

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS



**“INHIBICIÓN DEL COMPLEJO I COMO UN POSIBLE  
MECANISMO DEL DAÑO OXIDATIVO, MITOCONDRIAL Y  
CELULAR INDUCIDO POR ANTI-INFLAMATORIOS NO-  
ESTEROIDALES”**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado  
académico de Magister en Bioquímica área de especialización  
en Toxicología y Diagnóstico Molecular y Memoria para optar al  
título profesional de Bioquímico**

Por

**CRISTIAN SANDOVAL ACUÑA**

Director de Tesis

**Dr. Hernán Speisky Cosoy**

**SANTIAGO- CHILE  
2011**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN  
TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magister presentada por el candidato:

**CRISTIAN SANDOVAL ACUÑA**

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Magister en Bioquímica área de especialización Toxicología y Diagnóstico Molecular y al título de Bioquímico, en el examen de defensa de Tesis rendido el día ..... de 2011.

**Director de Tesis:**

Dr. Hernan Speisky C.

\_\_\_\_\_

**Comisión Informante de Tesis:**

Dr. Marcelo Kogan B. (Presidente)

\_\_\_\_\_

Dr. Alejandro Álvarez L.

\_\_\_\_\_

Dra. Virginia Fernández A.

\_\_\_\_\_

**A todos los que me ayudaron a caminar**

**“Caminante no hay camino, se hace camino al andar...  
caminante no hay camino, sino estelas en la mar”**

## **AGRADECIMIENTOS**

*Al profesor Hernán Speisky, por su apoyo, enseñanzas y consejos.*

*A mi comisión de tesis por sus consejos y guía.*

*A mi madre, siempre presente, por su amor y sus palabras, siempre justas, siempre cálidas, siempre a tiempo. A mi padre por su amor, por su apoyo, por creer en mí siempre. A mis hermanos Pablo y Llacolén por su amor incondicional y su alegría interminable. Gracias por ser parte de mí, por acompañarme durante mi vida y por ayudarme a ser quien soy. Los amo mucho.*

*A mi tío Ricardo, por ser mi pilar durante mi vida en Chile, a mi tía Sandy por contagiarme toda su alegría, a mis primos Martín y Macarena por ayudarme a vivir lejos de mi familia. Ustedes son parte vital de lo que hoy he conseguido.*

*A mi tío Héctor, por la siempre oportuna llamada y consejo, a mi tía Karina por demostrarme que aún a lo lejos el cariño permanece, a mis primos Paula y Francisco, por ese cariño incondicional que vence todas las distancias.*

*A mis abuelas Sylvia y Elsa, por ser mis segundas madres. A mis abuelos Héctor y Eduardo, por ser un ejemplo de la clase de hombre que espero algún día llegar a ser.*

*A toda mi familia, por demostrarme el valor de la familia, por estar siempre juntos y permitirme ser parte de la felicidad que surge del seno familiar.*

*A mis compañeras del laboratorio, Cata, Jocelyn, Maritza, Margarita y Leo, por su alegría contagiosa y sus sabios consejos.*

*A mis compañeros de universidad, por caminar conmigo durante casi 7 años, compartiendo triunfos y sinsabores.*

*A mis compañeros de vóley, por enseñarme el valor de la amistad y el compromiso por un ideal común.*

*A mis amigos, por su compañía y apoyo constante*

*A mi Anita, por quererme y entenderme, retarme cuando fue necesario y por siempre apoyarme en mis decisiones, por más locas que parecieran. Te amo.*

## **PUBLICACIONES**

Speisky H., López-Alarcón C., Olea-Azar C., Sandoval-Acuña C., Aliaga M. E., Role of superoxide anions in the redox changes affecting the physiologically-occurring Cu(I)-Glutathione complex., *Bioinorg Chem App*, 2011, (In press).

## **PRESENTACIONES EN CONGRESOS**

Sandoval-Acuña C., Carrasco-Pozo C., Speisky H., Polifenoles de la manzana: redescubriendo el fruto prohibido, I Simposio de Radicales Libres y Antioxidantes, FRAG-Chile, Diciembre 3, 2010. Valparaíso, Chile. Co-autor de la presentación realizada por el PhD. Hernán Speisky C.

Sandoval-Acuña C., Carrasco-Pozo C., Speisky H., Mitochondrial Complex I inhibition by Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: A putative mechanism for their gastrotoxicity, III International Conference of Oxidative Stress, Havana-Redox 2011, Enero 27 - 29, 2011. La Habana, Cuba. Presentación de Poster.

Speisky H., López-Alarcón C., Olea-Azar C., Sandoval-Acuña C., Aliaga M. E., Role of superoxide anions in the redox changes that affect the physiologically-occurring Cu(I)-glutathione complex., XXIX Jornadas Chilenas de Química. Noviembre 8 - 11, 2011. Concepción, Chile. Poster enviado.

## ABREVIATURAS

AINEs	Anti-Inflamatorios No Esteroidales
BSA	Albúmina de Bovino
CoQ	Coenzima Q
COX	Ciclooxigenasa
CTE	Cadena Transportadora de Electrones
CuZnSOD	Superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc
Cx-I	Complejo I
Cx-II	Complejo II
Cx-III	Complejo III
Cx-IV	Complejo IV
Cx-V	Complejo V
DCDHF	Dicloro-dihidrofluoresceina
DCDHF-DA	Dicloro-dihidrofluoresceina diacetato
DHE	Dehidroetidium
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FMN	Flavina mononucleótido
GI	Gastrointestinal
GPX	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrógeno
HOO•	Radical Hidroperoxi
LDH	Lactato Deshidrogenasa
MnSOD	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso
MPP <sup>+</sup>	1-metil-4-fenilpiridinium
MPTP	Poros de Transición Mitocondrial
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Radical Superóxido
OH•	Radical Hidroxilo
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SOD	Superóxido dismutasa
TGI	Tracto Gastrointestinal
URF	Unidades Relativas de Fluorescencia

## **INDICE GENERAL**

<b>INDICE FIGURAS Y TABLAS</b>	<b>XI</b>
<b>INDICE ANEXOS</b>	<b>XIV</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>XV</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XVII</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Anti-Inflamatorios No Esteroidales y mecanismos asociados a su gastrotoxicidad. ....	1
1.2 Mitochondria y producción de ATP. ....	3
1.3 Disminución de la síntesis mitocondrial de ATP .....	6
1.4 Complejo I mitocondrial y su función .....	11
1.5 Producción de ROS mitocondrial .....	13
1.6 Quercetina: un antioxidante natural .....	16
<b>2 HIPÓTESIS</b>	<b>18</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
3.1 Objetivo General .....	19
3.2 Objetivos Específicos.....	19
<b>4 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>20</b>
4.1 Reactivos .....	20

<b>4.2</b>	<b>Métodos generales.....</b>	<b>20</b>
4.2.1	Aislamiento de mitocondrias de epitelio duodenal de rata. _____	20
4.2.2	Células y condiciones de cultivo. _____	20
4.2.3	Aislamiento de mitocondrias desde células Caco-2. _____	21
4.2.4	Cuantificación de proteínas. _____	21
<b>4.3</b>	<b>Métodos relacionados con el objetivo específico 1 .....</b>	<b>22</b>
4.3.1	Ensayos de actividad de complejo I. _____	22
4.3.2	Efecto de AINES sobre la actividad del complejo I en mitocondrias aisladas. ____	22
4.3.3	Actividad del complejo I en células Caco-2 incubadas con AINES. _____	23
<b>4.4</b>	<b>Métodos relacionados con el objetivo específico 2 .....</b>	<b>23</b>
4.4.1	Ensayo de producción de superóxido en mitocondrias aisladas de epitelio duodenal de rata expuestas a AINES. _____	23
4.4.2	Ensayo de cuantificación de superóxido mitocondrial en células Caco-2 expuestas a AINES. _____	24
4.4.3	Ensayo de cuantificación del tenor oxidativo en células Caco-2. _____	24
4.4.4	Ensayo de liberación de LDH. _____	24
<b>4.5</b>	<b>Métodos relacionados con el objetivo específico 3 .....</b>	<b>25</b>
4.5.1	Efecto de coenzima Q y NADH sobre la inhibición del complejo I inducida por AINES. _____	25
<b>4.6</b>	<b>Métodos relacionados con el objetivo específico 4 .....</b>	<b>25</b>
4.6.1	Efecto de quercetina sobre la inhibición del complejo I inducida por AINES en mitocondrias aisladas. _____	25
4.6.2	Efecto de quercetina sobre la inhibición del complejo I en células Caco-2 incubadas con AINES. _____	26
4.6.3	Efecto de quercetina sobre la producción de superóxido en mitocondrias aisladas expuestas a AINES. _____	26
4.6.4	Efecto de quercetina sobre la producción de superóxido mitocondrial en células Caco-2 expuestas a AINES. _____	26



4.6.5	Efecto de quercetina sobre el tenor oxidativo de células Caco-2 expuestas a AINEs. _____	26
4.6.6	Efecto de quercetina sobre la viabilidad de células Caco-2 expuestas a AINEs. _____	27
<b>4.7</b>	<b>Métodos relacionados con el objetivo específico 5 .....</b>	<b>27</b>
4.7.1	Efecto de quercetina sobre la actividad del complejo I en mitocondrias aisladas. _____	27
4.7.2	Actividad del sistema complejo I - complejo III. _____	27
4.7.3	Efecto de quercetina sobre la actividad del sistema complejo I – complejo III en mitocondrias aisladas. _____	28
4.7.4	Ensayo de consumo de oxígeno mitocondrial. _____	28
4.7.5	Efecto de quercetina sobre el consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas. _____	29
<b>4.8</b>	<b>Análisis estadísticos .....</b>	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS _____</b>	<b>30</b>
<b>5.1</b>	<b>Resultados relacionados con el objetivo específico 1.....</b>	<b>30</b>
5.1.1	Inhibición del Cx-I de mitocondrias aisladas inducida por AINEs. _____	30
5.1.2	Inhibición del Cx-I mitocondrial en células Caco-2 expuestas a AINEs. _____	30
<b>5.2</b>	<b>Resultados relacionados con el objetivo específico 2.....</b>	<b>31</b>
5.2.1	Efecto de AINEs sobre la producción de superóxido mitocondrial. _____	31
5.2.2	Efecto de AINEs sobre el tenor oxidativo de células Caco-2. _____	32
5.2.3	Citotoxicidad de AINEs. _____	32
<b>5.3</b>	<b>Resultados relacionados con el objetivo específico 3.....</b>	<b>33</b>
5.3.1	Efecto de concentraciones crecientes de coenzima Q y de NADH sobre la inhibición del Cx-I inducida por AINEs. _____	33
<b>5.4</b>	<b>Resultados relacionados con el objetivo específico 4.....</b>	<b>35</b>
5.4.1	Efecto de quercetina sobre la inhibición del Cx-I inducida por AINEs. _____	35

