (Canizal García Melina, 2015).

Asimismo, en este complejo se cataliza la transferencia de electrones del cit c reducido al aceptor final de electrones, el O_2 , en un proceso que se acopla a la traslocación de H^+ para la producción de ATP (Mansilla et al., 2018).

2. 5. Enfermedades relacionadas con las ERO en el hígado

La disfunción mitocondrial derivada del estrés oxidativo y tiene una relación muy directa con el desarrollo de diversas enfermedades como, por ejemplo, las enfermedades hepáticas las cuales son un problema médico de alta prevalencia e incidencia hoy en día, debido a que el hígado es el principal órgano desintoxicante y mantiene la homeostasis metabólica (Muriel & Gordillo, 2016). El hígado metaboliza diversos compuestos que aumentan la producción de ERO. Las ERO desempeñan un papel crucial en el desarrollo de diversas enfermedades hepáticas crónicas (Cichoz-Lach & Michalak, 2014), tales como la hepatitis viral crónica, enfermedades hepáticas alcohólicas y la esteatohepatitis no alcohólica (Li et al., 2015).

2.6. Terapias con antioxidantes

Los antioxidantes pueden ser endógenos cuando son sintetizados por el organismo. Ejemplo de ellos son la superóxido dismutasa (SOD) la cual cataliza la dismutación del radical $O_2^{\cdot -}$ para producir H_2O_2 el cual a su vez destoxificado por la

glutación peroxidasa (Gpx), la catalasa o el sistema de tiorredoxina. Existen también antioxidantes exógenos los cuales se suministran mediante la alimentación, suplementos nutricionales o productos farmacéuticos, lo cual contribuye a ralentizar el estrés oxidativo y se protege el organismo del daño por ERO (Behnaz Akbari, 2022).

Los antioxidantes previenen el daño oxidativo al donar electrones para estabilizar las ERO y disminuir sus efectos dañinos. (Behnaz Akbari, 2022). Se han diseñado antioxidantes dirigidos hacia la mitocondria mediante la inserción de un catión trifenílfosfonio que les permite su acumulación en la matriz mitocondrial debido a la carga positiva del catión y su hidrofobicidad. La suplementación de estos antioxidantes en modelos animales de hipertensión disminuye el estrés oxidativo mitocondrial, incrementa la síntesis de óxido nítrico (NO), el principal vasodilatador y disminuye la presión arterial. Esto muestra que el estrés oxidativo puede ser la causa subyacente de diversas enfermedades donde existe disfunción mitocondrial y estrés oxidativo, tales como la diabetes, la enfermedad hepática alcohólica y la enfermedad hepática no alcohólica, entre otras (Kim Hyeyoung & Kim Suhng Hyung, 2018).

2.7. Antioxidante polidatina

La polidatina también conocido como Piceid o resveratrol-3- β -mono-D-glucósido (Figura 4) es un compuesto bioactivo principal que se extrae de las raíces y los rizomas de *Polygonum cuspidatum Sieb* (Chen et al., 2019). Este compuesto también puede encontrarse en la uva, cacahuate, vinos tintos, gránulos de lúpulo y productos que contienen cacao además de numerosas dietas diarias. La polidatina se ha utilizado durante varios años en China en la medicina tradicional como un analgésico, antipirético, diurético y expectorante (Du et al., 2013). Otros de sus beneficios farmacológicos son que incluyen actividades antitumorales y antibacterianas, además de efectos protectores sobre el sistema nervioso hepático, cardiovascular y pulmonar, y efectos sobre la melanogénesis (Wu et al., 2020).

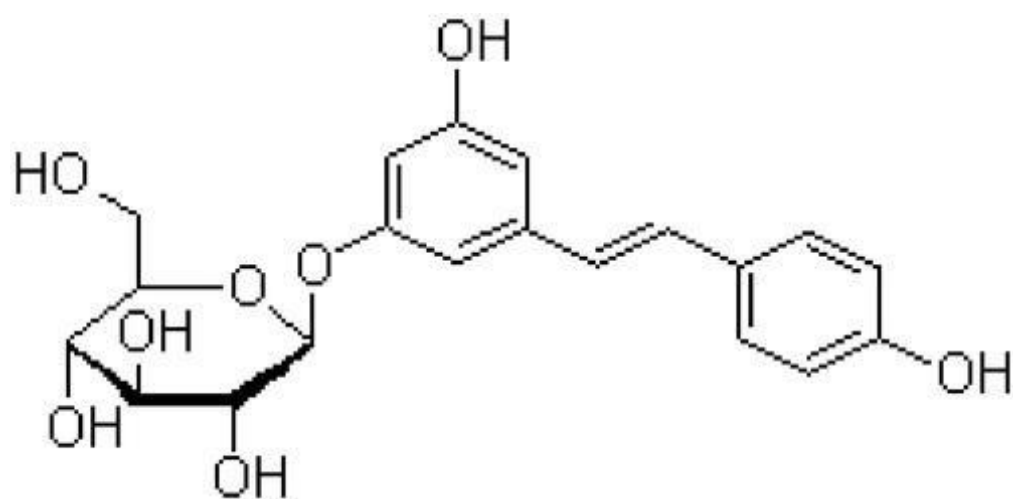


Figura 4. Estructura química de la polidatina (Du et al., 2013).

3. Justificación

La acumulación de ERO en la MIM daña el funcionamiento de los complejos de la CTE y provoca disfunción mitocondrial, lo que deriva en diversas patologías como lo es la diabetes, el cáncer, enfermedades cardiovasculares, entre otras, las cuales son de las principales causas de muerte entre la población y generan un gran impacto en el ámbito social y económico. El uso de algunos antioxidantes como la polidatina ha mostrado un efecto protector contra al estrés oxidativo y el desarrollo de algunas enfermedades, sobre todo aquellas relacionadas con el estrés oxidativo mitocondrial (Hao et al., 2018). Sin embargo, no se ha elucidado si el mecanismo de acción de este fitoquímico es mejorar el funcionamiento de la CTE y disminuir la producción mitocondrial de ERO. Por lo tanto, esto justifica evaluar si el mecanismo de acción de la polidatina está relacionado con una menor producción de ERO al mejorar la actividad de la CTE en mitocondrias sujetas a estrés oxidativo.

4. Hipótesis

La polidatina disminuye los efectos del estrés oxidativo en la mitocondria al mejorar el funcionamiento de la CTE y la generación de ERO.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

- Evaluar si la polidatina mejora el funcionamiento de la CTE y la generación de ERO en mitocondrias de hígado de rata sujetas a estrés oxidativo.

5.2. Objetivos específicos

- Caracterizar los efectos de la polidatina en la actividad de los complejos de la CTE de mitocondrias de hígado de rata sujetas a estrés oxidativo.
- Evaluar los efectos de la polidatina en la formación de ERO en mitocondrias de hígado de rata sujetas a estrés oxidativo.

6. Materiales y métodos

6.1. Modelo experimental

Se utilizaron ratas sanas de la cepa Wistar en etapa adulta con un peso aproximado de 600 g. Se mantuvieron en jaulas acrílicas en un bioterio con ciclos de 12 h luz/12 h oscuridad a temperatura ambiente y con libre acceso a alimento y agua. Las ratas fueron sacrificadas mediante decapitación e inmediatamente se realizó la extracción del hígado para el aislamiento de mitocondrias. Todos los procedimientos con los animales se llevaron conforme a la Norma Oficial Mexicana -NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

6.2. Aislamiento de mitocondrias

Las mitocondrias de hígado se aislaron mediante centrifugación diferencial por el método modificado por Saavedra-Molina y Devlin (Saavedra-Molina & Devlin, 1997). El hígado se colocó en medio 1 (220 mM manitol, 70 mM sacarosa, 2 mM MOPS 1 Mm EGTA a pH 7.34), se trituró en pequeños fragmentos y estos fueron homogeneizados y centrifugados a 2000 rpm. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 7500 rpm, la pastilla resultante fue lavada con medio 2 (220 mM manitol, 70 mM sacarosa, 2 mM MOPS a pH 7.4), se añadieron 80 µl de albumina bovina sérica al 0.2% y se centrifugó a 9000 rpm. Finalmente, la pastilla se re-suspendió en 500 µl de medio 2. Todas las centrifugaciones se realizaron durante 10 minutos a 4°C en una centrífuga refrigerada de piso Sorvall RC6+, usando el rotor SS40. La concentración de proteína mitocondrial fue determinada mediante el método de Biuret.

6.3. Tratamientos

Para inducir estrés oxidativo en las mitocondrias, se incubaron con concentraciones adecuadas con Fe^{2+} para cada determinación durante 30 min a 4°C. Se ha comprobado que el Fe^{2+} puede iniciar la peroxidación de lípidos en buffer de KH_2PO_4 al generarse un oxidante fuerte con características del radical $\text{OH}^\bullet$. Por ello, se adicionó hierro de una solución madre de 2.5 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ que se acidificó con cuatro gotas de H_2SO_4 concentrado para mantener el hierro en la forma Fe^{2+} .

(Cortés-Rojo et al., 2009). Para la determinación de los complejos II y III, la concentración utilizada fue de 50 μM . Para el complejo IV fue de 100 μM y de 25 μM para el complejo I y la producción de ERO. Para los tratamientos con los antioxidantes, las mitocondrias se incubaron con el antioxidante hidrofóbico hidroxitolueno butilado (BHT) 5 μM como control negativo, o con polidatina 100 μM para los complejos II y III. Se utilizó 200 μM de polidatina o 5 μM de BHT para el complejo IV. Para la determinación del complejo I y la producción de ERO la concentración de polidatina fue de 50 μM o 2.5 μM de BHT. Las incubaciones con los antioxidantes se realizaron 15 min previo al tratamiento con Fe^{2+} . Para las determinaciones del complejo II y IV y la producción de ERO se incubaron las mitocondrias con 200 μM de EDTA, y 100 μM de EDTA para la determinación de ERO. El tiempo de incubación con EDTA para la medición del complejo II y IV fue de 5 min antes de la medición en el espectrofotómetro. En el caso de la determinación de ERO la incubación con EDTA se realizó 10 min previo a la incubación con H_2DCFDA .

6.4. Determinación de la actividad de los complejos de la CTE

La actividad de los complejos de la CTE se determinó espectrofotométricamente en mitocondrias solubilizadas con detergente, utilizando sustratos e inhibidores específicos para cada complejo, de acuerdo con el protocolo descrito por Cortés-Rojo et al. (2009).

6.4.1. Complejo I

Para determinar la actividad del complejo I se evaluó la oxidación del NADH. Se resuspendieron 0,3 mg/mL de mitocondrias con tres ciclos previos de congelación y descongelación en 1 mL de buffer KH_2PO_4 50 mM y se incubaron con 1 μg de antimicina A y 1 mM de KCN. Tras 5 min, se añadieron 5 mM de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ y se midió la absorbancia durante 1 min a 340 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV2550. A continuación, se añadió NADH y se midió su oxidación durante 4 min. La velocidad de oxidación del NADH se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar de 6.3 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

6.4.2. Complejo II

Esta actividad enzimática se midió a temperatura ambiente evaluando la reducción del 2,6 diclorofenil indofenol (DCIP) estimulada por succinato. Las mitocondrias se permeabilizaron con el detergente Tritón X-100 al 0.05%. La mezcla de reacción contenía buffer 50 mM KH_2PO_4 (pH 7,6), 0,3 mg/ml de mitocondrias permeabilizadas con Tritón X-100, 80 μM de DCIP, 1 μg de antimicina A y 0,75 mM de KCN en un volumen final de 1 ml. Tras incubar durante 5 minutos con los inhibidores, se inició la reacción con succinato sódico 10 mM (pH 7,6). Los cambios de absorbancia se registraron en un espectrofotómetro Shimadzu UV2550 a 600 nm. La tasa de reducción del DCIP se calculó a partir de la pendiente del gráfico de absorbancia utilizando el coeficiente de extinción molar $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el DCIP (Cortés-Rojo et al., 2009).

6.4.3. Complejo III

La mezcla de reacción para determinar la actividad de este complejo contenía 50 mM de KH_2PO_4 (pH 7,6), 0,1 mg/ml de mitocondrias permeabilizadas, 1,5 mg de citocromo c oxidado y 0,75 mM de KCN en un volumen final de 1 ml. Tras incubar durante 5 minutos, se inició la reacción añadiendo 10 mM de succinato de sodio (pH 7,6). La reacción se detuvo mediante la adición de 1 μg de antimicina A. Los cambios de absorbancia se registraron en un espectrofotómetro Shimadzu UV2550 a 550 nm. La tasa de reducción del citocromo c se calculó a partir de las pendientes de los gráficos de absorbancia utilizando el coeficiente de extinción molar $19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el citocromo c (Cortés-Rojo et al., 2009). La reducción del citocromo c sensible a la antimicina A se calculó restando la actividad en presencia de antimicina A y succinato menos la actividad estimulada sólo con succinato.

6.4.4. Complejo IV

La mezcla de reacción contenía 50 mM de KH_2PO_4 (pH 7.6), 0,1 mg/ml de mitocondrias permeabilizadas y 1 μg de antimicina A en un volumen final de 1 ml. Después de incubar durante 5 minutos con antimicina A, se inició la reacción añadiendo 250 μg de citocromo c reducido con ditionita. Los cambios de absorbancia se registraron en un espectrofotómetro Shimadzu UV2550 a 550 nm. La tasa de oxidación del citocromo c se calculó a partir de las pendientes de los gráficos de

absorbancia utilizando el coeficiente de extinción molar $19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ del citocromo *c* (Cortés-Rojo et al., 2009).

6.5. Especies reactivas de oxígeno

La producción de ERO se determinó mediante su reacción con la sonda fluorescente diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H_2DCFDA). Se utilizó una concentración de 0,5 mg/ml de proteína mitocondrial determinada mediante el método de Biuret. La proteína se suspendió en un buffer (HEPES 10 mM, KCl 100 mM, MgCl_2 3 mM y KH_2PO_4 3 mM, pH 7,4) y se incubó con la sonda fluorescente durante 20 min a 4 °C en agitación constante. Finalizada la incubación la suspensión se colocó en una cubeta de cuarzo y se registró la fluorescencia basal. Transcurrido un minuto se adicionó glutamato/malato 10 mM como sustrato para el complejo I. A los 10 min se añadió antimicina A durante 5 min. La fluorescencia se midió en un espectrofluorómetro Shimadzu RF-5301PC (λ_{ex} 491 nm; λ_{em} 518 nm).