5.4.2	Efecto de quercetina sobre la producción de superóxido mitocondrial	36
5.4.3	Efecto de quercetina sobre el incremento en el tenor oxidativo celular inducido por AINEs.	37
5.4.4	Efecto de quercetina sobre la viabilidad de células Caco-2 expuestas a AINEs.	37
<b>5.5</b>	<b>Resultados relacionados con el objetivo específico 5.....</b>	<b>38</b>
5.5.1	Efecto de quercetina sobre la actividad del complejo I, complejos I-III y sobre el consumo de oxígeno mitocondrial.	38
<b>6</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>40</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>55</b>
	<b>PROYECCIONES DE ESTUDIOS</b>	<b>57</b>
	<b>REFERENCIAS</b>	<b>59</b>
	<b>FIGURAS Y TABLAS</b>	<b>65</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>105</b>

## INDICE FIGURAS Y TABLAS

---

<b>Figura 1.</b> Efecto de diferentes AINEs sobre la actividad del complejo I mitocondrial. ....	65
<b>Figura 2 (A).</b> Efecto de indometacina sobre la actividad del complejo I.....	66
<b>Figura 2 (B).</b> Efecto de diclofenaco sobre la actividad del complejo I.....	67
<b>Figura 2 (C).</b> Efecto de piroxicam sobre la actividad del complejo I.....	68
<b>Figura 2 (D).</b> Efecto de ibuprofeno sobre la actividad del complejo I.....	69
<b>Figura 2 (E).</b> Efecto de aspirina sobre la actividad del complejo I .....	70
<b>Figura 3.</b> Actividad del complejo I en células Caco-2 expuestas a AINEs .....	71
<b>Figura 4.</b> Producción de superóxido en mitocondrias expuestas a AINEs .....	72
<b>Figura 5.</b> Producción de superóxido mitocondrial en células Caco-2 expuestas a AINEs.....	73
<b>Figura 6.</b> Tenor oxidativo de células Caco-2 expuestas a AINEs.....	74
<b>Figura 7.</b> Citotoxicidad de AINEs medida como liberación de LDH.....	75
<b>Figura 8 (A).</b> Efecto de co-incubación con concentraciones crecientes de coenzima Q sobre la inhibición del complejo I inducida por indometacina.....	76
<b>Figura 8 (B).</b> Efecto de co-incubación con concentraciones crecientes de coenzima Q sobre la inhibición del complejo I inducida por diclofenaco .....	77
<b>Figura 8 (C).</b> Efecto de co-incubación con concentraciones crecientes de coenzima Q sobre la inhibición del complejo I inducida por piroxicam.....	78
<b>Figura 8 (D).</b> Efecto de co-incubación con concentraciones crecientes de coenzima Q sobre la inhibición del complejo I inducida por ibuprofeno .....	79
<b>Figura 8 (E).</b> Efecto de co-incubación con concentraciones crecientes de coenzima Q sobre la inhibición del complejo I inducida por aspirina.....	80
<b>Figura 9 (A).</b> Efecto de la post-incubación con concentraciones crecientes de coenzima Q sobre la inhibición del complejo I inducida por indometacina .....	81
<b>Figura 9 (B).</b> Efecto de la post-incubación con concentraciones crecientes de coenzima Q sobre la inhibición del complejo I inducida por diclofenaco .....	82
<b>Figura 9 (C).</b> Efecto de la post-incubación con concentraciones crecientes de coenzima Q sobre la inhibición del complejo I inducida por piroxicam .....	83

<b>Figura 9 (D).</b> Efecto de la post-incubación con concentraciones crecientes de coenzima Q sobre la inhibición del complejo I inducida por ibuprofeno .....	84
<b>Figura 9 (E).</b> Efecto de la post-incubación con concentraciones crecientes de coenzima Q sobre la inhibición del complejo I inducida por aspirina.....	85
<b>Figura 10 (A).</b> Efecto de concentraciones crecientes de NADH sobre la inhibición del complejo I inducida por indometacina .....	86
<b>Figura 10 (B).</b> Efecto de concentraciones crecientes de NADH sobre la inhibición del complejo I inducida por diclofenaco.....	87
<b>Figura 10 (C).</b> Efecto de concentraciones crecientes de NADH sobre la inhibición del complejo I inducida por piroxicam.....	88
<b>Figura 10 (D).</b> Efecto de concentraciones crecientes de NADH sobre la inhibición del complejo I inducida por ibuprofeno.....	89
<b>Figura 10 (E).</b> Efecto de concentraciones crecientes de NADH sobre la inhibición del complejo I inducida por aspirina .....	90
<b>Figura 11 (A).</b> Efecto de quercetina sobre la inhibición del complejo I inducida por indometacina .....	91
<b>Figura 11 (B).</b> Efecto de quercetina sobre la inhibición del complejo I inducida por diclofenaco.....	92
<b>Figura 11 (C).</b> Efecto de quercetina sobre la inhibición del complejo I inducida por piroxicam .....	93
<b>Figura 11 (D).</b> Efecto de quercetina sobre la inhibición del complejo I inducida por ibuprofeno.....	94
<b>Figura 11 (E).</b> Efecto de quercetina sobre la inhibición del complejo I inducida por aspirina .....	95
<b>Tabla 1.</b> Efecto de quercetina sobre el IC50 del complejo I para diferentes AINEs .....	96
<b>Figura 12.</b> Efecto de quercetina sobre la inhibición del complejo I inducida por AINEs en células Caco-2 .....	97
<b>Figura 13.</b> Efecto de quercetina sobre el incremento en la producción de superóxido mitocondrial inducido por AINEs .....	98

<b>Figura 14.</b> Efecto de quercetina sobre el incremento en la producción de superóxido mitocondrial en células Caco-2 inducido por AINEs.....	99
<b>Figura 15.</b> Efecto de quercetina sobre el tenor oxidativo de células Caco-2 expuestas a AINEs.....	100
<b>Figura 16.</b> Efecto de quercetina sobre la viabilidad de células Caco-2 expuestas a AINEs .....	101
<b>Figura 17.</b> Quercetina como “coenzima Q mimético” en la actividad del complejo I.....	102
<b>Figura 18.</b> Quercetina como “coenzima Q mimético” en la actividad del sistema complejo I – complejo III.....	103
<b>Figura 19.</b> Quercetina como “coenzima Q mimético” en el consumo de oxígeno mitocondrial .....	104

## INDICE ANEXOS

---

<b>Figura 1.</b> Actividad del complejo I con distintas concentraciones de coenzima Q (co- incubación). .....	105
<b>Figura 2.</b> Actividad del complejo I con distintas concentraciones de coenzima Q (post- incubación). .....	106
<b>Figura 3.</b> Actividad del complejo I con distintas concentraciones de NADH .....	107
<b>Figura 4.</b> Actividad del complejo I con distintas concentraciones de quercetina .....	108

## RESUMEN

---

Los Anti-Inflamatorios No-Esteroidales (AINEs) son fármacos de estructura química heterogénea que tienen en común una acción anti-inflamatoria, anti-pirética y analgésica. Su mecanismo de acción comprende la inhibición de la enzima COX-2, responsable de la síntesis de prostaglandinas pro-inflamatorias. A pesar de su amplio uso y prescripción, los AINEs presentan importantes efectos secundarios a nivel gastrointestinal (GI). Si bien dichos efectos están parcialmente asociados a la inhibición de la isoforma COX-1, recientemente se ha postulado que, adicionalmente, la toxicidad de los AINEs implicaría una disfunción mitocondrial conducente a una caída en los niveles de ATP celular. Lo anterior desencadenaría un aumento de la permeabilidad del epitelio GI. Un evento importante en la síntesis de ATP mitocondrial es la transferencia de electrones a través de la cadena transportadora; lo anterior genera un gradiente de protones necesario para la fosforilación oxidativa. Siendo el complejo I un punto de entrada en la CTE, su inhibición redundaría no solo en una caída de ATP sino también en una mayor producción de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), lo que podría resultar en un incremento en el tenor oxidativo de la célula, conduciendo eventualmente a una pérdida de la viabilidad celular.

Resultados recientemente obtenidos en el laboratorio en el que se desarrolló la presente tesis muestran que el AINE indometacina sería capaz de inhibir el Cx-I e incrementar la formación de  $O_2^{\cdot-}$ . Un objetivo mayor de la presente tesis fue investigar si dicha inhibición es también observable con otros AINEs de estructura química diferente, como diclofenaco, piroxicam, ibuprofeno y aspirina. Los resultados obtenidos dan cuenta de que todos los AINEs testados son capaces de inhibir el complejo I e incrementar la producción de superóxido. Dicha inhibición se demostró tanto en mitocondrias aisladas como en células Caco-2 expuestas a tales agentes. Los AINEs también incrementaron el tenor oxidativo y disminuyeron la viabilidad de células Caco-2. Desde un punto de vista

mecanístico se observó que la inhibición del complejo I inducida por los diversos AINEs es totalmente reversible y susceptible a la competencia por parte de coenzima Q.

A la luz de antecedentes que sugieren un potencial gastroprotector del flavonoide quercetina, y por ser éste capaz de acumularse preferentemente en la mitocondria, se estudió la capacidad que tendría quercetina para contrarrestar la inhibición del complejo I inducida por los AINEs y el incremento en los parámetros oxidativos que se desprenden de dicha inhibición. Tanto en mitocondrias aisladas como en células Caco-2 expuestas a AINEs, se comprobó que quercetina es capaz de proteger frente a la inhibición del complejo I y frente al aumento en la producción de superóxido mitocondrial inducidos por AINEs. Además, en células Caco-2, quercetina previno el aumento en el tenor oxidativo y la disminución en la viabilidad celular observada tras la exposición de dichas células a los diversos AINEs.

Finalmente se estableció que, además de proteger contra la inhibición del complejo I, quercetina posee, aún a muy bajas concentraciones, la capacidad para actuar como un mimético de coenzima Q; en efecto, se estableció que quercetina permite el flujo normal de electrones, tanto a nivel del complejo I como entre los complejos I y III, y a lo largo de toda la cadena transportadora de electrones.

En su conjunto, los resultados expuestos no solo dan cuenta de un posible mecanismo mediante el cual los AINEs inducirían toxicidad mitocondrial y celular, sino además, basado en la propuesta acerca del rol que supone la inhibición del complejo I en el desarrollo de la toxicidad de dichos agentes, la presente investigación sienta antecedentes experimentales acerca del potencial mecanismo que subyacería a un acción gastro-protectora de quercetina. Esto último se desprende de la evidencia en torno a la capacidad que tiene quercetina para prevenir la inhibición del complejo I inducida por los AINEs y para asegurar, además, a través de una acción “mimética de coenzima Q” el correcto funcionamiento de la cadena de transporte de electrones.



## ABSTRACT

---

Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) are compounds of heterogeneous chemical structure that share anti-inflammatory, anti-pyretic and analgesic actions. Their mechanism of action involves the inhibition of COX-2, an enzyme responsible for the synthesis of pro-inflammatory prostaglandins. Despite their wide use and prescription, NSAIDs induce important gastro-intestinal side effects. Although those effects are mostly related to the COX-1 inhibition, it has been recently postulated that, additionally, NSAIDs-induced toxicity would involve a mitochondrial dysfunction, which would lead to decreased ATP levels and eventually to an increased gastro-intestinal permeability. An important event in the process of mitochondrial ATP synthesis is the transfer of electrons along the electron-transporting chain (ETC), which generates the necessary proton gradient that drives oxidative phosphorylation. Being complex I a major entrance point for the ETC, its inhibition would result not only in a diminished ATP synthesis, but also in a higher mitochondrial superoxide ( $O_2^{\cdot -}$ ) production. Under conditions in which the mitochondrial production of superoxide exceeds its antioxidant defense mechanisms, an increase in the mitochondrial and cellular oxidative tone would be expected; if the latter condition is not promptly controlled, it could eventually lead to a loss in cell viability.

Recent studies conducted in the laboratory where this thesis was developed suggest that the NSAID indomethacin may inhibit mitochondrial complex I, increasing mitochondrial superoxide formation. A major objective of this thesis was to investigate whether the NSAIDs, diclofenac, piroxicam, ibuprofen and aspirin, which feature chemical structures different from that of indomethacin, are also able to inhibit complex I, as well as to induce a cytotoxicity similar to that induced by indomethacin. The results obtained in the present investigation show that all assayed NSAIDs are effective in inhibiting mitochondrial complex I, both in mitochondria isolated from rat duodenum epithelium and in mitochondria isolated from Caco-2 cells pre-exposed to the mentioned

drugs. Additionally, NSAIDs increased mitochondrial superoxide production in both experimental models. In Caco-2 cells, NSAIDs also increased the oxidative tone and diminished cell viability. Mechanistically, NSAIDs-induced complex I inhibition was susceptible to competition and also reversible by coenzyme Q.

Quercetin is a flavonoid with proven superoxide scavenging activity. Based on reports that suggest a potential gastro-protective activity of quercetin, and show its ability to effectively accumulate within mitochondria, the ability of quercetin to protect against NSAIDs-induced complex I inhibition and its oxidative effects was evaluated. In both isolated mitochondria and Caco-2 cells, quercetin was able to protect against the inhibition of complex I and the increase in mitochondrial superoxide production induced by all five NSAIDs. Furthermore, in Caco-2 cells quercetin effectively prevented the increase in the oxidative tone and the loss of cell viability observed after the incubation of such cells with each of the NSAIDs.

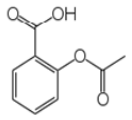
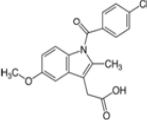
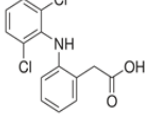
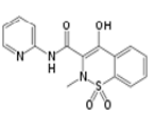
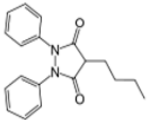
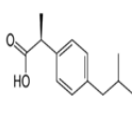
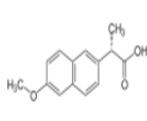
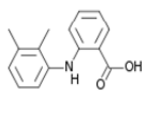
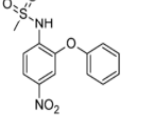
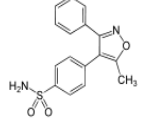
Finally, it was established that in addition to protecting against NSAIDs-induced complex I inhibition, quercetin acts, even at very low concentrations, as a “coenzyme Q mimetic”; indeed, quercetin was shown to allow a normal electron flow at the complex I level and between complexes I and III of the ETC.

Taken together, the exposed findings not only account for a putative mechanism for NSAIDs-induced mitochondrial and cellular toxicity, but also, based on the proposal that complex I inhibition plays an important role in NSAIDs-induced gastro-intestinal toxicity, the present research sets an experimental background on the potential mechanism that would underlie a gastro-protective action of quercetin. The latter arises from the evidenced ability of quercetin to prevent NSAIDs-induced complex I inhibition and its oxidative consequences, and from its ability to secure, by means of its “coenzyme Q mimetic” activity, the continuous operation of the mitochondrial electron-transporting chain.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Anti-Inflamatorios No Esteroidales y mecanismos asociados a su gastrotoxicidad.

Los Anti-Inflamatorios No Esteroidales (AINEs) son fármacos ampliamente utilizados a nivel mundial por sus actividades analgésicas, anti-inflamatorias y antipiréticas. Se estima que aproximadamente treinta millones de personas consumen AINEs diariamente (Maity et al. 2009). Aunque los AINEs pueden diferenciarse significativamente en cuanto a sus estructuras químicas (figura I), su mecanismo de acción involucra la inhibición de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2), pudiendo ser tal inhibición reversible o irreversible dependiendo del AINE en cuestión. La enzima COX-2 es responsable de la síntesis de varias prostaglandinas (como PGG<sub>2</sub> y PGH<sub>2</sub>) necesarias para la respuesta inflamatoria normal de los tejidos (Dey et al. 2006).

Clasificación de los AINEs				
Salicilatos	Derivados indol-acéticos	Derivados arilo-acéticos	Ácidos enólicos	
				
Aspirina	Indometacina	Diclofenaco	Piroxicam	Fenilbutazona
Derivados Arilpropiónicos		Fenematos	Otros	
				
Ibuprofeno	Naproxeno	Ác. mefenámico	Nimesulida	Valdecoxib

**Figura I**

Diversas familias de AINEs, clasificadas de acuerdo a su estructura química principal, con un ejemplo característico de cada una de ellas.

Si bien algunos de los AINEs actualmente disponibles son inhibidores específicos de esta enzima, la mayoría son también capaces de inhibir la isoforma COX-1, encargada de sintetizar prostaglandinas relacionadas con la producción de mucus en los epitelios gastrointestinales, la secreción de bicarbonato duodenal y de fluidos gástricos, la proliferación de células troncales de las criptas estomacales, y la producción de endoperóxidos cíclicos precursores del tromboxano A<sub>2</sub> (Vane et al. 1998a).

A pesar de sus beneficios terapéuticos, los AINEs también tienen muchos efectos secundarios, principalmente gastrointestinales (GI), como dolor abdominal, reflujo y úlceras gástricas; hepáticos (ocasionalmente hepatitis fulminante) y cardiovasculares (como arritmias y trombosis). Mientras la mayoría de los efectos secundarios relacionados con el tracto GI (TGI) han sido vinculados con la inhibición no selectiva de la COX-1 (Vane et al. 1998b), los cardiovasculares estarían relacionados principalmente con la inhibición específica de la COX-2 (Rao et al. 2008). Sin embargo recientemente ha surgido una nueva teoría para explicar los daños a nivel gastrointestinal que presentan la mayoría de estos compuestos. Se ha planteado que la gastrotoxicidad de los AINEs implicaría dos fases: Una fase inicial, consistente en una reacción bioquímica tóxica en las células del epitelio GI, que sería desencadenada por una baja en el ATP intracelular conducente a una pérdida del control del citoesqueleto sobre las uniones estrechas (*tight-junctions*) y a una mayor permeabilidad de la mucosa gástrica (Mahmud et al. 1996a). Además, las células afectadas experimentarían una salida concomitante del calcio desde la mitocondria, que daría lugar a un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), lo que potenciaría el aumento de permeabilidad de la mucosa. La segunda fase correspondería a una inflamación generalizada del tejido sub-epitelial del TGI, la cual sería causada por un aumento en la permeabilidad del epitelio GI que permitiría el paso de agentes agresivos y fuertemente inflamatorios desde el lumen hacia la mucosa. En esta segunda fase del daño, la inhibición de la COX-1 limitaría la

posibilidad de reparación del epitelio a través de una disminución en la proliferación celular y producción de mucus (Mahmud et al 1996a).

Aparentemente, la caída en los niveles de ATP (disfunción que sería originada por una disminuida síntesis mitocondrial) sería un evento clave gatillante del proceso de daño anteriormente referido, por lo que es de vital importancia entender ¿qué eventos podrían estar involucrados en la caída de ATP mitocondrial, y como dichos eventos pueden ser prevenidos?

Otra evidencia que apoya el postulado de que los AINEs inducirían una disfunción mitocondrial es la acidosis metabólica que se presenta en pacientes con sobredosis de salicilatos (Brown et al. 1987; Basavarajaiah et al. 2004), ibuprofeno (Smolinske et al. 1990; Wood et al. 2006), diclofenaco (Patel et al. 2001) o fenilbutazona (Vale et al. 1986). Los estudios referidos dan cuenta de que el desarrollo de esta condición involucraría la capacidad de dichos fármacos para desacoplar la fosforilación oxidativa e inhibir el ciclo de Krebs (procesos que ocurren dentro de la mitocondria), cambiando el metabolismo celular hacia la producción de ácido láctico y cuerpos cetónicos en un intento por obtener energía de otras fuentes distintas a la mitocondria. Esta producción de lactato y cetonas aumenta la acidez de la sangre, disminuyendo la concentración de bicarbonato circulante y derivando en la acidosis metabólica evidenciada a nivel sistémico.

El presente proyecto aborda entre otros, el mecanismo mediante el cual los AINEs causarían la disminución en los niveles de ATP y las consecuencias de esta caída en la homeostasis redox celular.

## **1.2 Mitocondria y producción de ATP.**

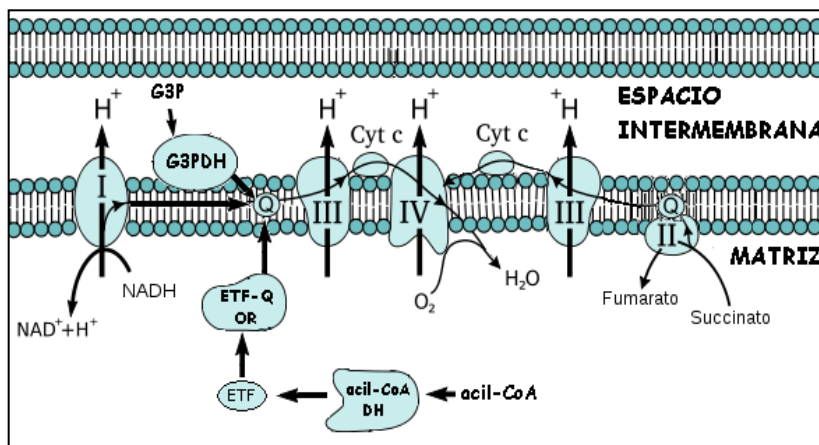
La mitocondria es un organelo subcelular recubierto por una doble membrana. En este organelo se sitúa la principal vía de síntesis de ATP (transporte de

electrones/fosforilación oxidativa), y por ende es la mayor fuente de energía de la célula (en cardiomiocitos aprox. 90% de la síntesis de ATP ocurre en la mitocondria) (Harris et al. 1991). La estructura mitocondrial comprende varios compartimientos, cada uno con sus características específicas: la membrana externa, el espacio intermembranas, la membrana interna, las crestas mitocondriales y la matriz interna mitocondrial.