6.6 Análisis estadístico

Los datos se expresaron como el promedio $\pm$ el error estándar de $n = 3$. Las diferencias estadísticamente significativas entre las medias de cada grupo se analizaron con un análisis de varianza (ANOVA), seguido de las pruebas *post hoc* mencionada en la leyenda de cada figura ($p > 0.05$).

7. Resultados

7.1. Efecto de la polidatina en la inhibición de la actividad de los complejos de la CTE por el estrés oxidativo

Se evaluó si la polidatina tienen un efecto protector contra la inhibición de las actividades de los cuatro complejos de la CTE inducido mediante la incubación de las mitocondrias de hígado de rata con Fe^{2+} .

En el caso del complejo I (Fig. 5), el tratamiento con Fe^{2+} disminuyó la actividad en comparación con el control; por el contrario, se observó un aumento de la actividad del complejo I con la adición de la polidatina con respecto a la actividad en presencia de Fe^{2+} . Asimismo, no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos con Fe^{2+} +polidatina y Fe^{2+} +BHT. Lo que demuestra que la polidatina mostró un efecto protector similar al antioxidante BHT.

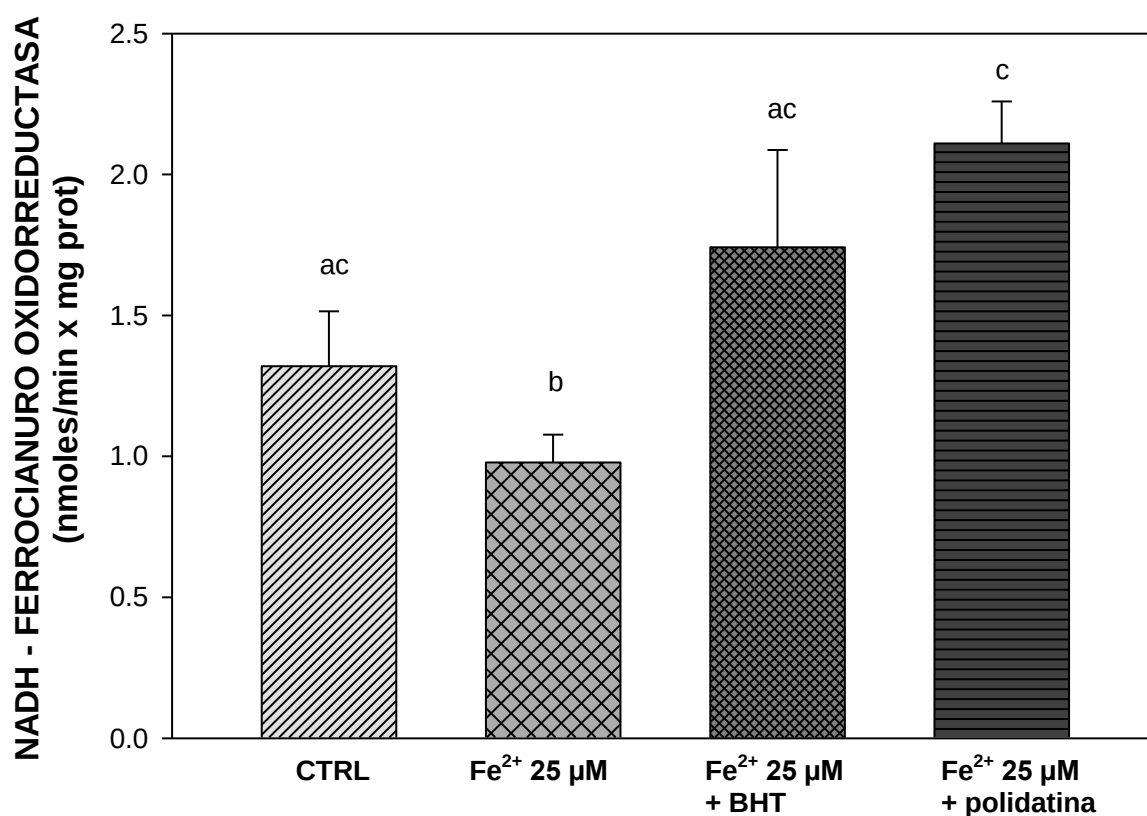


Figura 5. Efecto de la polidatina en la actividad del complejo I de la CTE de mitocondrias de hígado de rata sujetas a estrés oxidativo. Los resultados se expresaron como la media $\pm$ e.e. de $n=3$ ($p<0.05$, ANOVA y prueba *post hoc* de Tukey).

En la **Fig. 6** se evaluó el efecto de la polidatina en la actividad del complejo II de mitocondrias sujetas a estrés con Fe^{+2} . La actividad disminuyó en mitocondrias tratadas con Fe^{+2} en contraste con el control. Por el contrario, el tratamiento con Fe^{+2} y polidatina o BHT aumentó la actividad del complejo. De manera notable, la polidatina mejoró la actividad del complejo II por arriba del control aun en presencia de Fe^{+2} . No se observó una diferencia estadísticamente significativa entre la actividad del complejo IV de las mitocondrias tratadas con Fe^{+2} +polidatina o Fe^{+2} +BHT.

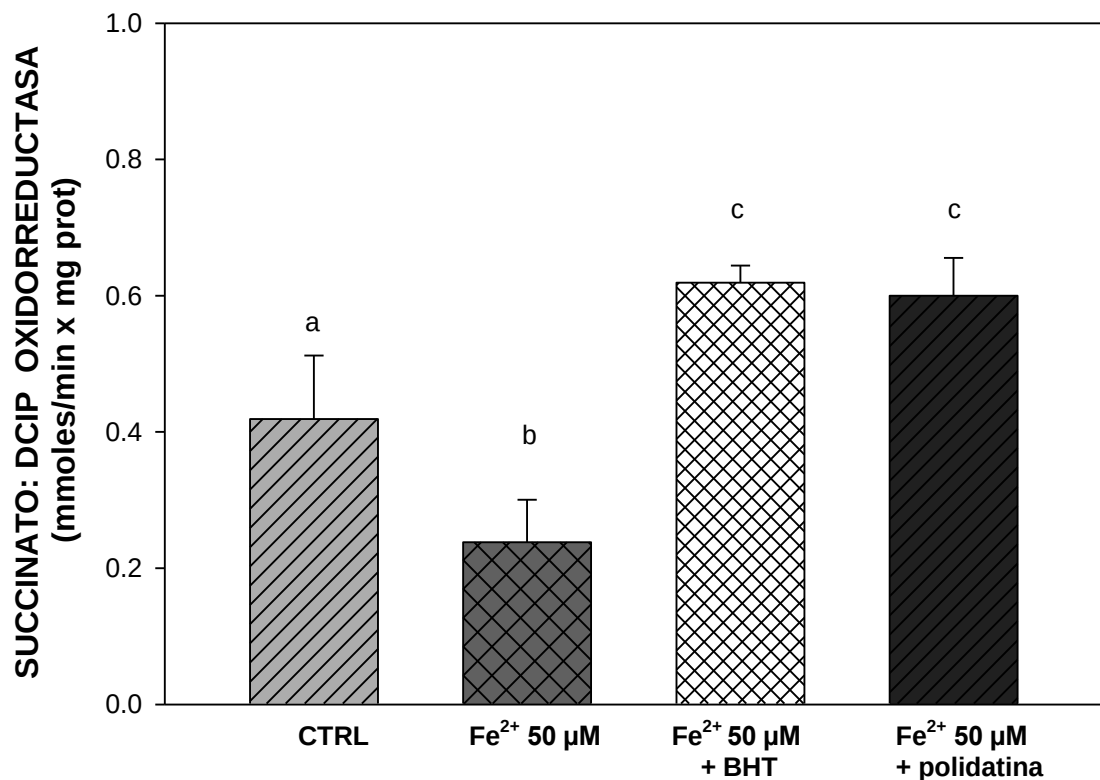


Figura 6. Efecto de la polidatina en la actividad del complejo II de la CTE de mitocondrias de hígado de rata sujetas a estrés oxidativo. Los resultados se expresaron como la media $\pm$ e.e. de $n=3$ ($p<0.05$, ANOVA y prueba *post hoc* de Tukey).

En la **Fig. 7** se observó que la actividad del complejo III disminuyó con el tratamiento con Fe^{2+} en contraste con el control. El tratamiento con polidatina previo a la adición de Fe^{2+} aumentó la actividad del complejo III con respecto al tratamiento con Fe^{2+} , alcanzándose niveles de actividad por arriba del control, aunque de manera no estadísticamente significativa. Un efecto similar al de la polidatina se observó en las mitocondrias tratadas con BHT previo al tratamiento con Fe^{2+} .

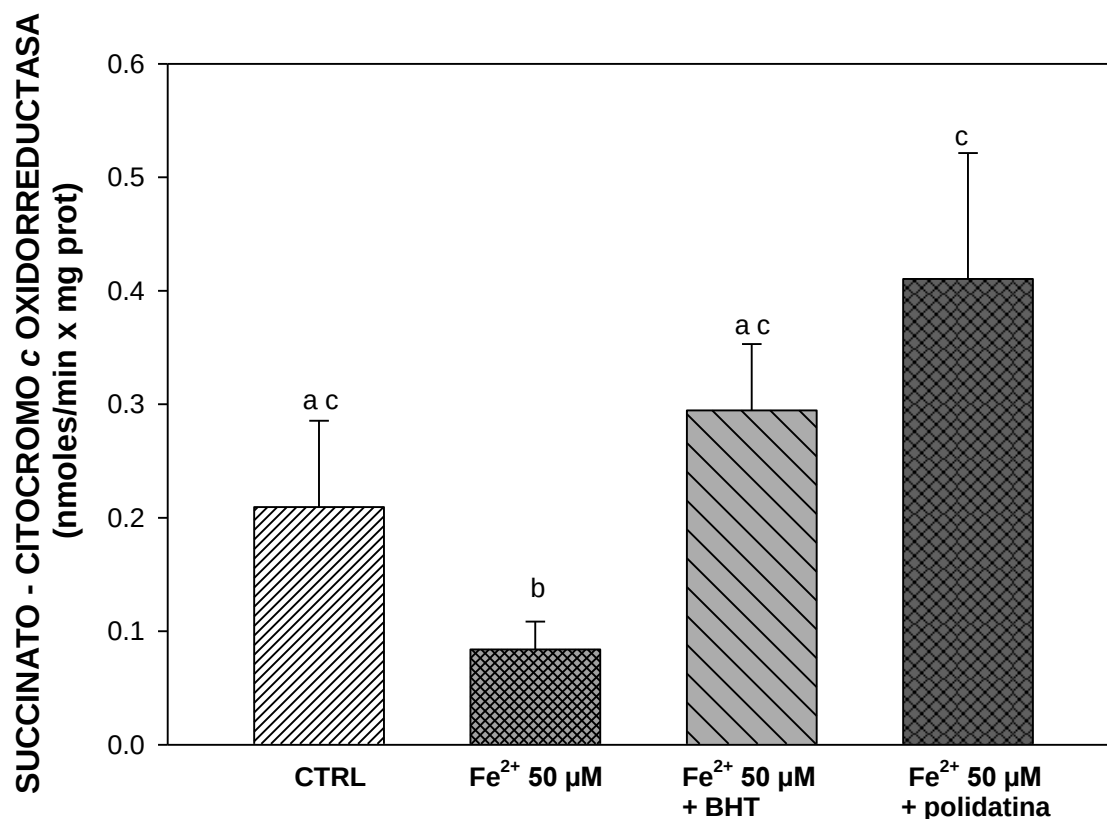


Figura 7. Efecto de la polidatina en la actividad del complejo III de la CTE de mitocondrias de hígado de rata sujetas a estrés oxidativo. Los resultados se expresaron como la media $\pm$ e.e. de $n=3$ ($p<0.05$, ANOVA y prueba *post hoc* de Student-Newman-Keuls).

En la **Fig. 8** se observan los efectos del Fe^{2+} y la polidatina en la actividad del complejo IV. El tratamiento con Fe^{2+} disminuyó la actividad de este complejo en contraste con el control. Los tratamientos con polidatina o BHT previo al tratamiento con Fe^{2+} mejoraron la actividad del complejo IV, incrementando la actividad con BHT o polidatina, llegando a niveles similares a los del control. No se observó una diferencia estadísticamente significativa entre la actividad del complejo IV de las mitocondrias tratadas con Fe^{2+} +polidatina o Fe^{2+} +BHT.

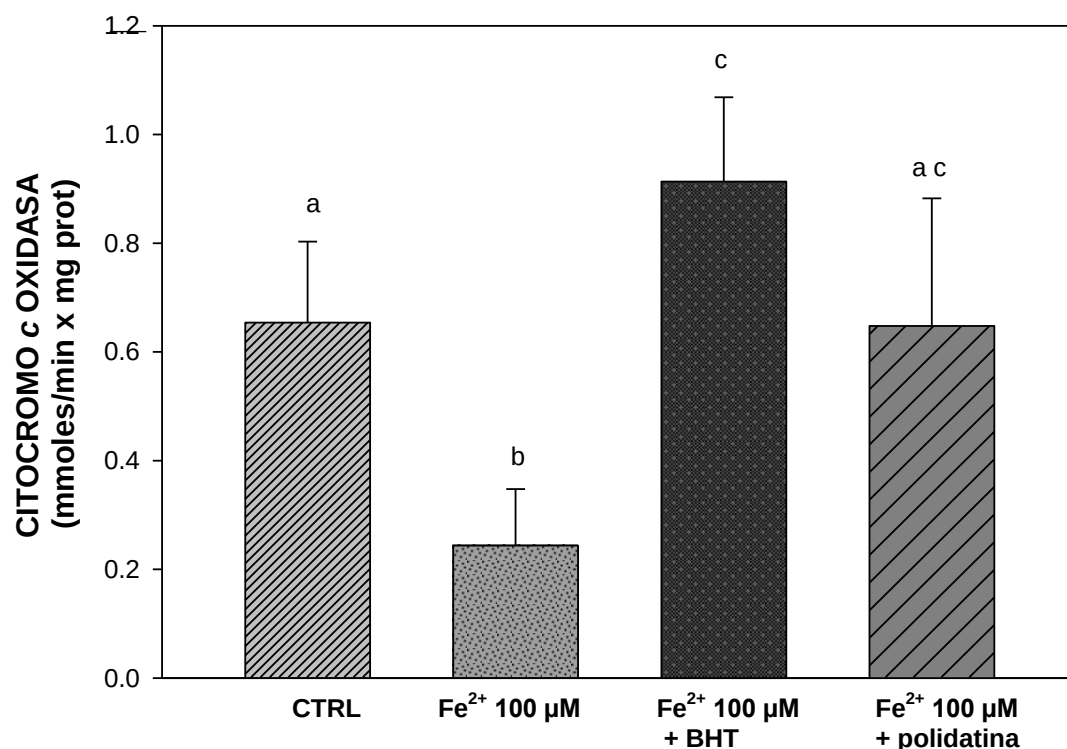


Figura 8. Efecto de la polidatina en la actividad del complejo IV de la CTE de mitocondrias de hígado de rata sujetas a estrés oxidativo. Los resultados se expresaron como la media $\pm$ e.e. de $n=3$ ($p<0.05$, ANOVA y prueba *post hoc* de Holm-Sidak).