Junto con servir de sitio de síntesis de ATP, en las mitocondrias se ubican el ciclo de Krebs (matriz) y la beta oxidación de los ácidos grasos (matriz). La producción de ATP es un proceso que consta de dos etapas bien definidas: la cadena transportadora de electrones (CTE) y la fosforilación oxidativa (Duchen 2004).

- Cadena de transporte de electrones: En la etapa de la CTE, el poder reductor almacenado en la molécula de NADH (generado en los procesos de glicólisis y ciclo de Krebs) y la de succinato (generado sólo a través del CK) es transformado en un gradiente de protones generado por la translocación de estos iones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranas (Schultz et al. 2001). Existen 4 complejos proteicos involucrados en el proceso de transporte de electrones mitocondrial: los complejos I, II, III y IV, cada uno de los cuales cataliza una oxido-reducción específica, conformando una cadena de transporte de poder reductor que finalmente lleva a la reducción tetravalente del oxígeno molecular hasta formar agua. El complejo I (Cx-I) cataliza la oxidación de NADH a  $\text{NAD}^+$ , con la concomitante reducción de coenzima Q (en su estado oxidado llamado también ubiquinona) a ubiquinol (forma reducida de coenzima Q) (Janssen et al. 2007). El Complejo II cataliza la oxidación de succinato a fumarato y la reducción de ubiquinona a ubiquinol. Para ello el Cx-II utiliza como grupo prostético una molécula de  $\text{FAD}^+$  en una reacción donde succinato reduce  $\text{FAD}^+$  a  $\text{FADH}_2$  (Miyadera et al. 2002). Dentro de la mitocondria existen, además, otras dos enzimas dependientes de  $\text{FADH}_2$  capaces de reducir ubiquinona y que aportan electrones a la CTE: la glicerol-3-fosfato

deshidrogenasa y la ETF-ubiquinona oxidorreductasa. La primera enzima oxida glicerol-3-fosfato y reduce ubiquinona a ubiquinol (Brand 2010) como parte de una de las lanzaderas mitocondriales de NADH. La segunda enzima forma parte de la beta-oxidación de ácidos grasos y reduce ubiquinona junto con oxidar a la flavoproteína transportadora de electrones (ETF; Watmough et al., 2010). El Complejo III es el punto de convergencia de las vías del NADH y de succinato, y cataliza la oxidación de ubiquinol nuevamente a ubiquinona en una reacción que posteriormente permite la reducción de citocromo c (Masuno-Yagi et al. 2001); Finalmente, el Complejo IV oxida al citocromo c y reduce una molécula de  $O_2$  para formar dos moléculas de agua (Figura II; Cooper et al. 2008). Cada uno de los complejos I y III transloca 4 protones desde la matriz hacia el espacio intermembranas, mientras que el complejo IV transloca solamente dos protones en el proceso de reducción de una molécula de  $O_2$ ; el complejo II no es capaz de realizar dicha translocación y simplemente opera como un transportador de electrones (Schultz et al. 2001). La producción de una molécula de ATP está asociada a la retro-translocación de aproximadamente 4 protones desde el espacio intermembranas a la matriz, por lo que la oxidación de una molécula de NADH produce tres moléculas de ATP, mientras que la oxidación de una molécula de succinato produce solamente dos moléculas de ATP (Duchen 2004).



**Figura II.** Representación esquemática de la cadena transportadora de electrones, se incluyen las reductasas de ubiquinona dependientes de  $FADH_2$ .

- Fosforilación oxidativa: La fosforilación oxidativa representa el proceso mediante el cual la energía asociada al gradiente de protones entre la matriz mitocondrial y el espacio intermembranas es utilizada para la producción de moléculas de ATP. Esta reacción es catalizada por el llamado Complejo V o ATP sintasa. Dicho complejo cataliza la síntesis de una molécula de ATP a partir de una de ADP y un fosfato inorgánico (Pedersen et al. 1993). La reacción es reversible y su sentido depende básicamente de la fuerza protón motriz que exista en la mitocondria. En ausencia de esta fuerza el complejo actúa hidrolizando ATP hacia ADP y liberando fosfato inorgánico, mientras que en presencia de la gradiente de protones actúa sintetizando ATP (Hong et al. 2008). De esta manera la energía obtenida desde el NADH y el succinato en la cadena transportadora de electrones es finalmente transformada en un metabolito activo capaz de favorecer muchas reacciones necesarias para la célula, reacciones que sin ATP no ocurrirían debido a su alta energía de activación.

### **1.3 Disminución de la síntesis mitocondrial de ATP**

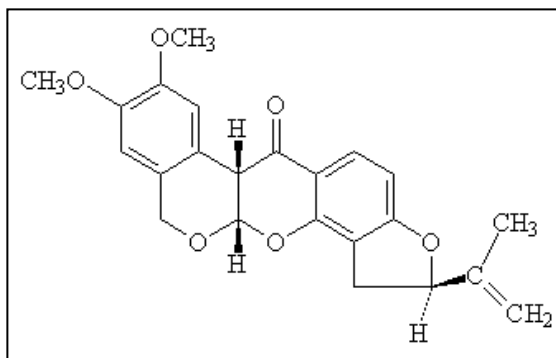
Dentro de la célula, la disminución en los niveles de ATP se puede dar por diversas razones: un aumento en su hidrólisis, un exacerbado consumo o una baja en su síntesis. Son muchos los factores que pueden afectar cada uno de estos tres procesos, sin embargo en el mecanismo de toxicidad de los AINEs, la postulada disminución de la síntesis de ATP a nivel mitocondrial parecería ser el evento que determina los bajos niveles de este metabolito en las células afectadas (Somasundaran et al. 1997; Masubuchi et al. 2002; Watanabe et al. 2011). Dicha disminución reflejaría un efecto de los AINEs ya sea en: (1) la cadena transportadora de electrones o, (2) la fosforilación oxidativa.

(1) De ser el primer caso el que efectivamente explica una disminución en la síntesis de ATP en la mitocondria son muchos los puntos en que los AINEs podrían ejercer su



acción inhibitoria sobre la CTE. Dado que esta cadena comprende una serie de óxido-reducciones sucesivas para la generación de la gradiente de protones necesaria, cualquier punto de ella (sea un complejo o sustrato vinculado) que este afectado, inhibido o bloqueado, afectará el proceso; ello ocurrirá, sin embargo, en una medida propia de la participación que tenga el componente afectado en todo el proceso de transporte de electrones.

Un ejemplo, de este tipo de situación es la que resultaría si la inhibición de la CTE implicara al Cx-I: Como punto de entrada del NADH en el transporte de electrones, este complejo juega un papel primordial para todo el proceso, dado que el NADH es la principal fuente reductora en la síntesis de ATP mitocondrial. De ahí que el estudio de su inhibición sea tan importante. Existen tres puntos principales en los que este complejo podría ser inhibido: el sitio de interacción de NADH con el complejo, los centros Fe-S del complejo que transportan los electrones, y el sitio de unión a coenzima Q (Zickermann et al. 2009). Se conocen numerosos inhibidores de este complejo, siendo la rotenona (presente en las raíces de diversas leguminosas; figura III) la molécula más estudiada debido a su uso como insecticida en la agricultura (Lambert et al. 2004a).



**Figura III**  
Estructura de la rotenona,  
inhibidor del complejo I  
mitocondrial

La rotenona impide el acoplamiento entre el Cx-I y la Coenzima Q, mientras que las acetogeninas (obtenidas de plantas tropicales) (Degli Esposti et al. 1994) impiden la unión del NADH con el complejo y agentes químicos como el MPP<sup>+</sup> (producto de la manufactura ilegal de metil-fenil-propionoxypiperidina, droga analgésica opioide) (Richardson et al. 2005), impiden el flujo de electrones a través de los clústeres de Fe-S. La inhibición de este complejo, aunque no detiene por completo la cadena de transporte de electrones (sigue ocurriendo mediante la oxidación de succinato por el complejo II), si disminuye de forma importante los niveles de ATP sintetizados en la mitocondria.

Otros ejemplos de inhibición a nivel de la CTE son los que implican una inhibición directa sobre el (A) complejo II, (B) complejo III o (C) complejo IV de dicha cadena:

(A) Inhibición del Complejo II: A pesar de ser el punto de entrada del succinato a la cadena transportadora de electrones, la importancia de este complejo sobre la totalidad de la síntesis de ATP puede considerarse la menor de los 4 complejos. Esto dado que la mayor parte de la producción de ATP proviene de la energía obtenida por la oxidación del NADH. Sin embargo es un posible punto de acción de los AINEs, sea por una inhibición del paso de succinato a fumarato, una traba en el proceso de óxido-reducción de su grupo prostético FADH<sub>2</sub> o un impedimento en el acoplamiento con la ubiquinona. Algunos de los inhibidores conocidos de esta enzima son: la carboxina (pesticida), el TTFA (4,4,4-trifluoro-1-(2-tienil)-1,3-butanodiona; agente quelante) y las atpeninas (antifúngicos), los cuales impiden la unión de la ubiquinona al complejo (Miyadera et al. 2003).

(B) Inhibición del Complejo III: A diferencia de los dos complejos anteriores, la inhibición del complejo III sí detiene por completo el transporte de electrones, pues este ya es parte de la vía común que siguen el NADH y el succinato para generar ATP. Debido precisamente a esto último es que su inhibición genera grandes problemas a nivel celular. Su mecanismo de acción implica dos ciclos de oxidación de ubiquinol para

producir dos citocromos c reducidos. Son estos dos puntos, el de interacción con ubiquinol y el de entrada del citocromo c, los sitios estratégicos de acción de los inhibidores de este complejo. Entre los inhibidores más conocidos se encuentran la Antimicina A (antibiótico), la toxina diftérica (producida por la bacteria *Corynebacterium diphtheriae*) y el dimercaprol (agente quelante de cationes divalentes) (Matsuno-Yagi et al. 2001).

(C) Inhibición del Complejo IV: Como punto final de la cadena de transporte, la inhibición de este complejo, al igual que la del Complejo III, detiene por completo el proceso. Sus inhibidores pueden actuar en el sitio de interacción con el citocromo c, o en el punto de entrada del O<sub>2</sub> al complejo. Por ser el lugar donde el oxígeno es reducido a agua, es también uno de los puntos de mayor generación de ROS (por la reducción incompleta de O<sub>2</sub>). Por lo tanto la inhibición del complejo IV inexorablemente llevará a un aumento de en la producción de dichas especies. Algunos de sus inhibidores hasta ahora descritos son el monóxido de carbono, el cianuro, el ácido sulfhídrico y la azida sódica (Cooper et al. 2008).

Por otra parte, si la disminución en la síntesis de ATP mitocondrial causada por los AINEs fuese producto de una inhibición de la fosforilación oxidativa, existen dos niveles en los que estos fármacos podrían ejercer su acción: (A) disipando el gradiente de protones, o (B) impidiendo la acción de la ATP sintasa propiamente tal.

(A) Disipación del gradiente de protones: El gradiente de protones es indispensable para la generación de ATP mitocondrial y su mantenimiento solo puede ocurrir si la membrana interna es impermeable al paso libre de iones H<sup>+</sup>. Moléculas lipofílicas, que sean capaces de protonarse en el espacio intermembranas, de atravesar la membrana interna y desprotonarse en la matriz mitocondrial pueden disipar esta gradiente, impidiendo la síntesis de ATP. Estos agentes se conocen como desacopladores de la fosforilación oxidativa y son de variada naturaleza. Algunos de los más conocidos son:

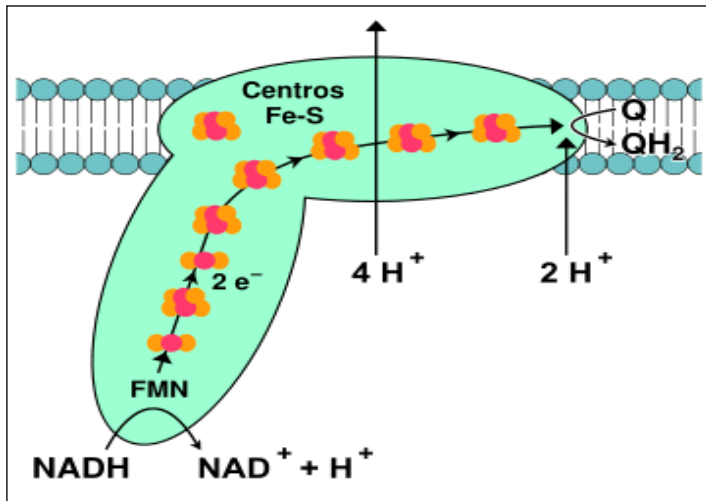
proteínas desacoplantes (Proteínas que transportan protones desde el espacio intermembranas hacia la matriz mitocondrial; las llamados UCP's) (Brand et al. 2005), y los venenos sintéticos 2,4-dinitrofenol (DNP) y el carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP) (Linsinger et al. 1999).

(B) Inhibición de la ATP sintasa: La ATP sintasa o Complejo V es la enzima responsable de la síntesis de ATP en la mitocondria. Su inhibición impide esta síntesis y por lo tanto disminuye ostensiblemente los niveles de ATP en la mitocondria (y eventualmente a nivel celular). Algunos de sus inhibidores son: oligomicina (antibiótico secretado por bacterias del género *Streptomyces*) y el reactivo liposoluble dicitclohexilcarbodiimida (DCCD) (Gledhill et al. 2006).

Tal como se describe en la sección resultados de esta tesis, las investigaciones realizadas permitieron establecer que el complejo I es un importante blanco de acción de los AINEs. Sin perjuicio de la posibilidad de que otros complejos pudiesen ser también afectados por los AINEs (aspecto que se aborda en la sección Discusión de la presente tesis), los estudios ejecutados se focalizaron en el establecimiento y caracterización mecanística de una acción inhibitoria de los AINEs sobre el complejo I. En atención a lo anterior, esta sección de Introducción se centra en recoger antecedentes de literatura en torno al complejo I.

## 1.4 Complejo I mitocondrial y su función

El Complejo I mitocondrial, también conocido como NADH-Ubiquinona oxidoreductasa o NADH deshidrogenasa, es un gran complejo multienzimático formado por más de 40 subunidades, de las cuales por lo menos 7 son codificadas por el ADN mitocondrial. El Cx-I se ubica en la membrana interna de la mitocondria (al igual que los demás complejos de la síntesis de ATP) y posee dos grandes dominios, uno periférico hidrofílico y otro con alrededor de 60 hélices transmembrana (Zickermann et al. 2009). Su función es catalizar la transferencia de dos electrones desde el NADH hacia la Coenzima Q, utilizando para ello flavina mononucleotido (FMN) como grupo prostético, y valiéndose además de sus ocho clústeres hierro-azufre (Fe-S) para transportar dichos electrones (Figura IV).



**Figura IV**

Representación esquemática del Complejo I mitocondrial, se observan los 8 clústeres Fe-S y la FMN, además de los sitios de unión a NADH y coenzima Q. Se muestran también los 4 protones translocados como parte del proceso de transporte de electrones.

La acción catalítica del complejo I comienza con la cesión de los dos electrones del NADH hacia la FMN, liberándose  $\text{NAD}^+$ ; este proceso ocurre en el dominio periférico del complejo, ubicado en la matriz mitocondrial; estos electrones son luego transportados uno por uno a través de los clústeres Fe-S, para finalmente ser aceptados por la ubiquinona, la cual se reduce primero a semiubiquinol al recibir el primer electrón

y finalmente a ubiquinol al recibir el segundo electrón (Crane 2001). Todos los clústeres Fe-S, así como el sitio de unión a ubiquinona, se encuentran en el dominio transmembrana. El ubiquinol es liberado luego del Cx-I y viaja a través de la membrana hasta llegar al Complejo III, donde es oxidado nuevamente a ubiquinona para continuar con la cadena de transporte de los electrones. La reducción de una molécula de ubiquinona produce la translocación hacia el espacio intermembranas de 4 protones (Duchen 2004).

Como ya fue mencionado anteriormente, el Cx-I es muy importante en el proceso de síntesis mitocondrial de ATP, puesto que en la cadena de transporte de electrones, la mayor parte del poder reductor proviene de la oxidación de NADH. El Cx-I es además un sitio importante de producción de anión superóxido, proceso que bajo condiciones normales afecta solo al 1-2% del oxígeno molecular utilizado por la mitocondria (Cadenas et al. 1977). Fisiológicamente, dicho superóxido sería generado como resultado de una “fuga de electrones” preferentemente desde la FMN presente en el dominio de matriz mitocondrial del complejo I (revisado por Treberg et al. 2011). Lo anterior se debería a su relativa accesibilidad al medio externo, dada su posición en el sitio de unión del complejo I a NADH. Como se mencionó anteriormente, dicho sitio de unión se ubica en el dominio de matriz del complejo, lo que le permite a la FMN ubicarse en una posición de fácil acceso a sustratos biológicos, como el NADH o el oxígeno molecular (Zhang et al. 2008). Al aceptar los electrones del NADH, la FMN se reduce completamente, cediendo luego un electrón al primer clúster Fe-S dentro del Cx-I. Al ceder dicho electrón, la FMN queda en un estado de radical flavo-semiquinona, el cual fácilmente puede reducir una molécula de oxígeno a radical superóxido. Sin embargo ante eventos de inhibición del flujo de electrones hacia los siguientes complejos de la cadena transportadora de electrones, el cociente  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  aumenta, incrementando también la producción de superóxido a nivel de la FMN en el Cx-I (Verkhovskaya et al. 2008). En procesos de sobreproducción de radical superóxido,

también tendrían un papel importante los centros Fe-S del Cx-I y el semiubiquinol (Lambert et al 2004b) producido durante la oxidación del NADH. En todos los casos mencionados un electrón es liberado hacia una molécula de O<sub>2</sub> dando lugar a la formación de anión superóxido. Si bien la mencionada “fuga de electrones” a nivel del Cx-I y la consiguiente formación de superóxido es un proceso fisiológico, dicho proceso pueden ser exacerbados bajo condiciones no solo de mayor disponibilidad de NADH/NAD<sup>+</sup> sino también en un ambiente mitocondrial rico en oxígeno (Fato et al. 2009). Una inhibición del Cx-I ocasionará no solo un aumento en la producción de superóxido sino también, una caída en los niveles de producción de ATP mitocondrial (Andreyev et al. 2005), como resultado de la menor contribución de dicho complejo al gradiente de protones. En efecto, agentes como rotenona y MPP<sup>+</sup>, ya referidos como inhibidores del Cx-I, llevan a una aumentada producción de superóxido y a una caída de ATP (Lambert et al. 2004a; Richardson et al. 2005).

Debido a estos dos procesos, la importancia del Cx-I en la síntesis de ATP y en la producción de superóxido, ambos conducentes a un estrés oxidativo celular, la inhibición del Cx-I puede ser toxicológicamente muy significativa para la célula. Si la inhibición es sostenida a través del tiempo y/o intensa en cuanto al grado de inhibición, se podrían desencadenar procesos conducentes a la muerte celular, como apoptosis o necrosis (Chen et al. 2007).

## **1.5 Producción de ROS mitocondrial**

Las especies reactivas derivadas del oxígeno, entre las cuales se incluyen los radicales libres correspondientes, son especies derivadas de la reducción incompleta del oxígeno. Las principales ROS involucradas en procesos de daño celular son el radical hidroxilo (HO·), el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y su forma protonada (hidroperoxi, HOO·), y el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Mientras las tres primeras especies tienen en común un átomo de oxígeno en el cual se centra el radical libre, la última no constituye un radical

libre sino tan sólo un pro-radical (esto implica que puede dar origen al radical hidroxilo al reaccionar con metales redox activos, como  $\text{Cu}^+$  o  $\text{Fe}^{+2}$  (reacción de Fenton; Jomova et al. 2011); no obstante, el peróxido de hidrógeno es un oxidante como tal. En cuanto a su reactividad relativa, los radicales  $\text{HO}\cdot$  son los de mayor reactividad, sucedidos por los  $\text{HOO}\cdot$ . La reactividad de los ROS les permite reaccionar con diversas moléculas, modificando la estructura y ocasionalmente la función de éstas. Entre los blancos principales de estas especies se encuentran los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos (Murphy 2009).

Dentro de la célula existen diversas fuentes de ROS, pero ninguna tan significativa y potencialmente dañina como la mitocondria, particularmente la cadena transportadora de electrones (Matsuzaki et al. 2009). Como fue mencionado anteriormente, un impedimento en el flujo normal de electrones desde el NADH o el succinato hacia el oxígeno, ocasionará un aumento en la producción de superóxido a nivel mitocondrial. Si bien el radical superóxido es poco permeable a las membranas biológicas, éste puede salir de la mitocondria mediante su dismutación a peróxido de hidrógeno por la acción de la superóxido dismutasa mitocondrial (SODm). El peróxido de hidrógeno atraviesa fácilmente la membrana mitocondrial, y en el citoplasma podría, en presencia de  $\text{Cu}^+$  o  $\text{Fe}^{+2}$ , formar radical hidroxilo (Poyton et al. 2009).