7.2 Efectos de la polidatina en la producción de ERO en mitocondrias sujetas a estrés oxidativo

En la **Fig. 9** se muestran los niveles mitocondriales de ERO utilizando la prueba fluorescente H₂DCFDA y glutamato – malato como sustrato. Se adicionó además antimicina A para estimular la generación de ERO en el complejo III de la CTE.

Se observó un incremento en la producción de ERO en las mitocondrias tratadas con Fe²⁺. Este efecto fue prevenido mediante la preincubación con polidatina, disminuyendo la producción de ERO en contraste con los niveles observados con el tratamiento con Fe²⁺. Es de resaltarse que los niveles de ERO en las mitocondrias tratadas con Fe²⁺+polidatina fue menor que los niveles del control, aunque no de manera estadísticamente significativa. Además, se observó que la inhibición del complejo III con antimicina A no incrementó los niveles de ERO en ningún caso.

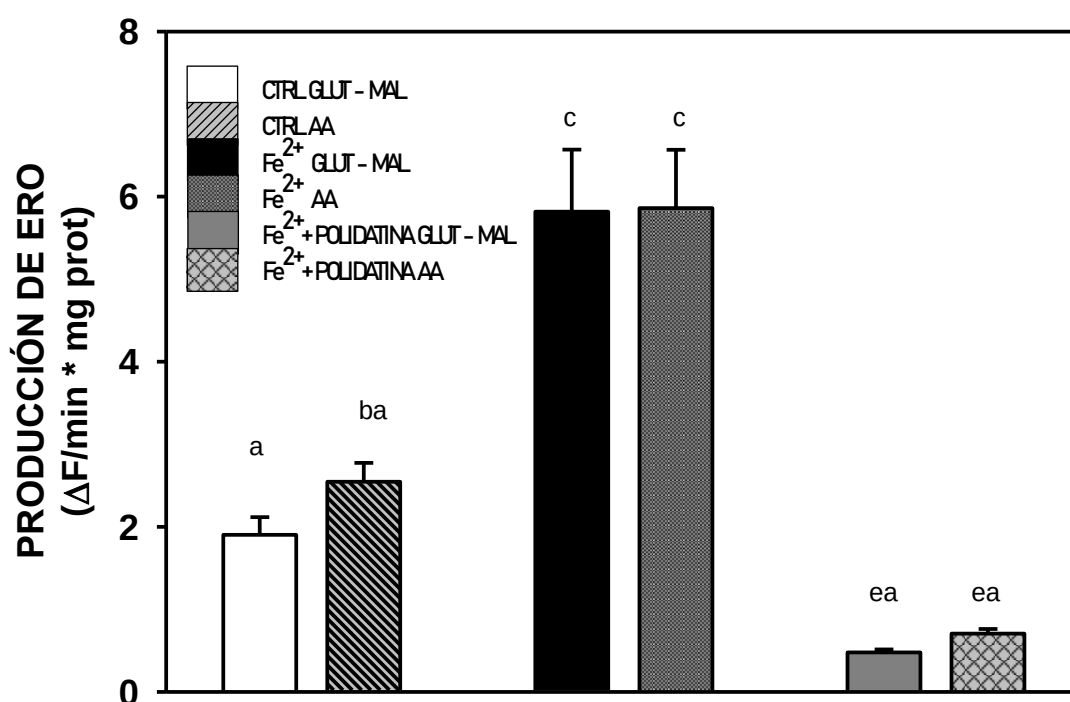


Figura 9. Efecto de la polidatina en la generación de ERO de mitocondrias de hígado de rata sujetas a estrés oxidativo. Los resultados se expresaron como la media ± e.e. de n=3 ($p<0.05$, ANOVA y prueba *post hoc* de Holm-Sidak).

8. Discusión

Los polifenoles son prometedores candidatos terapéuticos debido principalmente a sus propiedades antioxidantes. La polidatina ha tomado relevancia durante los últimos años por su relación con el resveratrol, sus múltiples usos y beneficios en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la disfunción mitocondrial, tales como el síndrome metabólico y el hígado graso (Du et al., 2009).

Este estudio evidenció el efecto antioxidante de la polidatina en mitocondrias de hígado de rata sujetas a estrés oxidativo, ya que el tratamiento con polidatina mejoró la actividad de los cuatro complejos de la CTE de mitocondrias tratadas con Fe^{2+} y disminuyó la generación de ERO. Esto es crucial ya que la CTE es una fuente importante de ERO, las cuales a altos niveles pueden dañar moléculas como proteínas, ADN y lípidos (Tang et al., 2022). Asimismo, esta alta generación de ERO da lugar al estrés oxidativo que se asocia a numerosas enfermedades incluidas las hepáticas.

Se ha mostrado que la polidatina tiene propiedades antioxidantes en enfermedades neuronales como la enfermedad de Parkinson, la cual se asocia al estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial. En un estudio donde se inhibió el complejo I con el inhibidor rotenona para reproducir la etiología de la enfermedad de Parkinson, se observó que una dosis de polidatina de 80 mg/kg previno la inhibición de la síntesis de ATP inducida por rotenona en diferentes regiones del cerebro (Chen et al., 2015). Esto concuerda con los resultados obtenidos en la actividad del complejo I, ya que se observó que la adición de la polidatina previene la pérdida de actividad por el tratamiento de Fe^{2+} , aumentándola incluso por arriba de los niveles del control (Fig. 5). Esto podría ser benéfico para el funcionamiento de la mitocondria, debido a que los complejos I y III son considerados los principales sitios de producción de ERO. Asimismo, la pérdida de actividad del complejo I se atribuye a mutaciones en el ADN mitocondrial en animales envejecidos y está relacionada con la inducción de la muerte celular apoptótica, lo que sugiere que la polidatina podría tener efectos beneficiosos en el envejecimiento y enfermedades relacionadas con una apoptosis excesiva (Tatarkova et al., 2016).

Se demostró que la polidatina también tiene efecto en la actividad de los otros complejos, así como en el contenido de ATP y actividad de la citrato sintasa (CS) en mitocondrias de cardiomiocitos después de un infarto de miocardio (IM) (M. Zhang et al., 2017). Esto concuerda con lo reportado en nuestro estudio, donde se observó el efecto protector de la polidatina al restablecer la actividad de los cuatro complejos de la CTE, pero en este caso las mitocondrias estuvieron sujetas al estrés oxidativo por el tratamiento con Fe^{2+} .

Se ha demostrado el efecto de la polidatina como un potente protector contra el daño ocasionado al hígado por la exposición a la mostaza de azufre (SM). La SM puede inducir muerte celular mediante diversos mecanismos como daño en el ADN, disminución de los niveles de glutatión, incremento en los niveles de especies reactivas de nitrógeno y de ERO (Zhang et al., 2019).

Los defectos en la actividad del complejo II tienen relevancia biomédica ya que se han relacionado con el desarrollo del envejecimiento y cánceres como el paraganglioma hereditario y la feocromocitoma familiar (Byun et al., 2008). Además, el complejo II ha sido propuesto como un regulador clave en la neuroprotección (Ma et al., 2019). En condiciones específicas, la inhibición de la actividad del complejo II puede producir un aumento en la generación de radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ en el sitio de oxidación del ubiquinol (sitio Q_0) del complejo III. La actividad del complejo II se ve afectada cuando se genera una alta producción de ERO, tal como se observó al inducir estrés oxidativo mediante la adición de Fe^{2+} (Fig. 6). En este caso, el efecto de la polidatina también fue ostensible ya que se incrementó la actividad de este complejo a niveles incluso mayores que al del control.

Se ha propuesto que el efecto benéfico de la polidatina en diversas enfermedades metabólicas tales como la diabetes, que es mediado por un incremento en la secreción de insulina e inhibición de la inflamación y el estrés oxidativo. Los mecanismos subyacentes podrían estar relacionados con disminución de los niveles de ERO, de productos de glucosilación avanzados, de ácidos grasos libres en circulación, así como disminución en la actividad de citocinas proinflamatorias como $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, IL-8, ICAM-1, $\text{TGF-}\beta 1$, proteína C reactiva, IL-1 β , and MCP-1 a través de la regulación de vías como AMPK/LDLR, Akt/IRS, $\text{PPAR}\beta$ -NO, NF- κ B, y las vías de señalización de SIRT1. De igual manera, se cree que la polidatina podría disminuir la

progresión de la aterosclerosis al inhibir la vía del receptor TRL/NF- κ B, lo que reduciría la liberación de diversas citocinas relacionadas con dicha afección (Luo et al., 2022).

En cuanto a la relación de la polidatina con la producción de ERO, se ha demostrado el efecto protector de 3 μ g/mL de polidatina en la lesión inducida por 400 μ M de H₂O₂ en células endoteliales de vena umbilical humana. Se observó que el H₂O₂ incrementó la producción de ERO y de lactato y disminuyó la actividad de las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa y SOD. El tratamiento con polidatina disminuyó notablemente la producción de lactato y ERO, y atenuó significativamente los cambios producidos en la actividad de glutatión peroxidasa y SOD (Qiao et al., 2016). Esto tiene una relación con los resultados de este estudio ya que se observó que la polidatina reduce la generación de las ERO en la CTE (Fig. 9). Esto podría proceder por el atrapamiento de las ERO producidas en la CTE por la polidatina, por la mejora en el funcionamiento de la CTE, donde la mejora en el funcionamiento de los complejos daría lugar a una menor producción de radical O₂[•], o por la reacción directa del radical OH[•] producido en presencia de Fe²⁺ con la polidatina.

Se ha demostrado que la polidatina tiene un efecto benéfico en el síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO) (Zeng et al., 2015). En este estudio se reportó que los niveles de productos avanzados de oxidación proteica, los cuales sirven como marcadores de estrés oxidativo en proteínas, disminuyeron en sangre de ratas con SMDO tratadas con polidatina en la sangre de ratas con SMDO.

La disminución de ERO también se puede relacionar a la estructura de la polidatina, ya que al ser un polifenol tienen la capacidad de actuar como potentes quelantes de hierro y de esta manera prevenir la formación de radicales OH[•] derivados de la reacción de Fenton (Wang et al., 2012). Por todo esto se atribuye que la polidatina al tener efectos antioxidantes puede ser un eficiente tratamiento para enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, ya que disminuye la generación de ERO y mejora la actividad de la CTE en las mitocondrias.

9. Conclusión

La polidatina disminuyó la generación de ERO y restableció la actividad de los cuatro complejos de la CTE, lo que resalta la capacidad antioxidante y protectora de esta molécula en mitocondrias sujetas al estrés oxidativo.

Bibliografía

- Bartolák-Suki, E., Imsirovic, J., Nishibori, Y., Krishnan, R., & Suki, B. (2017). Regulation of mitochondrial structure and dynamics by the cytoskeleton and mechanical factors. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 18, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms18081812>
- Behnaz Akbari, N. B.-Y. M. B. F. M. A. (2022). The role of plant-derived natural antioxidants in reduction of oxidative stress. *IUBMB*.
- Bhatti, J. S., Bhatti, G. K., & Reddy, P. H. (2017). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders — A step towards mitochondria based therapeutic strategies. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1863, Issue 5, pp. 1066–1077). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.010>
- Bozi, L. H. M., Campos, J. C., Zambelli, V. O., Ferreira, N. D., & Ferreira, J. C. B. (2020). Mitochondrially-targeted treatment strategies. In *Molecular Aspects of Medicine* (Vol. 71). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.100836>
- Byun, H. O., Kim, H. Y., Lim, J. J., Seo, Y. H., & Yoon, G. (2008). Mitochondrial dysfunction by complex II inhibition delays overall cell cycle progression via reactive oxygen species production. *Journal of Cellular Biochemistry*, 104(5), 1747–1759. <https://doi.org/10.1002/jcb.21741>
- Canizal García Melina. (2015). PARTICIPACIÓN DE LAS FOSFOLÍPIDO HIDROPERÓXIDO GLUTATIÓN PEROXIDASAS (PHGPx) EN LA PRESERVACIÓN DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL EN EL ENVEJECIMIENTO DE *Saccharomyces cerevisiae*. UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO.
- Chen, X. J., Shen, Y. S., He, M. C., Yang, F., Yang, P., Pang, F. X., He, W., Cao, Y. ming, & Wei, Q. S. (2019). Polydatin promotes the osteogenic differentiation of human bone mesenchymal stem cells by activating the BMP2-Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 112. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108746>
- Chen, Y., Zhang, D. Q., Liao, Z., Wang, B., Gong, S., Wang, C., Zhang, M. Z., Wang, G. H., Cai, H., Liao, F., & Xu, J. P. (2015). Anti-oxidant polydatin (piceid) protects against substantia nigral motor degeneration in multiple rodent models of Parkinson's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/1750-1326-10-4>
- Cichoz-Lach, H., & Michalak, A. (2014). Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 20, Issue 25, pp. 8082–8091). Baishideng Publishing Group Co. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i25.8082>
- Cortés-Rojas, C., Calderón-Cortés, E., Clemente-Guerrero, M., Estrada-Villagómez, M., Manzo-Avalos, S., Mejía-Zepeda, R., Boldogh, I., & Saavedra-Molina, A. (2009). Elucidation of the effects of lipoperoxidation on the mitochondrial electron transport chain using yeast mitochondria with manipulated fatty acid content. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 41(1), 15–28. <https://doi.org/10.1007/s10863-009-9200-3>
- Du, J., Sun, L. N., Xing, W. W., Huang, B. K., Jia, M., Wu, J. Z., Zhang, H., & Qin, L. P. (2009). Lipid-lowering effects of polydatin from *Polygonum cuspidatum* in hyperlipidemic hamsters. *Phytomedicine*, 16(6–7), 652–658. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.10.001>

- Du, Q. H., Peng, C., & Zhang, H. (2013). Polydatin: A review of pharmacology and pharmacokinetics. In *Pharmaceutical Biology* (Vol. 51, Issue 11, pp. 1347–1354). <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.792849>
- Fernandez-Vizarra, E., & Zeviani, M. (2021). Mitochondrial disorders of the OXPHOS system. In *FEBS Letters* (Vol. 595, Issue 8, pp. 1062–1106). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13995>
- Giuseppe Paradies, V. P. F. M. R. G. P. (2014). Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*.
- Guan, S., Zhao, L., & Peng, R. (2022). Mitochondrial Respiratory Chain Supercomplexes: From Structure to Function. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 22). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms232213880>
- Hadrava Vanova, K., Kraus, M., Neuzil, J., & Rohlena, J. (2020). Mitochondrial complex II and reactive oxygen species in disease and therapy. In *Redox Report* (Vol. 25, Issue 1, pp. 26–32). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/13510002.2020.1752002>
- Hao, J., Huang, K., Chen, C., Liang, Y., Wang, Y., Zhang, X., & Huang, H. (2018). Polydatin Improves Glucose and Lipid Metabolisms in Insulin-Resistant HepG2 Cells through the AMPK Pathway. In *Biol. Pharm. Bull* (Vol. 41, Issue 6).
- Hardeland, R. (2017). Melatonin and the electron transport chain. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 74, Issue 21, pp. 3883–3896). Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2615-9>
- Janikiewicz, J., Szymański, J., Malinska, D., Patalas-Krawczyk, P., Michalska, B., Duszyński, J., Giorgi, C., Bonora, M., Dobrzyn, A., & Wieckowski, M. R. (2018). Mitochondria-associated membranes in aging and senescence: Structure, function, and dynamics. *Cell Death and Disease*, 9(3). <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0105-5>
- Kadenbach, B. (2012). Introduction to mitochondrial oxidative phosphorylation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 748, 1–11. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3573-0_1
- Kim Hyeyoung, & Kim Suhn Hyung. (2018). Inhibitory Effect of Astaxanthin on Oxidative Stress-Induced Mitochondrial Dysfunction-A Mini-Review. *Nutrients*, 10(9).
- Koneru, M., Sahu, B. D., Gudem, S., Kuncha, M., Ravuri, H. G., Kumar, J. M., Kilari, E. K., & Sistla, R. (2017). Polydatin alleviates alcohol-induced acute liver injury in mice: Relevance of matrix metalloproteinases (MMPs) and hepatic antioxidants. *Phytomedicine*, 27, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.01.013>
- Konigsberg Fainstein, M. (2008). *RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO. APLICACIONES MEDICAS*. MÉXICO: MANUAL MODERNO.
- Kudryavtseva AV, Krasnov GS, D. A., Alekseev BY, K. O., Sadritdinova AF, F. M., Pokrovsky AV, M. N., Kaprin AD, M. A., & Snezhkina AV. (2016). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget*, 7(29).
- L. Nelson , D., & M. Cox, M. (2009). *LEHNINGER PRINCIPIOS DE BIOQUÍMICA*. EDICIONES OMEGA.

- Li, S., Tan, H. Y., Wang, N., Zhang, Z. J., Lao, L., Wong, C. W., & Feng, Y. (2015). The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 16, Issue 11, pp. 26087–26124). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms161125942>
- Luo, J., Chen, S., Wang, L., Zhao, X., & Piao, C. (2022). Pharmacological effects of polydatin in the treatment of metabolic diseases: A review. In *Phytomedicine* (Vol. 102). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.154161>
- Mansilla, N., Racca, S., Gras, D. E., Gonzalez, D. H., & Welchen, E. (2018). The complexity of mitochondrial complex iv: An update of cytochrome c oxidase biogenesis in plants. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19030662>
- Mattila, H., Khorobrykh, S., Havurinne, V., & Tyystjärvi, E. (2015). Reactive oxygen species: Reactions and detection from photosynthetic tissues. In *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (Vol. 152, pp. 176–214). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.10.001>
- Muriel, P., & Gordillo, K. R. (2016). Role of oxidative stress in liver health and disease. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2016). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2016/9037051>
- Nolfi-Donagan, D., Braganza, A., & Shiva, S. (2020). Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. In *Redox Biology* (Vol. 37). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101674>
- Qiao, H., Chen, H., Dong, Y., Ma, H., Zhao, G., Tang, F., & Li, Z. (2016). Polydatin Attenuates H₂O₂-Induced Oxidative Stress via PKC Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/5139458>
- Sousa, J. S., D’Imprima, E., & Vonck, J. (2018a). Mitochondrial respiratory chain complexes. In *Subcellular Biochemistry* (Vol. 87, pp. 167–227). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9_7
- Sousa, J. S., D’Imprima, E., & Vonck, J. (2018b). Mitochondrial respiratory chain complexes. In *Subcellular Biochemistry* (Vol. 87, pp. 167–227). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9_7
- Tang, D., Zhang, Q., Duan, H., Ye, X., Liu, J., Peng, W., & Wu, C. (2022). Polydatin: A Critical Promising Natural Agent for Liver Protection via Antioxidative Stress. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2022). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2022/9218738>
- Tatarkova, Z., Kovalska, M., Timkova, V., Racay, P., Lehotsky, J., & Kaplan, P. (2016). The Effect of Aging on Mitochondrial Complex I and the Extent of Oxidative Stress in the Rat Brain Cortex. *Neurochemical Research*, 41(8), 2160–2172. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-1931-z>
- Viada Pupo Esther, Gómez Robles Lisvelt, & Campaña Marrero Ibel Reyna. (2017). Estrés oxidativo. *CORREO CIENTÍFICO MÉDICO DE HOLGUÍN*, 21(1).
- Vikramdeo, K. S., Sudan, S. K., Singh, A. P., Singh, S., & Dasgupta, S. (2022). Mitochondrial respiratory complexes: Significance in human mitochondrial disorders and cancers. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 237, Issue 11, pp. 4049–4078). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jcp.30869>

- Wirth, C., Brandt, U., Hunte, C., & Zickermann, V. (2016). Structure and function of mitochondrial complex i. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1857(7), 902–914. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2016.02.013>
- Wu, H., Yin, J. J., Wamer, W. G., Zeng, M., & Lo, Y. M. (2014). Reactive oxygen species-related activities of nano-iron metal and nano-iron oxides. In *Journal of Food and Drug Analysis* (Vol. 22, Issue 1, pp. 86–94). Elsevier Taiwan LLC. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.007>
- Wu, M., Li, X., Wang, S., Yang, S., Zhao, R., Xing, Y., & Liu, L. (2020). Polydatin for treating atherosclerotic diseases: A functional and mechanistic overview. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 128). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110308>
- Xingmin Wang, Rui Song, Hui Ning Bian, Ulf T. Brunk, Ming Zhao, & Ke-seng Zhao¹. (2012). Polydatin, a natural polyphenol, protects arterial smooth muscle cells against mitochondrial dysfunction and lysosomal destabilization following hemorrhagic shock. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 302(7).
- Zeng, Z., Chen, Z., Li, T., Zhang, J., Gao, Y., Xu, S., Cai, S., & Zhao, K. S. (2015). Polydatin: A new therapeutic agent against multiorgan dysfunction. *Journal of Surgical Research*, 198(1), 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2015.05.041>
- Zhang, H., Chen, Y., Pei, Z., Gao, H., Shi, W., Sun, M., Xu, Q., Zhao, J., Meng, W., & Xiao, K. (2019). Protective effects of polydatin against sulfur mustard-induced hepatic injury. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 367, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.01.013>
- Zhang, M., Zhao, Z., Shen, M., Zhang, Y., Duan, J., Guo, Y., Zhang, D., Hu, J., Lin, J., Man, W., Hou, L., Wang, H., & Sun, D. (2017). Polydatin protects cardiomyocytes against myocardial infarction injury by activating Sirt3. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1863(8), 1962–1972. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.09.003>
- Zhao, R. Z., Jiang, S., Zhang, L., & Yu, Z. Bin. (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). In *International Journal of Molecular Medicine* (Vol. 44, Issue 1, pp. 3–15). Spandidos Publications. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4188>



Article

Polydatin Prevents Electron Transport Chain Dysfunction and ROS Overproduction Paralleled by an Improvement in Lipid Peroxidation and Cardiolipin Levels in Iron-Overloaded Rat Liver Mitochondria

Itzel Reyna-Bolaños ¹, Elsa Paola Solís-García ¹, Manuel Alejandro Vargas-Vargas ² , Donovan J. Peña-Montes ² , Alfredo Saavedra-Molina ² , Christian Cortés-Rojas ^{2,*} and Elizabeth Calderón-Cortés ^{3,*}

¹ Instituto Tecnológico Superior de Ciudad Hidalgo, Tecnológico Nacional de México, Ciudad Hidalgo 61100, Michoacán, Mexico; reynabolanositzel@gmail.com (I.R.-B.); paolasg63@gmail.com (E.P.S.-G.)

² Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia 58030, Michoacán, Mexico; 1371614e@umich.mx (M.A.V.-V.); 0618853j@umich.mx (D.J.P.-M.); francisco.saavedra@umich.mx (A.S.-M.)

³ Facultad de Enfermería, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia 58260, Michoacán, Mexico

* Correspondence: christian.cortes@umich.mx (C.C.-R.); elizabeth.calderon@umich.mx (E.C.-C.); Tel.: +52-443-313-9274 (E.C.-C.)



Citation: Reyna-Bolaños, I.; Solís-García, E.P.; Vargas-Vargas, M.A.; Peña-Montes, D.J.; Saavedra-Molina, A.; Cortés-Rojas, C.; Calderón-Cortés, E. Polydatin Prevents Electron

Transport Chain Dysfunction and ROS Overproduction Paralleled by an Improvement in Lipid Peroxidation and Cardiolipin Levels in Iron-Overloaded Rat Liver Mitochondria. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 11104. <https://doi.org/10.3390/ijms252011104>

Academic Editors: Carlos Palmeira and Dmitry B. Zorov

Received: 27 August 2024

Revised: 28 September 2024

Accepted: 14 October 2024

Published: 16 October 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Increased intramitochondrial free iron is a key feature of various liver diseases, leading to oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and liver damage. Polydatin is a polyphenol with a hepatoprotective effect, which has been attributed to its ability to enhance mitochondrial oxidative metabolism and antioxidant defenses, thereby inhibiting reactive oxygen species (ROS) dependent cellular damage processes and liver diseases. However, it has not been explored whether polydatin is able to exert its effects by protecting the phospholipid cardiolipin against damage from excess iron. Cardiolipin maintains the integrity and function of electron transport chain (ETC) complexes and keeps cytochrome c bound to mitochondria, avoiding uncontrolled apoptosis. Therefore, the effect of polydatin on oxidative lipid damage, ETC activity, cytochrome levels, and ROS production was explored in iron-exposed rat liver mitochondria. Fe²⁺ increased lipid peroxidation, decreased cardiolipin and cytochromes c + c₁ and *a₃* levels, inhibited ETC complex activities, and dramatically increased ROS production. Preincubation with polydatin prevented all these effects to a variable degree. These results suggest that the hepatoprotective mechanism of polydatin involves the attenuation of free radical production by iron, which enhances cardiolipin levels by counteracting membrane lipid peroxidation. This prevents the loss of cytochromes, improves ETC function, and decreases mitochondrial ROS production.

Keywords: piceid; mitochondrial function; oxidative stress; free radicals; liver disease; respiratory chain; cytochromes; hydroxyl radical; Fe²⁺; iron overload

1. Introduction

The mitochondrial electron transport chain (ETC) is at the core of a myriad of functions because it establishes an electrochemical proton gradient ($\Delta\mu\text{H}^+$) across the mitochondrial inner membrane that supplies the energy necessary for these functions. Hence, disturbances in ETC function are generally catastrophic, as reflected by the severe disease phenotypes in mitochondrial diseases involving mutations in ETC proteins [1,2]. ETC complexes oxidize the reduced coenzymes NADH and FADH₂ produced in catabolism and transfer electrons to oxygen through a series of redox centers in the complexes in exergonic reactions that drive proton pumping across the mitochondrial inner membrane for the establishment

of the $\Delta\mu\text{H}^+$. In turn, the $\Delta\mu\text{H}^+$ drives ATP synthesis/hydrolysis, transport of various solutes across the mitochondrial inner membrane, transport of newly synthesized proteins into the matrix, and production of ROS, among others [3]. In addition, the dissipation of the $\Delta\mu\text{H}^+$ is a signal for the occurrence of cellular quality control processes, such as mitophagy or apoptosis [4]. Thus, electron transfer in the ETC is a primary process on which $\Delta\mu\text{H}^+$ -driven processes depend.