La célula posee sin embargo mecanismos de defensa contra los ROS. Algunos son enzimáticos como la superóxido dismutasa (SOD), encargada de transformar (dismutar) superóxido en peróxido de hidrogeno, o la catalasa, responsable de la transformación del peróxido en agua (Chaudière et al. 1999); y otros no enzimáticos, como el glutatión (y otros tioles), el ascorbato, el alfa-tocoferol y la metalotioneina, entre otros; estos antioxidantes reaccionan con los ROS, anulando su reactividad y potencial dañino (Sies 1997).



La mitocondria, particularmente, posee dos SOD distintas: una manganeso superóxido dismutasa (MnSOD), ubicada en la matriz mitocondrial, y una cobre zinc superóxido dismutasa (CuZnSOD), localizada en el espacio intermembranas (Poyton et al. 2009). Dentro de la matriz se encuentra también la enzima glutatión peroxidasa (GPX), que cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno y lipoperóxidos a agua y alcoholes, respectivamente, utilizando glutatión reducido (GSH) como cofactor, el cual se convierte en glutatión oxidado (GSSG). Estos mecanismos de defensa antioxidante son capaces de proteger a la mitocondria contra el efecto de los radicales superóxido (y del peróxido de hidrógeno que resulta de su dismutación) generados en la CTE (He et al. 2008). Sin embargo, una exacerbada producción de estas especies reactivas, como la resultante de una inhibición del Cx-I, podría sobrepasar la capacidad de dichas enzimas para depurar la mitocondria de ROS, lo que llevará a una mayor salida de tales especies desde la mitocondria hacia el citoplasma y por ende un daño oxidativo a nivel celular (Jones et al 2010). Desde un punto de vista técnico-metodológico, es posible distinguir entre una aumentada producción de ROS a nivel mitocondrial y aquella que ocurre a nivel celular, incluida la mitocondria. El primer caso se puede evidenciar a través del uso de MitoSox<sup>®</sup>, un ensayo donde una sonda específica para superóxido se concentra casi exclusivamente en la mitocondria dando lugar a una aumentada fluorescencia al reaccionar con radicales superóxido (Mukhopadhyay et al. 2007). MitoSox<sup>®</sup> permite evaluar tal producción en mitocondria de células en cultivo. En el segundo caso, el uso de sondas como DCDHF, dicloro-dihidrofluoresceína, permite cuantificar, también en células en cultivo, el tenor oxidativo que, como resultado de un aumentado nivel de ROS, tiene lugar en el interior de la célula (no solo en mitocondria) (Royall et al. 1993).

Otra consecuencia de una exacerbada producción de ROS como superóxido en la mitocondria es la formación de un complejo proteico denominado poro de transición mitocondrial (MPTP) (Petrosillo et al. 2003). La formación de MPTP está gobernada por la oxidación parcial del intercambiador de nucleótidos de adenina (ANT) y su posterior

asociación con otras proteínas mitocondriales como la ciclofilina D (CypD) o el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) (Halestrap 2005). Una vez formado este poro constituye un canal no específico, por el cual elementos de la matriz mitocondrial, como el citocromo c o la proteína SMAC pueden salir al citosol. La liberación al citosol de estas dos proteínas mitocondriales, activa los procesos apoptóticos celulares, mediante la activación directa de caspasas en el caso del citocromo o a través de una inhibición de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) en el caso de SMAC (Kowaltowski et al. 2001).

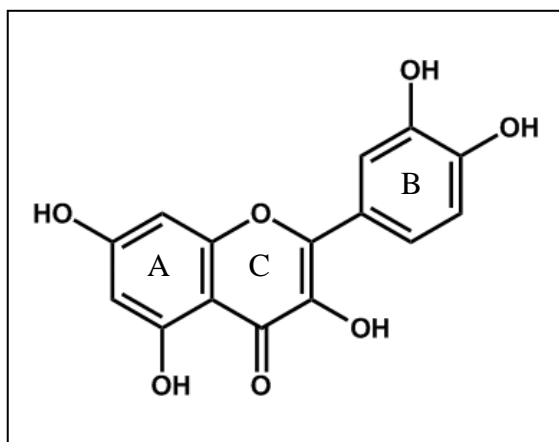
Una exacerbada producción de superóxido, generada al inhibir el Cx-I mitocondrial, podría, además de llevar a un mayor tono oxidativo citosólico, iniciar procesos apoptóticos. En efecto, existe evidencia sobre la capacidad de AINEs como ácido acetilsalicílico (Zimmermann et al. 2000) y sulindac (Kohli et al. 2004) para inducir apoptosis en células expuestas a estos agentes.

## **1.6 Quercetina: un antioxidante natural**

Estudios dirigidos a proteger células del TGI contra el daño inducido por AINEs, y realizados tempranamente en el laboratorio en el cual se ejecutó la presente investigación, indican que extractos ricos en flavonoides, y en particular aquellos que concentran quercetina, son efectivos en prevenir el daño oxidativo que sucede a la disfunción mitocondrial inducida por indometacina, un paradigma de AINEs por su reconocida gastrotoxicidad (Sivalingam et al. 2008; Chattopadhyay et al. 2006). Atendiendo a tales resultados, en la presente investigación se examinó no solo la capacidad que tendrían diversos AINEs para inhibir el Cx-I sino también, la capacidad que tendría quercetina (como compuesto puro) para eventualmente proteger contra tal putativo efecto de los AINEs. Por ende, en esta sección se hace una breve descripción acerca los flavonoides y particularmente de quercetina.

Los flavonoides son compuestos heterocíclicos complejos, ampliamente distribuidos en el reino vegetal y con documentados efectos como atrapadores de radicales libres (Lee et al. 2010). Su estructura básica consiste en dos anillos bencénicos (A y B), unidos mediante un anillo heterocíclico (C) con un doble enlace (pirano o pirona). La acción atrapadora de radicales libres de los flavonoides depende de su estructura y de los sustituyentes de los anillos B y C, en particular la presencia de un o-di-OH en el anillo B, un doble enlace 2,3 conjugado con el carbonilo en posición 4 y la presencia adicional de grupos OH en las posiciones 3 o 5 del anillo C (Dorta et al. 2008).

La quercetina es un flavonoide que presenta todas las características estructurales necesarias para ser considerada como un agente atrapador de radicales libres efectivo (figura V) y su capacidad protectora frente al daño inducido por ROS en membranas biológicas y en mitocondria ha sido ampliamente documentada (Mahkunakorn et al. 2004).



**Figura V**

Estructura de la quercetina, flavonoide atrapador de radicales libres. Se muestran las características estructurales antes mencionadas para poseer dicha acción atrapadora de radicales.

Interesantemente, la quercetina se concentra en las mitocondrias (Biasutto et al. 2010; Fiorani et al. 2010), lo que permitiría que aun exponiendo la célula a bajas concentraciones de este flavonoide, puedan alcanzarse concentraciones suficientemente efectivas como para proteger, a través de su capacidad para neutralizar o atrapar ROS, contra las consecuencias de una mayor generación de superóxido en dicho organelo.

## **2 HIPÓTESIS**

---

Los AINEs inhiben el complejo I y aumentan la producción de  $O_2^-$ , tanto en mitocondrias aisladas de células epiteliales de duodeno de rata como en mitocondrias obtenidas de células Caco-2 pre-expuestas a tales agentes. Además, los AINEs producen un aumento en el tenor oxidativo, conducente a la muerte de células Caco-2. Los efectos de los AINEs sobre el complejo I y sus consecuencias redox son prevenidos por quercetina.

### **3 OBJETIVOS**

---

#### **3.1 Objetivo General**

Contribuir a un mejor entendimiento de los posibles mecanismos a través de los cuales los AINES producen daño celular en el TGI y evaluar el potencial que podría tener quercetina como un eventual gastroprotector.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- I. Evaluar la capacidad que tendrían distintos AINES (indometacina, diclofenaco, piroxicam, ibuprofeno y aspirina) para inhibir el complejo I en mitocondrias aisladas de células epiteliales de duodeno de rata y en mitocondrias obtenidas a partir de células Caco-2 expuestas a dichos agentes.
- II. Investigar si la exposición de mitocondrias aisladas de células epiteliales de duodeno de rata a los distintos AINES se traduce en un aumento de la producción de  $O_2^-$  al interior de estos organelos. Además estudiar si la exposición de células Caco-2 a AINES se traduce en un incremento de la producción de superóxido a nivel mitocondrial, en una elevación del tenor oxidativo a nivel celular, y una merma de la viabilidad celular.
- III. Estudiar el posible mecanismo que subyacería a una acción inhibitoria de los AINES sobre el complejo I.
- IV. Evaluar si quercetina es capaz de proteger frente a la postulada inhibición del complejo I y al postulado aumento en la producción mitocondrial de superóxido y en el tenor oxidativo celular inducidos por AINES.
- V. Estudiar el posible mecanismo que subyacería a un potencial efecto protector de quercetina frente a la postulada inhibición del complejo I inducida por AINES.

## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 4.1 Reactivos

Indometacina, diclofenaco, piroxicam, ibuprofeno, aspirina, quercetina, citocromo c, coenzima Q1, NADH, rotenona, cocktail de inhibidores de proteasas, 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato y antimicina A fueron obtenidos de Sigma. Dehidroetidium y Mitosox® fueron obtenidos de Calbiochem y Molecular Probes, respectivamente. El kit CytoTox-ONE® Homogeneous Membrane Integrity Assay fue obtenido de Promega (Madison, WIS, E.E.U.U.). Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

### 4.2 Métodos generales

#### 4.2.1 Aislamiento de mitocondrias de epitelio duodenal de rata.

Las mitocondrias de epitelio duodenal de rata fueron aisladas mediante centrifugación diferencial. Muestras congeladas de epitelio fueron sonicadas durante 30 minutos y posteriormente centrifugadas (10 minutos, 14.000 g a 4 °C). El *pellet* obtenido fue re-suspendido en buffer HEPES 10 mM pH 7.4 (250 mM sacarosa, 1 mM EDTA y 1 mg/ml BSA) y homogenizado usando un homogeneizador de teflón. El homogenizado obtenido fue centrifugado nuevamente (10 minutos, 2.000 g a 4 °C), el sobrenadante separado y el *pellet* re-homogenizado como se mencionó anteriormente. Finalmente los dos sobrenadantes se juntaron y se centrifugaron (10 minutos, 14.000g a 4 °C). El *pellet* resultante fue re-suspendido en buffer HEPES 10 mM pH 7.4 (250 mM sacarosa y 1 mM EDTA) y mantenido a 4 °C para posteriores ensayos.

#### 4.2.2 Células y condiciones de cultivo.

La línea celular de adenocarcinoma colónico humano, Caco-2 (ATCC HTB-37) se usó con aproximadamente 90% de confluencia; las células fueron crecidas en medio

DMEM-F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino a 37°C en una atmósfera 5% CO<sub>2</sub>/95% aire.