ETC complexes are embedded in the phospholipid bilayer of the mitochondrial inner membrane, where they establish interactions with ETC proteins. Of particular importance are the interactions with the dimeric phospholipid cardiolipin, which are essential for the activity of ETC complexes [3]. In addition, cardiolipin maintains the morphology and architecture of the mitochondrial inner membrane [5]. Cardiolipin contains in its structure four acyl chains with unsaturated fatty acids, which makes it particularly prone to peroxidative damage by an excess of ROS [6]. Perturbations in the structure of cardiolipin due to its peroxidation or the decrease in its content cause a decrease in the activity of ETC by disturbing the morphology of ETC complexes and the mitochondrial inner membrane, inhibiting electron transfer and consequently causing an increase in ROS production [7]. In addition, damage to cardiolipin contributes significantly to the induction of apoptosis under pathological conditions by disrupting the binding of cytochrome c to the mitochondrial inner membrane and contributing to its release into the cytosol where it activates the pro-apoptotic cascade [8]. These events participate in the etiology of several pathophysiological conditions, such as Barth's syndrome, ischemia-reperfusion injury, and neurodegenerative diseases, among others [9–11]. Therefore, cardiolipin protection against oxidative damage has been proposed as a possible therapeutic strategy to counteract mitochondrial dysfunction and oxidative stress involved in the development of several pathophysiological conditions [12].

On the other hand, alterations in iron homeostasis can cause iron overload in the mitochondria due to the role of this organelle in the synthesis of Fe-S centers and heme groups [13], leading to the overproduction of ROS as iron catalyzes the production of free radicals, such as superoxide anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$) or hydroxyl radical ($\text{OH}^\bullet$) [14]. Iron overload, mitochondrial oxidative stress, decreased cardiolipin content, ETC dysfunction, and excessive ROS production are features that characterize liver diseases [15–17]. This has led to the search for new compounds that prevent mitochondrial dysfunction and oxidative stress for the treatment of liver diseases [18]. A promising molecule with beneficial effects at the mitochondrial level is polydatin or piceid (3-hydroxy-5-[(1E)-2-(4-hydroxyphenyl)ethenyl]phenyl- β -D-glucopyranoside). Polydatin has been reported to have a hepatoprotective effect in rodents with fructose-induced metabolic syndrome [19], and in zebrafish and mice with alcohol-induced damage [20,21]. These effects were associated with an improvement in hepatic lipid metabolism, which is consistent with the increased lipid and glucose utilization induced by polydatin treatment in liver cell lines induced to steatosis with palmitic acid [22].

The beneficial effects of polydatin have been associated with its ability to increase the activity of several antioxidant enzymes, including superoxide dismutase (SOD), catalase, and glutathione peroxidase [23]. Other proposed targets for polydatin include improving mitochondrial function in various pathological conditions by preventing mitochondrial membrane potential dissipation [24], increasing complex I activity [25], enhancing ATP levels [26], and inducing mitophagy [27] and mitochondrial biogenesis [28]. On the other hand, polydatin has antioxidant capacity in the micromolar order of concentrations by trapping $\text{OH}^\bullet$ radicals [29]. Since Fe^{2+} ion can favor the production of $\text{OH}^\bullet$ radicals and mitochondria constitute an important source of this ion, we hypothesize that mitochondria may be a direct antioxidant target of polydatin by decreasing Fe^{2+} -mediated lipid peroxidation, leading to better preservation of cardiolipin and cytochrome levels, improvement in ETC function, and, consequently, decreasing ROS levels. To test this hypothesis, we mimicked iron overload by treating isolated rat liver mitochondria with Fe^{2+} in the absence and presence of polydatin and determined the levels of lipid peroxidation, cardiolipin, cytochromes, ROS, and the activities of ETC complexes.

2. Results

2.1. Polydatin Prevents Oxidative Lipid Damage Induced In Vitro by Fe^{2+} in Rat Liver Mitochondria

Lipid peroxidation was determined in mitochondria treated with $50 \mu\text{M}$ Fe^{2+} to assess the ability of polydatin to prevent oxidative stress on mitochondrial lipids (Figure 1). Incubation with Fe^{2+} increased lipid peroxidation levels by 3.2-fold. In contrast, preincubation with $100 \mu\text{M}$ polydatin before incubation with Fe^{2+} completely prevented the increase in lipid peroxidation levels. The effect of polydatin was of a similar magnitude to that observed with $5 \mu\text{M}$ of the lipophilic antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT), which was used as a reference.

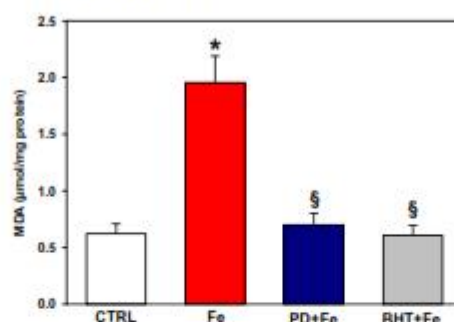


Figure 1. Effect of pretreatment with $100 \mu\text{M}$ polydatin (PD) or $5 \mu\text{M}$ butylated hydroxytoluene (BHT) on lipid peroxidation levels in mitochondria exposed to $50 \mu\text{M}$ ferrous iron (Fe). Results are expressed as the mean $\pm$ standard error of $n \geq 3$. * $p < 0.05$ vs. CTRL and § $p < 0.05$ vs. Fe. (one-way ANOVA, Holm–Sidak post hoc test, $p < 0.05$).

The effect of preincubation with polydatin on mitochondrial cardiolipin levels after induction of lipid peroxidation with Fe^{2+} was determined (Figure 2). Cardiolipin levels dropped dramatically with $50 \mu\text{M}$ Fe^{2+} . Pretreatment with polydatin increased cardiolipin levels 2.4-fold compared to the levels observed with Fe^{2+} , although the cardiolipin concentration was 57% lower than the control. In contrast to polydatin, the antioxidant BHT was not able to prevent the Fe^{2+} -induced decrease in cardiolipin levels. The results in Figures 1 and 2 suggest that polydatin effectively prevents Fe^{2+} -induced lipid peroxidation with a partial protective effect against cardiolipin loss.

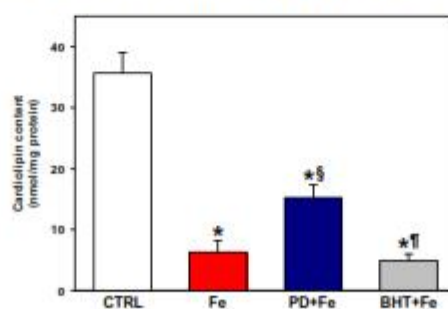


Figure 2. Effect of pretreatment with $100 \mu\text{M}$ polydatin (PD) or $5 \mu\text{M}$ butylated hydroxytoluene (BHT) on cardiolipin levels in mitochondria exposed to $50 \mu\text{M}$ ferrous iron (Fe). Results are expressed as the mean $\pm$ standard error of $n \geq 4$. * $p < 0.05$ vs. CTRL, § $p < 0.05$ vs. Fe and ¶ $p < 0.05$ vs. PD + Fe (one-way ANOVA, Holm–Sidak post hoc test, $p < 0.05$).

2.2. Polydatin Preserves Cytochrome Levels in Rat Liver Mitochondria Exposed to Fe^{2+}

Figure 3a shows the oxidized minus reduced spectra of cytochromes from rat liver mitochondria with or without exposure to $50 \mu\text{M Fe}^{2+}$. At 550 nm, an absorption peak maximum is observed, corresponding to the heme groups of cytochrome *c* and the cytochrome *c*₁ of the *bc*₁ complex of the ETC in the control (i.e., cytochromes *c* + *c*₁, gray line). At 600 nm, an absorption peak maximum, corresponding to cytochrome *aa*₃ of the ETC complex IV, can be observed. A drastic decrease in absorption intensity at 550 nm and 600 nm was detected in mitochondria treated with $50 \mu\text{M Fe}^{2+}$, indicative of a decrease in the content of cytochromes *c* + *c*₁ and *aa*₃, respectively (red line). In contrast, preincubation with $100 \mu\text{M}$ polydatin (blue line) or $5 \mu\text{M}$ BHT (green line) prior to Fe^{2+} exposure significantly attenuated the decrease in cytochrome levels, although the levels did not fully return to the control values. From these data, cytochrome concentration was quantified (Figure 3b), confirming a 40 and 30% decrease in the concentration of cytochromes *c* + *c*₁ and *aa*₃, respectively, and the prevention of the decrease in cytochrome content by pretreatment with polydatin or the lipophilic antioxidant BHT, although the effect of BHT was only statistically significant on cytochrome *aa*₃ levels (Figure 3c). These data indicate that polydatin prevents the loss of cytochromes from the mitochondrial inner membrane, which could be related to the protective effect exerted against oxidative lipid damage observed in Figures 1 and 2.

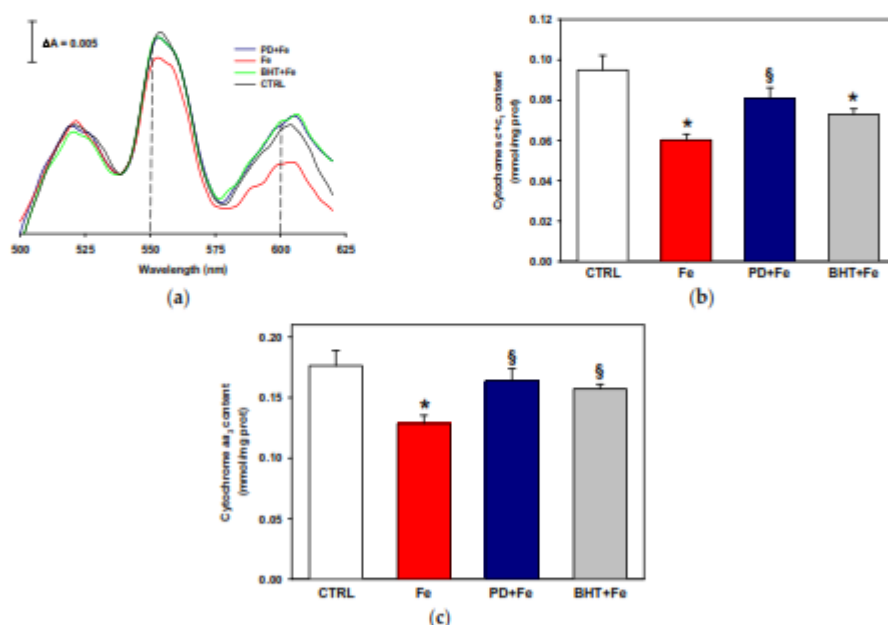


Figure 3. Effect of pretreatment with $100 \mu\text{M}$ polydatin (PD) or $5 \mu\text{M}$ butylated hydroxytoluene (BHT) on cytochrome levels in mitochondria exposed to $50 \mu\text{M}$ ferrous iron (Fe): (a) representative cytochrome differential absorption spectra. Dotted lines indicate the absorption maximum for cytochromes *c* + *c*₁ (550 nm) and cytochromes *aa*₃ (600 nm); (b) quantification of cytochrome *c* + *c*₁ levels; (c) quantification of cytochrome *aa*₃ levels. Results are expressed in (b,c) as the mean $\pm$ standard error of $n = 4$. * $p < 0.05$ vs. CTRL and § $p < 0.05$ vs. Fe (one-way ANOVA, Holm–Sidak post hoc test, $p < 0.05$).

2.3. Polydatin Enhances the Activity of ETC Complexes of Rat Liver Mitochondria Subjected to Fe^{2+} Stress

The activity of ETC complexes was evaluated to determine whether polydatin could improve ETC function under Fe^{2+} stress conditions by enhancing cytochrome content and protecting against cardiolipin loss and lipid peroxidation. Complex I activity tended to decrease in a non-statistically significant manner with 25 μM Fe^{2+} (Figure 4a). Higher concentrations of Fe^{2+} were not tested due to a total inhibition of complex I that could not be recovered with either polydatin or BHT. Preincubation with BHT or polydatin enhanced the activity of complex I, which was twice as high with polydatin compared to the activity in the presence of Fe^{2+} and was even significantly higher than the control activity. Complex II activity was challenged against incubation with 50 μM Fe^{2+} (Figure 4b). This caused a decrease of 43.2% for this activity, which was entirely prevented by preincubation with BHT or polydatin. In fact, the activity with either of these antioxidants in the presence of Fe^{2+} increased statistically significantly above the control activity

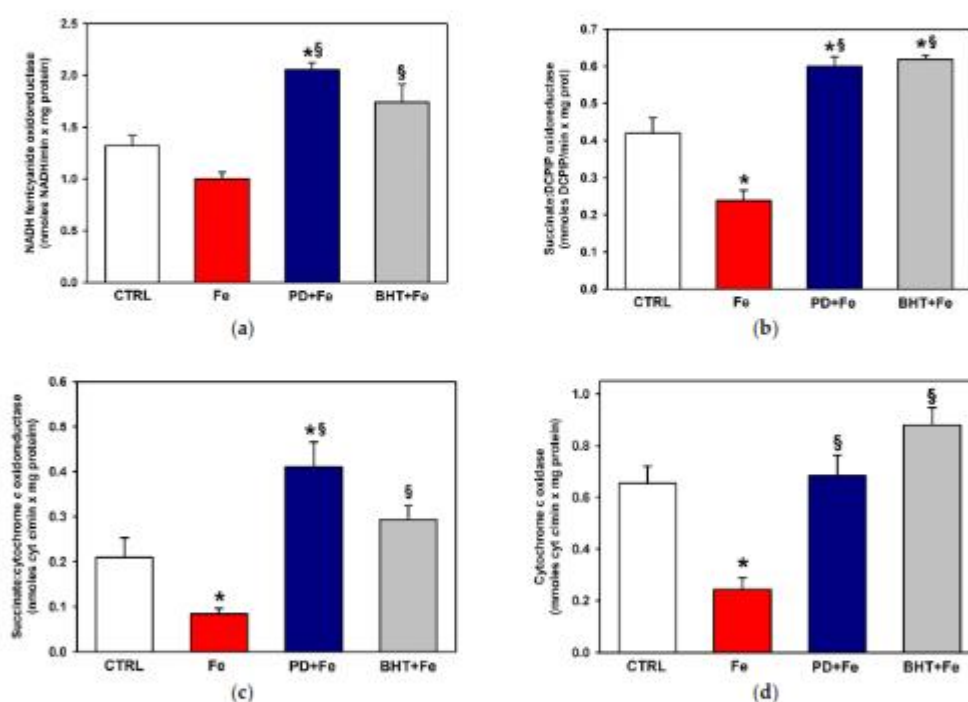


Figure 4. Effect of pretreatment with polydatin (PD) or butylated hydroxytoluene (BHT) on the activity of ETC complexes of mitochondria exposed to Fe^{2+} (Fe): (a) complex I activity (50 μM PD, 2.5 μM BHT, 25 μM Fe^{2+}); (b) complex II activity (100 μM PD, 5 μM BHT, 50 μM Fe^{2+}); (c) complex III activity (100 μM PD, 5 μM BHT, 50 μM Fe^{2+}); (d) complex IV activity (200 μM PD, 5 μM BHT, 100 μM Fe^{2+}). Results are expressed as mean $\pm$ standard error of $n \geq 3$. * $p < 0.05$ vs. CTRL and § $p < 0.05$ vs. Fe (one-way ANOVA, Holm–Sidak post hoc test, except for (c), where the Student–Newman–Keuls method was used, $p < 0.05$).

Complex III underwent an inhibition of 60% upon treatment with 50 μM Fe^{2+} (Figure 3c), which was totally prevented by BHT. Polydatin statistically significantly increased this activity twofold with respect to the activity of the control. Complex IV activity decreased by 63% with

100 μM Fe^{2+} (Figure 4d). As in the rest of the complexes, preincubation with polydatin or BHT prevented inhibition of the complex by Fe^{2+} .

The above results indicate that polydatin can prevent the inhibition of all ETC complexes of liver mitochondria induced by Fe^{2+} overload. This could be related not only to the protective effect of polydatin against lipid peroxidation, but also to its protective effect at the level of cytochromes and cardiolipin.

2.4. Polydatin Ablates ROS Overproduction in Rat Liver Mitochondria Subjected to Iron Overload

The ability of polydatin to prevent iron overload-induced ROS overproduction in rat liver mitochondria was investigated (Figure 5). ETC produces ROS when control mitochondria are energized with glutamate–malate as a complex I substrate. The addition of antimycin A, an inhibitor of complex III activity, increased ROS production, showing that the detected species are due to ETC activity. Incubation with Fe^{2+} increased ROS production almost threefold, being insensitive to the addition of antimycin A, suggesting that this increase is due to both an increase in ROS produced by ETC and ROS produced directly by Fe^{2+} . Preincubation with polydatin before iron overload decreased ROS levels even below control mitochondria levels. As in control mitochondria, antimycin A increased ROS levels, but they remained below control levels. These data indicate that polydatin can mitigate ROS production not only due to the activity of ETC complexes, but also that produced by iron directly, which agrees with the protective effect of polydatin against lipid peroxidation, the decrease in cardiolipin and cytochrome levels, as well as the inhibition of ETC complexes induced by Fe^{2+} .

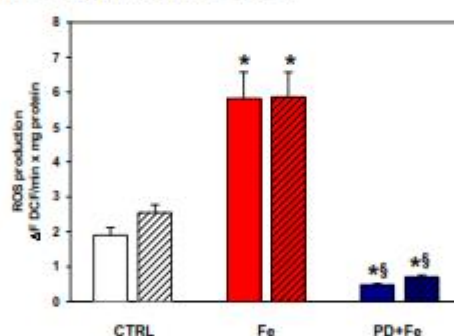


Figure 5. Effect of pretreatment with 50 μM polydatin (PD) on ROS levels of mitochondria exposed to 25 μM ferrous iron (Fe). Mitochondria were incubated with glutamate–malate (G + M; open bars) to stimulate ROS production and antimycin A (AA; diagonal striped bars) to stimulate maximal ROS production in the ETC. Results are expressed as the mean $\pm$ standard error of $n \geq 5$. * $p < 0.05$ vs. CTRL and § $p < 0.05$ vs. Fe (one-way ANOVA, Holm–Sidak post hoc test, $p < 0.05$).

3. Discussion

The results of this study suggest that the beneficial effects of polydatin under pathophysiological conditions of iron overload in liver mitochondria could be mediated by a direct antioxidant effect that decreases lipid peroxidation levels (Figure 1), partially decreases cardiolipin loss (Figure 2), and enhances cytochrome levels (Figure 3), leading to an increase in ETC activity (Figure 4) and a decrease in ROS levels (Figure 5). The addition of ferrous sulfate in acid solution in phosphate buffer, similar to the conditions used in this study, results in the production of $\text{OH}^\bullet$ radicals and the initiation of lipid peroxidation in biological membranes [30]. This agrees with the 3.2-fold increase in lipid peroxidation levels observed in Figure 1. Likewise, it has been reported that polydatin is able to scavenge $\text{OH}^\bullet$ [29], which is consistent with the total prevention in Fe^{2+} -stimulated lipid peroxidation observed in Figure 1. Also, it has been reported that the antioxidant

mechanism of BHT is through the neutralization of free radicals by the donation of a proton to free radicals, which prevents the extraction of a proton from a polyunsaturated fatty acid and the initiation of lipid peroxidation [31]. Therefore, the similar results obtained in lipid peroxidation with BHT and polydatin could be explained by both sharing a hydrophobic character and a similar mechanism of antioxidant action.

The depletion of cardiolipin observed with Fe^{2+} incubation (Figure 2) was expected, since this phospholipid is highly susceptible to lipid peroxidation as a result of having four highly unsaturated acyl groups [6], which increases the number of bis-allylic hydrogens susceptible to removal by $\text{OH}^\bullet$ radicals. However, the differential effects between BHT and polydatin on cardiolipin levels (Figure 2) were not expected, given that both antioxidants prevented lipid peroxidation to the same extent. It is possible that the differences between their effects lie in the lipid solubility of these two antioxidants, since BHT (calculated $\log P = 5.3$) has a partition coefficient 3.1 times higher than polydatin (calculated $\log P = 1.7$) [32,33]. Therefore, BHT is more likely to become stuck in the center of the lipid bilayer due to its extreme hydrophobicity, which would make it less accessible in the vicinity of the mitochondrial inner membrane where cardiolipin resides exclusively [34]. Various concerns have been raised by the use of nonyl acridine orange for the determination of cardiolipin content. For example, accumulation of this dye has been found in situ in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* cells which are mutant in terms of cardiolipin synthesis [35]. On the other hand, nonyl acridine orange has been found to distribute outside the mitochondrion in cells with mitochondrial inner membrane depolarization [36]. This has discouraged the use of this dye in situ in cells and tissues [37]. In contrast, in membrane models, it has been found that nonyl acridine orange binds to cardiolipin with an affinity that is constantly two orders of magnitude higher than with phosphatidylserine and phosphatidylinositol, in addition to the observation that in isolated mitochondria, cardiolipin content correlates with acridine orange fluorescence [38]. Therefore, with appropriate conditions, it has been proposed that mitochondrial cardiolipin concentration can be estimated in isolated mitochondria and other membrane models [38,39].

On the other hand, while lipid peroxidation was totally prevented by polydatin (Figure 1), cardiolipin levels were partially preserved by polydatin after iron overload (Figure 2). Polydatin crosses the plasma membrane by passive diffusion and by facilitated transport via sodium-dependent glucose transporter 1 (SGLT1) [40]. In a recent study of glucose transporters localization in endomembranes, the presence of SGLT1 in mitochondrial membranes was not predicted [41]. This suggests that the accessibility of polydatin was limited by a probable process of passive diffusion across the mitochondrial outer membrane, as polydatin has an intermediate value of partition coefficient of 1.7, giving it limited accessibility to the vicinity of the mitochondrial inner membrane to trap $\text{OH}^\bullet$ radicals and prevent cardiolipin peroxidation.

Both cytochrome *c* and the heme c_1 group of the cytochrome c_1 subunit of ETC complex III are located in the intermembrane space. Cytochrome *c* interacts with the cardiolipin of the mitochondrial inner membrane [42], whereas heme c_1 is anchored in a region of the cytochrome c_1 subunit in contact with the solvent of the intermembrane space [43]. Therefore, the preservation of cytochrome *c* levels by polydatin could proceed by the protection conferred by this antioxidant to cardiolipin, decreasing its detachment from the mitochondrial inner membrane by maintaining cytochrome *c*–cardiolipin interactions. This would explain why control levels of cytochrome *c* were not reached with polydatin treatment (Figure 3), since the protection of cardiolipin by polydatin was also partial (Figure 2). Likewise, partial protection of polydatin against Fe^{2+} overload-induced damage to cytochrome c_1 would be expected given its location in the mitochondrial inner membrane space and the restrictions on the accessibility of polydatin to this part of the mitochondrion noted above. Unlike the *c* + c_1 heme groups, the *aa3* heme groups of complex IV are in the core of the mitochondrial inner membrane [44]. Since lipid peroxidation was almost completely prevented with polydatin or BHT, this could explain the better preservation of

heme *a*₃ with either of these two antioxidants than that obtained with heme *c* + *c*₁, since the hydrophobic environment surrounding heme *a*₃ would be better preserved.

The activity of all ETC complexes was decreased by Fe²⁺ treatment (Figure 4), which was expected by virtue of the damage to the mitochondrial inner membrane induced by lipid peroxidation (Figure 1), the decrease in cardiolipin content (Figure 2), which is necessary for optimal activities of ETC complexes [45], as well as the decrease in cytochromes content (Figure 3), which are involved in electron transfer in complexes III and IV [43,44]. Since all these alterations could be prevented by preincubation with polydatin, the decrease in the activities of all ETC complexes was also totally prevented by this antioxidant. Something similar occurred with BHT, confirming that peroxidative damage to mitochondrial lipids is a central process in the inhibition of ETC by oxidative stress and that polydatin is as effective as a more lipophilic and, therefore, toxic antioxidant, such as BHT [46], in counteracting damage in a hydrophobic environment, such as the mitochondrial inner membrane.

Mitochondria produce ROS in response to substrate oxidation and these are increased by antimycin A-induced blockade of ETC in control mitochondria (Figure 5). The three-fold increase in ROS production and insensitivity to antimycin A (i.e., ROS are not increased by the addition of antimycin A), indicates that the increase in ROS was due both to defective electron transfer in ETC (Figure 4), but also by the direct production of free radicals such as the OH• radical induced by the excess of added iron [14]. The decrease in ROS levels with polydatin even below control levels indicates that this antioxidant not only scavenges the radicals produced by ETC, but also the OH• radical produced directly by iron, which is consistent with the ability of polydatin to scavenge OH• radical as previously reported [29]. The OH• radical scavenging by polydatin would be the initial step in the protective effects of polydatin against oxidative damage on mitochondrial function, as the decrease in ROS levels would decrease the peroxidation of mitochondrial membrane lipids (Figure 1), which in turn, would preserve cardiolipin levels (Figure 2). This would preserve the interactions of cytochrome *c* with cardiolipin and, in general, the integrity of the ETC complexes and their heme groups (Figure 3), resulting in improved electron flow through the ETC (Figure 4) and decreasing the ROS produced by the ETC (Figure 5).

The implications of the results of this study are related to the effect of polydatin in liver diseases involving oxidative damage, where it has been observed that polydatin can prevent apoptosis [47]. This could be related to the increase in cardiolipin levels in mitochondria induced by polydatin, since this would preserve the cytochrome *c*-cardiolipin interactions that keep this protein bound to the mitochondrial inner membrane, preventing its release into the cytosol and the induction of the apoptotic cascade [8]. The preservation of cytochrome levels in general and the improvement in cardiolipin levels could also be part of the mechanism that explains the protection by polydatin of the inhibition of ETC complex activity in rats with alcoholic liver disease [21], which is consistent with the result obtained in Figure 4. It should be noted that although that work and this study showed a protective effect of polydatin against the inhibition of ETC complexes by different conditions leading to oxidative stress, the effect of polydatin on cytochrome levels, cardiolipin content, and levels of lipid peroxidation in mitochondria was not determined in that work, although protection against lipid peroxidation in liver tissue was demonstrated [21].

Iron overload and lipid peroxidation are key events in the induction of cell death by ferroptosis [48]. These events have been implicated in ferroptosis liver damage in some diseases, such as hepatic ischemia-reperfusion, NAFLD, ALD, hemochromatosis, and drug-induced liver damage [49]. One of the factors that negatively regulate ferroptosis is glutathione peroxidase-4 (Gpx-4), which decreases lipid peroxidation in the mitochondria and cytosol in a glutathione-dependent manner [50]. Given that the results of our study show that polydatin is highly effective in decreasing lipid peroxidation in liver mitochondria exposed to iron overload (Figure 1), and that polydatin has been shown to decrease lipid peroxidation in the liver and to increase glutathione levels [21], this allows us to propose that one mechanism of action of polydatin against some of the liver diseases

mentioned above [47] is the suppression of the initial steps of ferroptosis by substituting the function of Gpx-4 in the mitochondria and cytosol.

Regarding whether the iron concentrations used in this study are close to the free iron concentrations found in pathophysiological states affecting liver iron homeostasis, it should first be considered that the physiological concentration of free iron in liver cell mitochondria varies from between 4.8 μM to $9.2 \pm 2.7 \mu\text{M}$ in one study [51], while in another study an average concentration of 12.2 ± 4.9 was found, with a range of fluctuation between individual cells from 0.3 to 19.2 μM iron [52]. On the other hand, in two studies using a rodent model of hemochromatosis, it was found that the concentration of free iron in liver mitochondria increased by 2 to 3 times, although the absolute values were not reported [53,54]. Assuming a maximum basal concentration of 19.2 μM and a 3-fold increase in hemochromatosis, this results in a concentration of 57.6 μM free iron, which is in the range used in our experiments of 25 and 50 μM Fe^{2+} in most of the experiments, except in the measurement of complex IV activity, where 100 μM Fe^{2+} was used because its enzyme activity showed a low sensitivity to iron inhibition.

The main limitation of this work is that it was performed on isolated mitochondria; thus, the effect of polydatin on mitochondrial quality control processes and mitochondrial dynamics could not be evaluated. Likewise, ETC is a dynamic entity that forms supramolecular associations called respiratory supercomplexes, whose formation is highly dependent on the phospholipid cardiolipin [55]. The results of this study do not allow us to elucidate whether the improvement in ETC function by polydatin was due to enhanced formation of respiratory supercomplexes. On the other hand, the technique used to determine cytochrome levels does not allow us to distinguish between cytochrome *c* and cytochrome *c*₁. Therefore, detection of extramitochondrial cytochrome *c* levels by Western blot is necessary.