#### **4.2.3 Aislamiento de mitocondrias desde células Caco-2.**

Las mitocondrias fueron aisladas desde células Caco-2 según lo descrito por O'Donnell et al. (1995). Las células fueron recuperadas, lavadas en PBS y centrifugadas (10 minutos, 500g a 4 °C). El *pellet* se re-suspendió en buffer HEPES 10 mM pH 7.4 (250 mM sacaros, 1 mM EDTA y 1 mg/ml BSA) y homogenizadas con un homogeneizador de teflón. El homogenizado fue centrifugado (10 minutos, 2.000 g a 4 °C), el sobrenadante separado y el *pellet* re-extraído como se mencionó anteriormente. Finalmente, ambos sobrenadantes fueron combinados y centrifugados (10 minutos, 14.000 g a 4 °C). El *pellet* se re-suspendió en buffer HEPES 10 mM pH 7.4 (250 mM sacarosa y 1 mM EDTA) y se almacenó a 4 °C para posteriores análisis.

#### **4.2.4 Cuantificación de proteínas.**

Para cuantificar las proteínas de una muestra, ya sea de mitocondrias aisladas o de lisado celular, se utilizó la reacción de Bradford (Bradford 1976). 10 µl de muestra se adicionaron a 200 µl de reactivo de Bradford y se incubaron durante 20 minutos. Posteriormente se midió la absorbancia de cada mezcla a 595 nm. La concentración de proteínas se interpoló en una curva estándar de absorbancia v/s concentración de proteínas. Cada cuantificación se realizó por duplicado.

### **4.3 Métodos relacionados con el objetivo específico 1**

Evaluar la capacidad que tendrían distintos AINES (indometacina, diclofenaco, piroxicam, ibuprofeno y aspirina) para inhibir el complejo I en mitocondrias aisladas de células epiteliales de duodeno de rata y en mitocondrias obtenidas a partir de células Caco-2 expuestas a dichos agentes.

#### **4.3.1 Ensayos de actividad de complejo I.**

La actividad del complejo I fue determinada en mitocondrias aisladas, mediante el cambio en la absorbancia a 340 nm producto de la oxidación del NADH ( $\epsilon$  6,81 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>), según lo descrito por Birch-Machin et al. (1994). La actividad del complejo I se midió en ausencia y presencia de rotenona (inhibidor del complejo I, 20  $\mu$ M) (Murphy 2009).

La reacción del complejo I se realizó en buffer fosfato 25 mM pH 7.2 que contenía un "cocktail" de inhibidores de proteasas, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM KCN, 2.5 mg/ml BSA (fracción V), 2  $\mu$ g/ml antimicina A y 65  $\mu$ M coenzima Q. La suspensión mitocondrial fue añadida al medio de reacción e incubada durante 10 minutos a 34 °C en ausencia o presencia de rotenona 20  $\mu$ M. La reacción se inició mediante la adición de NADH 130  $\mu$ M y la tasa de oxidación de NADH fue monitoreada durante 5 minutos. La actividad del complejo I se definió como la actividad NADH oxidasa sensible a rotenona.

#### **4.3.2 Efecto de AINES sobre la actividad del complejo I en mitocondrias aisladas.**

Para determinar el efecto de los diferentes AINES sobre el complejo I, concentraciones de 50  $\mu$ M de cada AINE fueron adicionadas al medio de reacción previo a la adición de la suspensión mitocondrial. La actividad del complejo I fue luego cuantificada según lo mencionado anteriormente. En los ensayos de concentración dependencia de la inhibición del complejo I, concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100  $\mu$ M de cada AINE se adicionaron al medio de incubación de la suspensión mitocondrial. La actividad del



complejo I se midió luego de 10 minutos de incubación de las mitocondrias, según lo referido.

#### **4.3.3 Actividad del complejo I en células Caco-2 incubadas con AINEs.**

En los experimentos de determinación del efecto inhibitorio de AINEs sobre el complejo I de células Caco-2, dichas células fueron incubadas durante 10 minutos con 250  $\mu\text{M}$  de cada uno de los AINEs en estudio. Una vez lavadas las células del medio con AINE, las mitocondrias fueron aisladas y la actividad del complejo I cuantificada según lo descrito.

#### **4.4 Métodos relacionados con el objetivo específico 2**

Investigar si la exposición de mitocondrias aisladas de células epiteliales de duodeno de rata a los distintos AINEs se traduce en un aumento de la producción de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  al interior de estos organelos. Además estudiar si la exposición de células Caco-2 a AINEs se traduce en un incremento de la producción de superóxido a nivel mitocondrial, en una elevación del tenor oxidativo a nivel celular, y una merma de la viabilidad celular.

##### **4.4.1 Ensayo de producción de superóxido en mitocondrias aisladas de epitelio duodenal de rata expuestas a AINEs.**

La producción de superóxido mitocondrial se determinó mediante la oxidación de la sonda fluorescente DHE, según lo reportado por Benov et al. (1998). Mitocondrias aisladas fueron incubadas durante 30 minutos con la sonda DHE (10  $\mu\text{M}$ ). Luego de centrifugarlas para eliminar el exceso de sonda no incorporado, las mitocondrias fueron incubadas durante 20 minutos con cada uno de los AINEs en estudio (50  $\mu\text{M}$ ). Finalmente las mitocondrias fueron lisadas usando tritón X-100 (0.03% en PBS) y la fluorescencia cuantificada ( $470_{\text{Ex}}/590_{\text{Em}}$ ).

#### **4.4.2 Ensayo de cuantificación de superóxido mitocondrial en células Caco-2 expuestas a AINEs.**

La producción de superóxido mitocondrial se determinó mediante la oxidación de la sonda fluorescente MitoSox<sup>®</sup>. Células Caco-2 fueron incubadas durante 30 minutos con la sonda MitoSox<sup>®</sup> (5  $\mu$ M). Una vez lavadas las células fueron incubadas con 250  $\mu$ M de cada uno de los AINEs en estudio, durante 20 minutos. Posteriormente, las células fueron lavadas nuevamente. Finalmente las células fueron lisadas usando tritón X-100 (0.03% en PBS) y la fluorescencia cuantificada (510<sub>Ex</sub>/580<sub>Em</sub>).

#### **4.4.3 Ensayo de cuantificación del tenor oxidativo en células Caco-2.**

La cuantificación del tenor oxidativo celular se realizó mediante la oxidación de la sonda fluorescente DCDHF, según lo referido por Royall et al. (1993). Células Caco-2 fueron incubadas durante 30 minutos con DCDHF-DA (50  $\mu$ M). Una vez lavadas, las células fueron incubadas durante 20 o 60 minutos con cada uno de los AINEs estudiados (250  $\mu$ M). Luego de lavarlas nuevamente, las células fueron lisadas usando tritón X-100 (0.03% en PBS) y su fluorescencia cuantificada (495<sub>Ex</sub>/520<sub>Em</sub>).

#### **4.4.4 Ensayo de liberación de LDH.**

La liberación de LDH desde células Caco-2 incubadas con AINEs se realizó mediante el kit “CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay” (Promega). Células Caco-2 fueron incubadas durante 20 o 60 minutos con 250  $\mu$ M de cada uno de los AINEs en estudio. El sobrenadante de cada uno de los cultivos fue retirado y tratado siguiendo las instrucciones del kit. La medición de la actividad de LDH en el medio extracelular se basa en la conversión de resazurin a resosurfin, mediante un mecanismo que involucra la acción enzimática de la LDH. La aparición del producto se cuantifica mediante fluorescencia (560<sub>Em</sub>/590<sub>Ex</sub>). El porcentaje de liberación de LDH se obtiene comparando la liberación de LDH observada en cada caso con la liberación observada al incubar células Caco-2 con tritón X-100 (0.03% en PBS) durante 10 minutos.

## **4.5 Métodos relacionados con el objetivo específico 3**

Estudiar el posible mecanismo que subyacería a una acción inhibitoria de los AINEs sobre el complejo I.

### **4.5.1 Efecto de coenzima Q y NADH sobre la inhibición del complejo I inducida por AINEs.**

Para evaluar el efecto de los sustratos (coenzima Q y NADH) en la inhibición del complejo I inducida por AINEs, concentraciones crecientes de cada uno de los mencionados sustratos se añadieron al medio de reacción. En el caso de coenzima Q, concentraciones de 32.5, 65, 130, 260 y 520  $\mu\text{M}$  se añadieron en ausencia o presencia de cada uno de los AINEs (50  $\mu\text{M}$ ), ya sea antes de la adición de la suspensión mitocondrial (co-incubación) o junto con el NADH en el momento de inicio de la reacción (post-incubación). En los experimentos con concentraciones variables de NADH, concentraciones de 65, 130, 260 y 520  $\mu\text{M}$  de dicho sustrato se agregaron a la suspensión mitocondrial, en ausencia o presencia de cada uno de los AINEs (50  $\mu\text{M}$ ), en el momento de inicio de la reacción (post-incubación). Todos los demás reactivos se añadieron según lo reportado anteriormente.

## **4.6 Métodos relacionados con el objetivo específico 4**

Evaluar si quercetina es capaz de proteger frente a la postulada inhibición del complejo I y al postulado aumento en la producción mitocondrial de superóxido y en el tenor oxidativo celular inducidos por AINEs.

### **4.6.1 Efecto de quercetina sobre la inhibición del complejo I inducida por AINEs en mitocondrias aisladas.**

Para evaluar la capacidad de quercetina para proteger frente a la inhibición del complejo I inducida por AINEs, el medio de reacción fue suplementado con 5  $\mu\text{M}$  del mencionado polifenol. Concentraciones crecientes de cada uno de los AINEs, 5, 10, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ , también fueron añadidas al medio. Las mitocondrias aisladas de epitelio duodenal

fueron luego incubadas por 10 minutos en dicho medio y la actividad del complejo I fue medida como se refirió anteriormente.

#### **4.6.2 Efecto de quercetina sobre la inhibición del complejo I en células Caco-2 incubadas con AINEs.**

Para estudiar el efecto de quercetina sobre la inhibición del complejo I de células Caco-2, se incubaron dichas células con cada uno de los AINEs (250  $\mu$ M) en presencia y ausencia de quercetina 5  $\mu$ M. Posteriormente las células fueron lavadas con PBS y extraídas mediante tripsinización. Las mitocondrias de cada uno de los cultivos celulares fueron aisladas y la actividad del complejo I fue medida según lo referido anteriormente.

#### **4.6.3 Efecto de quercetina sobre la producción de superóxido en mitocondrias aisladas expuestas a AINEs.**

Para estudiar el efecto de quercetina sobre la producción de superóxido en presencia de AINEs, se añadió dicho polifenol (5  $\mu$ M) al medio de incubación de las mitocondrias con AINEs. La cuantificación de los niveles de superóxido se realizó de forma similar a lo descrito anteriormente.