4. Materials and Methods

4.1. Animals and Mitochondria Isolation

Male Wistar rats weighing approximately 300 g were used, which were bred in the bioterium of the Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (IIQB-UMSNH). The animals were sacrificed by decapitation in accordance with Official Mexican Standard-NOM-062-ZOO-1999 [56], Technical specifications for the production, care, and use of laboratory animals. This procedure was also approved by the Biosafety and Bioethics Committee of IIQB-UMSNH.

Once the liver was dissected, the mitochondria were isolated by differential centrifugation. Briefly, the liver was cut into small pieces and homogenized in glass/teflon Potter Elvehjem homogenizer filled with medium 1 at 4 °C (220 mM mannitol, 70 mM sucrose, 2 mM MOPS, 1 mM EGTA, pH 7.4). The homogenate was centrifuged at 2500 rpm and the supernatant was recovered and centrifuged at 7500 rpm. The resulting pellet was resuspended in medium 2 (220 mM mannitol, 70 mM sucrose, 2 mM MOPS at pH 7.4), then 80 μL of 0.2% albumin was added and centrifuged at 9000 rpm. Finally, the pellet was re-suspended in 500 μL of medium 2. All centrifugations were performed for 10 min at 4 °C in a Sorvall RC6+ centrifuge. Mitochondrial protein concentration was determined by the Biuret method.

4.2. Treatment of Mitochondria with Iron and Antioxidants

Mitochondria were resuspended in 50 mM KH_2PO_4 medium (pH 6.8) at the concentration indicated for each methodology. Mitochondria were incubated for 15 min with polydatin (catalog #15721, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) or BHT (catalog # 34750, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) at the concentrations indicated in the captions of each figure. Subsequently, FeSO_4 was added at the concentration indicated at the caption of each figure and incubated for 30 min. The incubations were performed on ice with constant agitation. At the end of each incubation, an excess of EDTA was added to chelate the remaining iron in the medium. The FeSO_4 stock was prepared prior to the start of each experiment in deionized water acidified with 2 drops of H_2SO_4 to avoid oxidation of the

Fe^{2+} ion to Fe^{3+} ion. For the control samples, the incubations were performed in the same way, except that the addition of the antioxidants and Fe_2SO_4 was omitted. For the iron-only treatments, incubations were performed in the same manner, except that the addition of the antioxidants was omitted.

The iron concentrations for each experiment were chosen based on a previous study by our research group, where a concentration of $50 \mu\text{M}$ FeSO_4 caused approximately half of the maximal effect on lipid peroxidation levels in rat liver mitochondria [57]. However, this concentration of iron could not be used for the measurement of complex I activity, since we observed that $50 \mu\text{M}$ Fe^{2+} fully inhibits the activity of this complex and could not be rescued by preincubation with antioxidants; thus, a concentration of $25 \mu\text{M}$ iron was selected, which was also used for the measurement of ROS levels, since larger concentrations did not further increase ROS levels. On the other hand, complex IV was found to be insensitive to inhibition by $50 \mu\text{M}$ Fe^{2+} ; therefore, a concentration of $100 \mu\text{M}$ Fe^{2+} was used. Also, in preliminary experiments, it was observed that a 2:1 ratio of polydatin–iron completely inhibited lipid peroxidation; hence, a 2:1 ratio of polydatin–iron was set for all experiments.

4.3. Lipid Peroxidation Assay

Lipid peroxidation levels were determined by the method reported by Eldelmeier et al. [58]. A 10 mM solution of N-methyl-2-phenylindole in acetonitrile and methanol (3:1; v/v) was prepared. To each tube containing 0.5 mg/mL of mitochondrial protein, freshly treated as described in the previous section, 1.3 mL of N-methyl-2-phenylindole solution and $300 \mu\text{L}$ of methanesulfonic acid were added. A 0.01 M FeCl_3 solution was prepared and $20 \mu\text{L}$ was added to each tube and mixed on a vortex shaker. The tubes were incubated in a water bath at 45°C for 30 min. Subsequently, 1 mL of butanol was added and incubated for 10 min. The absorbance was determined at 586 nm on a Shimadzu UV2550 spectrophotometer (Kyoto, Japan).

4.4. Determination of Cardiolipin Levels

Cardiolipin levels were assessed with acridine orange dye according to the protocol described by Petit et al. [38]. A total of $10 \mu\text{M}$ nonylacridine orange (catalog #A7847, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was added to 0.1 mg/mL of freshly incubated mitochondria as described above. The final volume of this solution was adjusted to 1 mL with 50 mM Tris/HCl buffer (pH 7.4). Samples were incubated for 10 min and centrifuged at $12,000 \text{ rpm}$ for 10 min and the absorbance of the supernatant was determined at 495 nm . The concentration of free nonylacridine orange was calculated from a calibration curve of known concentrations of nonylacridine orange (0 – $150 \mu\text{M}$). The fraction of nonylacridine orange bound to cardiolipin was calculated by subtracting the total concentration of nonylacridine orange added to the mitochondria minus the free colorant in the supernatant. The mitochondrial cardiolipin concentration was calculated, taking into account a stoichiometry of 2 moles of nonylacridine orange/mol cardiolipin.

4.5. Evaluation of the Activities of ETC Complexes

Subsequent to treatment of the mitochondria as described above, the mitochondria were solubilized with Triton X-100 at a final concentration of 0.01% ($6 \mu\text{L}$ of a $10\times$ Triton solution in a total volume of 600 mL) to facilitate access for substrates and inhibitors to the redox sites of the ETC complexes, as per the protocol described by Hallberg et al. [59]. The activity of Complex I was determined by assessing NADH oxidation using $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ as electron acceptor. A total of 0.3 mg/mL of mitochondria, which had undergone three previous freeze-thaw cycles, was resuspended in 1 mL of 50 mM KH_2PO_4 buffer and incubated with $1 \mu\text{g}$ of antimycin A and 1 mM KCN. Following a five-minute incubation period, 5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ was added, and the absorbance was measured for one minute at 340 nm using a Shimadzu UV2550 spectrophotometer. Subsequently, NADH was added, and its oxidation was monitored for a period of four minutes. The rate of NADH oxidation was calculated using the molar extinction coefficient of $6.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [60].

The enzyme activity of Complex II was assessed at room temperature through the measurement of the succinate-stimulated reduction of 2,6-dichlorophenyl indophenol (DCIP). Mitochondrial permeability was achieved through the use of 0.05% Triton X-100 detergent. The reaction mixture consisted of 50 mM KH_2PO_4 buffer (pH 7.6), 0.3 mg/mL Triton X-100-permeabilized mitochondria, 80 μM DCIP, 1 μg antimycin A, and 0.75 mM KCN, with a final volume of 1 mL. Following a five-minute incubation period with the inhibitors, the reaction was initiated with 10 mM sodium succinate (pH 7.6). Changes in absorbance were recorded on a Shimadzu UV2550 spectrophotometer at a wavelength of 600 nm. The reduction rate of DCIP was calculated from the slope of the absorbance graph using the molar extinction coefficient of $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for DCIP [60].

The reaction mixture employed to ascertain the activity of complex III comprised 50 mM KH_2PO_4 (pH 7.6), 0.1 mg/mL permeabilized mitochondria, 1.5 mg oxidized cytochrome *c*, and 0.75 mM KCN, in a final volume of 1 mL. Following a five-minute incubation period, the reaction was initiated by the addition of 10 mM sodium succinate (pH 7.6). The reaction was terminated by the addition of 1 μg of antimycin A. The absorbance changes were recorded on a Shimadzu UV2550 spectrophotometer at 550 nm. The rate of cytochrome *c* reduction was calculated from the slopes of the absorbance plots using the molar extinction coefficient of $19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for cytochrome *c* [60]. The reduction of antimycin A-sensitive cytochrome *c* was calculated by subtracting the activity in the presence of antimycin A and succinate from the activity stimulated with succinate alone.

To measure the enzymatic activity of complex IV, the reaction mixture consisted of 50 mM KH_2PO_4 (pH 7.6), 0.1 mg/mL permeabilized mitochondria, and 1 μg antimycin A, with a final volume of 1 mL. Following a five-minute incubation period, the reaction was initiated by adding 250 μg of cytochrome *c*, which had been reduced with dithionite. The absorbance changes were recorded on a Shimadzu UV2550 spectrophotometer at 550 nm. The oxidation rate of cytochrome *c* was calculated from the slopes of the absorbance plots using the molar extinction coefficient of $19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for cytochrome *c* [60].

4.6. Determination of Cytochrome Levels

Cytochrome content was obtained by measuring, at room temperature, reduced minus oxidized spectra of mitochondria with a Shimadzu UV2550 spectrophotometer. A total of 5 mg/mL of mitochondrial protein previously incubated with iron and antioxidants as described above was placed in reference and sample cuvettes to record a baseline. Prior to recording the reduced spectra, 0.01 g of sodium dithionite was added as a reducing agent in the reference cuvette. The spectra were evaluated between 500 and 620 nm. The cytochrome content was determined from the molar extinction coefficients and wavelengths reported in [61].

4.7. Assessment of ROS Production

ROS production was determined with the fluorescent probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$, catalog #D6883, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). A total of 0.5 mg/mL of mitochondrial protein previously treated with iron or antioxidants, as described above, was used. The mitochondrial protein was resuspended in a buffer containing 10 mM HEPES, 100 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , and 3 mM KH_2PO_4 (pH 7.4), and incubated with the fluorescent probe for 20 min at 4°C under constant shaking. After incubation, the suspension was placed in a quartz cuvette and the basal fluorescence was recorded. After one minute, 10 mM glutamate/malate was added as a substrate for complex I. After 10 min, 1 μg antimycin A was added for 5 min. Fluorescence was measured at 30°C on a Shimadzu RF-5301PC spectrofluorometer (λ_{ex} 491 nm; λ_{em} 518 nm).

4.8. Statistical Analysis of Data

Data were expressed as the mean $\pm$ standard error of $n \geq 3$. Statistically significant differences between the means of each group were analyzed with an analysis of variance

(one-way ANOVA), followed by the post hoc tests mentioned in the legend of each figure ($p < 0.05$), using SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA).

5. Conclusions

Polydatin prevented iron-induced mitochondrial damage under in vitro conditions by preventing increased ROS formation, which attenuated lipid peroxidation and cardiolipin loss. The above was associated with a preservation of cytochrome levels, resulting in the improved functioning of ETC complexes. These effects could mediate the beneficial effects of polydatin in liver diseases characterized by increased iron levels, excessive ROS production, mitochondrial dysfunction, and lipid damage, including cardiolipin.

Author Contributions: Conceptualization, E.C.-C.; methodology, C.C.-R. and D.J.P.-M.; formal analysis, E.C.-C., C.C.-R. and M.A.V.-V.; investigation, I.R.-B., E.P.S.-G. and D.J.P.-M.; resources, E.C.-C., C.C.-R. and A.S.-M.; writing—original draft preparation, I.R.-B., E.P.S.-G. and M.A.V.-V.; writing—review and editing, E.C.-C. and C.C.-R.; supervision, E.C.-C. and C.C.-R.; project administration, E.C.-C.; funding acquisition, E.C.-C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by the Programa Proyectos de Investigación financiados 2022–2024, Coordinación de Investigación Científica, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (8762947).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with guidelines outlined in the Mexican Federal Regulations for the Use and Care of Animals (NOM-062-ZOO-1999). This study received approval from the Institutional Bioethics and Biosecurity Committee of the Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, of Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo approved on 5 December 2022.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors on request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Szalárdy, L.; Zádori, D.; Klivényi, P.; Toldi, J.; Vécsei, L. Electron Transport Disturbances and Neurodegeneration: From Albert Szent-Györgyi's Concept (Szeged) till Novel Approaches to Boost Mitochondrial Bioenergetics. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2015**, *2015*, 498401. [CrossRef] [PubMed]
2. McInnes, J. Mitochondrial-associated metabolic disorders: Foundations, pathologies and recent progress. *Nutr. Metab.* **2013**, *10*, 63. [CrossRef] [PubMed]
3. Brand, M.D.; Nicholls, D.G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem. J.* **2011**, *435*, 297–312. [CrossRef] [PubMed]
4. Zorova, L.D.; Popkov, V.A.; Plotnikov, E.Y.; Silachev, D.N.; Pevzner, I.B.; Jankauskas, S.S.; Babenko, V.A.; Zorov, S.D.; Balakireva, A.V.; Juhaszova, M.; et al. Mitochondrial membrane potential. *Ann. Biochem.* **2017**, *552*, 50–59. [CrossRef]
5. Paradies, G.; Paradies, V.; Ruggiero, F.M.; Petrosillo, G. Role of Cardiolipin in Mitochondrial Function and Dynamics in Health and Disease: Molecular and Pharmacological Aspects. *Cells* **2019**, *8*, 728. [CrossRef]
6. Panov, A.V.; Dikalov, S.I. Cardiolipin, Peroxyl Radicals, and Lipid Peroxidation in Mitochondrial Dysfunctions and Aging. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2020**, *2020*, 1323028. [CrossRef]
7. Vähäheikkilä, M.; Peltomaa, T.; Rög, T.; Vazdar, M.; Pöyry, S.; Vattulainen, I. How Cardiolipin Peroxidation Alters the Properties of the Inner Mitochondrial Membrane? *Chem. Phys. Lipids* **2018**, *214*, 15–23. [CrossRef]
8. Ott, M.; Zhivotovsky, B.; Orrenius, S. Role of cardiolipin in cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ.* **2007**, *14*, 1243–1247. [CrossRef]
9. Gaspard, G.J.; McMaster, C.R. Cardiolipin metabolism and its causal role in the etiology of the inherited cardiomyopathy Barth syndrome. *Chem. Phys. Lipids* **2015**, *193*, 1–10. [CrossRef]
10. Paradies, G.; Paradies, V.; Ruggiero, F.M.; Petrosillo, G. Mitochondrial bioenergetics and cardiolipin alterations in myocardial ischemia-reperfusion injury: Implications for pharmacological cardioprotection. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2018**, *315*, H1341–H1352. [CrossRef]

11. Pointer, C.B.; Klegeris, A. Cardiolipin in Central Nervous System Physiology and Pathology. *Cell Mol. Neurobiol.* **2017**, *37*, 1161–1172. [CrossRef] [PubMed]
12. Birk, A.V.; Chao, W.M.; Bracken, C.; Warren, J.D.; Szeto, H.H. Targeting mitochondrial cardiolipin and the cytochrome c/cardiolipin complex to promote electron transport and optimize mitochondrial ATP synthesis. *Br. J. Pharmacol.* **2014**, *171*, 2017–2028. [CrossRef] [PubMed]
13. Liu, G.; Sil, D.; Maio, N.; Tong, W.H.; Bollinger, J.M.; Krebs, C.; Rouault, T.A. Heme biosynthesis depends on previously unrecognized acquisition of iron-sulfur cofactors in human amino-levulinic acid dehydratase. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 6310. [CrossRef] [PubMed]
14. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett.* **1992**, *307*, 108–112. [CrossRef] [PubMed]
15. Paradies, G.; Paradies, V.; Ruggiero, F.M.; Petrosillo, G. Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 14205–14218. [CrossRef]
16. Sekine, S.; Ito, K.; Watanabe, H.; Nakano, T.; Moriya, K.; Shintani, Y.; Fujie, H.; Tsutsumi, T.; Miyoshi, H.; Fujinaga, H.; et al. Mitochondrial iron accumulation exacerbates hepatic toxicity caused by hepatitis C virus core protein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2015**, *282*, 237–243. [CrossRef]
17. Kohgo, Y.; Ikuta, K.; Ohtake, T.; Torimoto, Y.; Kato, J. Iron overload and cofactors with special reference to alcohol, hepatitis C virus infection and steatosis/insulin resistance. *World J. Gastroenterol.* **2007**, *13*, 4699–4706. [CrossRef]
18. Ajith, T.A. Role of mitochondria and mitochondria-targeted agents in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2018**, *45*, 413–421. [CrossRef]
19. Zhao, X.J.; Chen, L.; Zhao, Y.; Pan, Y.; Yang, Y.Z.; Sun, Y.; Jiao, R.Q.; Kong, L.D. Polygonum cuspidatum extract attenuates fructose-induced liver lipid accumulation through inhibiting Keap1 and activating Nrf2 antioxidant pathway. *Phytomedicine* **2019**, *63*, 152986. [CrossRef]
20. Lai, Y.; Zhou, C.; Huang, P.; Dong, Z.; Mo, C.; Xie, L.; Lin, H.; Zhou, Z.; Deng, G.; Liu, Y.; et al. Polydatin alleviated alcoholic liver injury in zebrafish larvae through ameliorating lipid metabolism and oxidative stress. *J. Pharmacol. Sci.* **2018**, *138*, 46–53. [CrossRef]
21. Koneru, M.; Sahu, B.D.; Gudem, S.; Kuncha, M.; Ravuri, H.G.; Kumar, J.M.; Kilari, E.K.; Sistla, R. Polydatin alleviates alcohol-induced acute liver injury in mice: Relevance of matrix metalloproteinases (MMPs) and hepatic antioxidants. *Phytomedicine* **2017**, *27*, 23–32. [CrossRef] [PubMed]
22. Hao, J.; Chen, C.; Huang, K.; Huang, J.; Li, J.; Liu, P.; Huang, H. Polydatin improves glucose and lipid metabolism in experimental diabetes through activating the Akt signaling pathway. *Eur. J. Pharmacol.* **2014**, *745*, 152–165. [CrossRef] [PubMed]
23. Wang, H.L.; Gao, J.P.; Han, Y.L.; Xu, X.; Wu, R.; Gao, Y.; Cui, X.H. Comparative studies of polydatin and resveratrol on mutual transformation and antioxidative effect in vivo. *Phytomedicine* **2015**, *22*, 553–559. [CrossRef] [PubMed]
24. Pang, N.; Chen, T.; Deng, X.; Chen, N.; Li, R.; Ren, M.; Li, Y.; Luo, M.; Hao, H.; Wu, J.; et al. Polydatin Prevents Methylglyoxal-Induced Apoptosis through Reducing Oxidative Stress and Improving Mitochondrial Function in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2017**, *2017*, 7180943. [CrossRef]
25. Zhang, M.; Zhao, Z.; Shen, M.; Zhang, Y.; Duan, J.; Guo, Y.; Zhang, D.; Hu, J.; Lin, J.; Man, W.; et al. Polydatin protects cardiomyocytes against myocardial infarction injury by activating Sirt3. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2017**, *1863*, 1962–1972. [CrossRef]
26. Zhang, M.; Wang, S.; Cheng, Z.; Xiong, Z.; Lv, J.; Yang, Z.; Li, T.; Jiang, S.; Gu, J.; Sun, D.; et al. Polydatin ameliorates diabetic cardiomyopathy via Sirt3 activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *493*, 1280–1287. [CrossRef]
27. Li, T.; Liu, Y.; Xu, W.; Dai, X.; Liu, R.; Gao, Y.; Chen, Z.; Li, Y. Polydatin mediates Parkin-dependent mitophagy and protects against mitochondria-dependent apoptosis in acute respiratory distress syndrome. *Lab. Invest.* **2019**, *99*, 819–829. [CrossRef]
28. Bheerreddy, P.; Yerra, V.G.; Kalvala, A.K.; Sherkhane, B.; Kumar, A. SIRT1 Activation by Polydatin Alleviates Oxidative Damage and Elevates Mitochondrial Biogenesis in Experimental Diabetic Neuropathy. *Cell Mol. Neurobiol.* **2021**, *41*, 1563–1577. [CrossRef]
29. Su, D.; Cheng, Y.; Liu, M.; Liu, D.; Cui, H.; Zhang, B.; Zhou, S.; Yang, T.; Mei, Q. Comparison of piceid and resveratrol in antioxidant and antiproliferation activities in vitro. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e54505. [CrossRef]
30. North, J.A.; Spector, A.A.; Buettner, G.R. Detection of lipid radicals by electron paramagnetic resonance spin trapping using intact cells enriched with polyunsaturated fatty acid. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 5743–5746. [CrossRef]
31. Pryor, W.A. Mechanisms of radical formation from reactions of ozone with target molecules in the lung. *Free Radic. Biol. Med.* **1994**, *17*, 451–465. [CrossRef] [PubMed]
32. PubChem. Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Piceid#section=Computed-Properties> (accessed on 17 August 2024).
33. PubChem. Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/31404#section=Computed-Properties> (accessed on 17 August 2024).
34. Schlame, M.; Rua, D.; Greenberg, M.L. The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog. Lipid Res.* **2000**, *39*, 257–288. [CrossRef] [PubMed]

35. Gohil, V.M.; Gvozdenovic-Jeremic, J.; Schlame, M.; Greenberg, M.L. Binding of 10-N-nonyl acridine orange to cardiolipin-deficient yeast cells: Implications for assay of cardiolipin. *Anal. Biochem.* **2005**, *343*, 350–352. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Jacobson, J.; Duchon, M.R.; Heales, S.J. Intracellular distribution of the fluorescent dye nonyl acridine orange responds to the mitochondrial membrane potential: Implications for assays of cardiolipin and mitochondrial mass. *J. Neurochem.* **2002**, *82*, 224–233. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Schlame, M. Assays of cardiolipin levels. *Methods Cell Biol.* **2007**, *80*, 223–240.
38. Petit, J.M.; Maftah, A.; Ratinaud, M.H.; Julien, R. 10N-nonyl acridine orange interacts with cardiolipin and allows the quantification of this phospholipid in isolated mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *209*, 267–273. [\[CrossRef\]](#)
39. García Fernández, M.I.; Ceccarelli, D.; Muscatello, U. Use of the fluorescent dye 10-N-nonyl acridine orange in quantitative and location assays of cardiolipin: A study on different experimental models. *Anal. Biochem.* **2004**, *328*, 174–180. [\[CrossRef\]](#)
40. Fakhri, S.; Gravandi, M.M.; Abdian, S.; Akkol, E.K.; Farzaei, M.H.; Sobarzo-Sánchez, E. The Neuroprotective Role of Polydatin: Neuropharmacological Mechanisms, Molecular Targets, Therapeutic Potentials, and Clinical Perspective. *Molecules* **2021**, *26*, 5985. [\[CrossRef\]](#)
41. Lizák, B.; Szarka, A.; Kim, Y.; Choi, K.S.; Németh, C.E.; Marcolongo, P.; Benedetti, A.; Bánhegyi, G.; Margittai, É. Glucose Transport and Transporters in the Endomembranes. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5898. [\[CrossRef\]](#)
42. Iverson, S.L.; Orrenius, S. The cardiolipin-cytochrome c interaction and the mitochondrial regulation of apoptosis. *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, *423*, 37–46. [\[CrossRef\]](#)
43. Xia, D.; Yu, C.A.; Zhou, F.; Esser, L. Ubiquinol-Cytochrome c Oxidoreductase (Complex III). In *Encyclopedia of Biophysics*; Roberts, G., Watts, A., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2018; pp. 1–8.
44. Zong, S.; Wu, M.; Gu, J.; Liu, T.; Guo, R.; Yang, M. Structure of the intact 14-subunit human cytochrome c oxidase. *Cell Res.* **2018**, *10*, 1026–1034. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Paradies, G.; Paradies, V.; De Benedictis, V.; Ruggiero, F.M.; Petrosillo, G. Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1837*, 408–417. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Safer, A.M.; al-Nughamish, A.J. Hepatotoxicity induced by the anti-oxidant food additive, butylated hydroxytoluene (BHT), in rats: An electron microscopical study. *Histol. Histopathol.* **1999**, *2*, 391–406.
47. Tang, D.; Zhang, Q.; Duan, H.; Ye, X.; Liu, J.; Peng, W.; Wu, C. Polydatin: A Critical Promising Natural Agent for Liver Protection via Antioxidative Stress. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2022**, *2022*, 9218738. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Feng, S.; Tang, D.; Wang, Y.; Li, X.; Bao, H.; Tang, C.; Dong, X.; Li, X.; Yang, Q.; Yan, Y.; et al. The mechanism of ferroptosis and its related diseases. *Mol. Biomed.* **2023**, *4*, 33.
49. Wu, J.; Wang, Y.; Jiang, R.; Xue, R.; Yin, X.; Wu, M.; Meng, Q. Ferroptosis in liver disease: New insights into disease mechanisms. *Cell Death Discov.* **2021**, *7*, 276. [\[CrossRef\]](#)
50. Xie, Y.; Kang, R.; Klionsky, D.J.; Tang, D. GPX4 in cell death, autophagy, and disease. *Autophagy* **2023**, *19*, 2621–2638. [\[CrossRef\]](#)
51. Petrat, F.; de Groot, H.; Rauen, U. Subcellular distribution of chelatable iron: A laser scanning microscopic study in isolated hepatocytes and liver endothelial cells. *Biochem. J.* **2001**, *356*, 61–69. [\[CrossRef\]](#)
52. Petrat, F.; Weisheit, D.; Lensen, M.; de Groot, H.; Sustmann, R.; Rauen, U. Selective determination of mitochondrial chelatable iron in viable cells with a new fluorescent sensor. *Biochem. J.* **2002**, *362*, 137–147. [\[CrossRef\]](#)
53. Fischer, C.; Volani, C.; Komlódi, T.; Seifert, M.; Demetz, E.; Valente de Souza, L.; Auer, K.; Petzer, V.; von Raffay, L.; Moser, P.; et al. Dietary Iron Overload and Hfe^{-/-} Related hemochromatosis alter hepatic mitochondrial function. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1818. [\[CrossRef\]](#)
54. Jouihan, H.A.; Cobine, P.A.; Cooksey, R.C.; Hoagland, E.A.; Boudina, S.; Abel, E.D.; Winge, D.R.; McClain, D.A. Iron-mediated inhibition of mitochondrial manganese uptake mediates mitochondrial dysfunction in a mouse model of hemochromatosis. *Mol. Med.* **2008**, *14*, 98–108. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Vercellino, I.; Sazanov, L.A. Structure and assembly of the mammalian mitochondrial supercomplex CIII2CIV. *Nature* **2021**, *598*, 364–367. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. NOM-062-ZOO-1999; Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación: Ciudad de México, México, 1999.
57. Ortiz-Avila, O.; Gallegos-Corona, M.A.; Sánchez-Briones, L.A.; Calderón-Cortés, E.; Montoya-Pérez, R.; Rodríguez-Orozco, A.R.; Campos-García, J.; Saavedra-Molina, A.; Mejía-Zepeda, R.; Cortés-Rojas, C. Protective effects of dietary avocado oil on impaired electron transport chain function and exacerbated oxidative stress in liver mitochondria from diabetic rats. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2015**, *47*, 337–353. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Erdelmeier, J.; Gérard-Monnier, D.; Yadan, J.C.; Chaudière, J. Reactions of N-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Mechanistic aspects of the colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *10*, 1184–1194. [\[CrossRef\]](#)
59. Hallberg, E.M.; Shu, Y.; Hallberg, R.L. Loss of mitochondrial hsp60 function: Nonequivalent effects on matrix-targeted and intermembrane-targeted proteins. *Mol. Cell Biol.* **1993**, *5*, 3050–3057.

60. Hurtado-Núñez, G.E.; Cortés-Rojo, C.; Sánchez-Ceja, S.G.; Martínez-Flores, H.E.; Salgado-Garciglia, R.; Bartolomé-Camacho, M.C.; García-Pérez, M.E. Gallic, ellagic acids and their oral combined administration induce kidney, lung, and heart injury after acute exposure in Wistar rats. *Food Chem. Toxicol.* **2022**, *170*, 113492. [[CrossRef](#)]
61. Cortés-Rojo, C.; Calderón-Cortés, E.; Clemente-Guerrero, M.; Estrada-Villagómez, M.; Manzo-Avalos, S.; Mejía-Zepeda, R.; Boldogh, I.; Saavedra-Molina, A. Elucidation of the effects of lipoperoxidation on the mitochondrial electron transport chain using yeast mitochondria with manipulated fatty acid content. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2009**, *41*, 15–28. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.