#### **4.6.4 Efecto de quercetina sobre la producción de superóxido mitocondrial en células Caco-2 expuestas a AINEs.**

Para estudiar el efecto de quercetina sobre los niveles de superóxido mitocondrial en células Caco-2 expuestas a AINEs, se agregó quercetina 5  $\mu$ M al medio de incubación de dichas células con cada uno de los AINEs en estudio. Luego de 10 minutos de incubación, las células fueron lisadas y su fluorescencia medida según lo descrito anteriormente.

#### **4.6.5 Efecto de quercetina sobre el tenor oxidativo de células Caco-2 expuestas a AINEs.**

Para evaluar el efecto de quercetina sobre el tenor oxidativo de células Caco-2 expuestas a AINEs, dichas células, pre-incubadas con DCDHF-DA 50  $\mu$ M, fueron incubadas con

cada uno de los AINEs (250  $\mu$ M) en ausencia o presencia de quercetina 5  $\mu$ M durante 60 minutos. Posteriormente las células fueron lavadas, lisadas, y su fluorescencia cuantificada según lo mencionado anteriormente.

#### **4.6.6 Efecto de quercetina sobre la viabilidad de células Caco-2 expuestas a AINEs.**

Para estudiar el efecto de quercetina sobre la viabilidad de células incubadas con cada uno de los AINEs, células Caco-2 fueron incubadas durante 60 minutos con 250  $\mu$ M de cada uno de los AINEs en estudio, en ausencia o presencia de quercetina 5  $\mu$ M. Luego de la incubación, el sobrenadante de cada uno de los cultivos fue separado. La actividad de la enzima LDH fue cuantificada en cada uno de dichos sobrenadantes, utilizando el kit “CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay” (Promega), según lo referido anteriormente.

### **4.7 Métodos relacionados con el objetivo específico 5**

Estudiar el posible mecanismo que subyacería a un potencial efecto protector de quercetina frente a la postulada inhibición del complejo I inducida por AINEs.

#### **4.7.1 Efecto de quercetina sobre la actividad del complejo I en mitocondrias aisladas.**

Para establecer el efecto de quercetina sobre la actividad del complejo I de mitocondrias aisladas, se reemplazó la coenzima Q del medio de reacción por concentraciones crecientes de quercetina (1, 2.5, 5 y 10  $\mu$ M). La actividad del complejo I se midió según lo referido anteriormente. La actividad del complejo I en ausencia de coenzima Q y quercetina se usó como control negativo.

#### **4.7.2 Actividad del sistema complejo I - complejo III.**

La actividad del sistema complejo I – complejo III fue determinada en mitocondrias aisladas de epitelio duodenal de rata siguiendo la tasa de reducción del citocromo c a

550 nm ( $\epsilon$  20 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>), después de la adición de NADH y coenzima Q (adaptado de Birch-Machin et al. 1994).

El medio de reacción consistió de buffer fosfato 25 mM pH 7.2, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mg/ml BSA (fracción V), 2 mM KCN, 65  $\mu$ M coenzima Q, 50  $\mu$ M citocromo c y 0.6 mM dodecil- $\beta$ -D-maltósido. El KCN (inhibidor del complejo IV) se incluyó en el medio de reacción para prevenir la re-oxidación del citocromo c. La suspensión mitocondrial fue añadida al medio de reacción e incubada durante 10 minutos a 34 °C. El ensayo de actividad del sistema complejo I – complejo III se inició con la adición de NADH 130  $\mu$ M en ausencia o presencia de 2  $\mu$ g/ml antimicina A y la tasa de reducción de citocromo c fue monitoreada durante 5 minutos.

#### **4.7.3 Efecto de quercetina sobre la actividad del sistema complejo I – complejo III en mitocondrias aisladas.**

Para determinar el efecto de quercetina sobre la actividad del sistema complejo I – complejo III, se reemplazó la coenzima Q en el medio de reacción por quercetina 5 o 10  $\mu$ M. La actividad del sistema también fue medida en ausencia de coenzima Q o NADH como controles negativos de actividad. Finalmente, se añadió quercetina 5  $\mu$ M al medio de reacción en ausencia de coenzima Q y la actividad del sistema complejo I – complejo III fue medida en ausencia de NADH.

#### **4.7.4 Ensayo de consumo de oxígeno mitocondrial.**

La tasa de consumo de oxígeno mitocondrial se midió en una suspensión mitocondrial utilizando un electrodo específico para oxígeno (YSI MODEL 5300 BIOLOGICAL OXYGEN MONITOR (YSI Incorporated)). El medio de reacción consistió de buffer fosfato 25 mM pH 7.2, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mg/ml BSA (fracción V), 0.6 mM dodecil- $\beta$ -D-maltósido, 65  $\mu$ M coenzima Q y 50  $\mu$ M citocromo c. Mitocondrias aisladas de epitelio duodenal de rata fueron añadidas al medio de reacción y el sistema se estabilizó. El ensayo se inició mediante la adición de NADH 130  $\mu$ M. La concentración de oxígeno

en la suspensión se monitoreó durante 5 minutos. El mismo experimento en ausencia de coenzima Q se usó como control negativo.

#### **4.7.5 Efecto de quercetina sobre el consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas.**

Para establecer el efecto de quercetina sobre el consumo de oxígeno mitocondrial, la coenzima Q en el medio de ensayo fue reemplazada por quercetina 5 o 10  $\mu\text{M}$ . Luego de estabilizar la suspensión mitocondrial, el consumo de oxígeno en presencia de quercetina fue medido según lo mencionado anteriormente.

#### **4.8 Análisis estadísticos**

Todos los datos se analizaron usando el software estadístico GraphPad Prism 5. Los valores representan el promedio de por lo menos 3 experimentos independientes, cada uno realizado en cuadruplicado. Para establecer las diferencias entre los grupos se analizaron los datos mediante análisis de ANOVA. Las diferencias específicas entre un grupo y otro se determinaron mediante el post-test de Bonferroni. Los valores se consideraron diferentes con  $p < 0.05$ .

## **5 RESULTADOS**

---

### **5.1 Resultados relacionados con el objetivo específico 1**

#### **5.1.1 Inhibición del Cx-I de mitocondrias aisladas inducida por AINEs.**

Con el fin de evaluar el potencial de diferentes AINEs (indometacina, diclofenaco, piroxicam, ibuprofeno y aspirina) para inhibir el Cx-I, mitocondrias aisladas de epitelio duodenal de rata fueron expuestas a una concentración fija de 50  $\mu\text{M}$  de cada AINE durante 10 minutos. La capacidad inhibitoria fue evaluada como descenso en la velocidad de oxidación de NADH (caída de la DO a 340 nm en un período de 5 min). Como se observa en figura 1, todos los AINEs indujeron una inhibición del complejo I. La inhibición mínima fue de un 50%, para ibuprofeno y la máxima, de un 71%, para diclofenaco.

De forma complementaria, para evaluar el alcance del efecto inhibitorio de los AINEs sobre el complejo I, mitocondrias aisladas fueron incubadas con concentraciones crecientes (5 -100  $\mu\text{M}$ ) de cada uno de los AINEs anteriormente mencionados. Como se observa en la figura 2, para todos los AINEs estudiados el efecto inhibitorio sobre el complejo I fue concentración-dependiente, observándose el mismo patrón de eficacia inhibitoria observado en la figura 1.

#### **5.1.2 Inhibición del Cx-I mitocondrial en células Caco-2 expuestas a AINEs.**

Con el objeto de evaluar la capacidad de los AINEs para inhibir el Cx-I mitocondrial en células Caco-2 en cultivo, células fueron incubadas en botellas de 75  $\text{cm}^2$  con cada AINE (250  $\mu\text{M}$ ) durante 10 minutos. Posteriormente, las mitocondrias de dichas células fueron aisladas y la actividad del Cx-I medida. Como se muestra en la figura 3, todos los AINEs inhibieron el Cx-I; el más efectivo fue diclofenaco (74%) y el menos efectivo ibuprofeno (50%).



## **5.2 Resultados relacionados con el objetivo específico 2**

### **5.2.1 Efecto de AINEs sobre la producción de superóxido mitocondrial.**

Con el objetivo de evaluar si la inhibición del complejo I inducida por los diferentes AINEs se ve reflejada en un aumento en la producción de superóxido a nivel mitocondrial, mitocondrias aisladas de epitelio duodenal de rata (precargadas con la sonda DHE) fueron incubadas con los diferentes AINEs (50  $\mu$ M) durante 20 minutos. Posteriormente, dichas mitocondrias fueron lisadas y la oxidación de DHE fue cuantificada. La figura 4 da cuenta de la capacidad de todos los AINEs para incrementar los niveles de superóxido existentes dentro de la mitocondria, comparados con los observados en mitocondrias incubadas solamente con el vehículo en el que se disolvieron los AINEs (buffer fosfato). Piroxicam y diclofenaco mostraron una mayor capacidad para incrementar (en 94% y 81%, respectivamente) la producción de superóxido, mientras que aspirina, ibuprofeno e indometacina no fueron tan efectivos en promover dicho efecto (siendo los incrementos de 52%, 43% y 42%, respectivamente).

Con el objeto de comprobar si el incremento en la producción de superóxido se observa también al inhibir el complejo I en sistemas celulares, células Caco-2 fueron incubadas con cada uno de los AINEs en estudio (250  $\mu$ M) durante 20 minutos. Una vez transcurrido dicho tiempo, las células fueron lisadas y la fluorescencia, derivada de la oxidación de la sonda Mitosox (específica para superóxido mitocondrial), cuantificada. La figura 5 da cuenta de la capacidad de cada uno de los AINEs para inducir un aumento en los niveles de superóxido mitocondrial de células Caco-2, siendo nuevamente diclofenaco y piroxicam los más efectivos en inducir dicho aumento (73% y 71%, respectivamente). Indometacina, ibuprofeno y aspirina por su parte, mostraron una menor capacidad para aumentar el superóxido mitocondrial (en 35%, 33% y 32%, respectivamente).

### **5.2.2 Efecto de AINEs sobre el tenor oxidativo de células Caco-2.**

Con la intención de estudiar el efecto de los diferentes AINEs sobre el tenor oxidativo celular, células Caco-2 fueron incubadas durante 20 o 60 minutos con cada uno de los AINEs en estudio (250  $\mu$ M). El tenor oxidativo fue evaluado como la oxidación de la sonda DCDHF, cuantificada mediante fluorescencia. Como se muestra en la figura 6, tras 20 minutos de incubación, ninguno de los AINEs incremento el tenor oxidativo celular. Por otra parte, luego de 60 minutos de incubación con AINEs, todas las células mostraron un elevado tenor oxidativo, siendo dicho efecto mayor para piroxicam (135%) y diclofenaco (120%) y menor para la incubación con indometacina, aspirina e ibuprofeno (83%, 72% y 54%, respectivamente).

### **5.2.3 Citotoxicidad de AINEs.**

Con el fin de evaluar si la inhibición del complejo I y el aumento tanto en los niveles de superóxido mitocondrial como en el tenor oxidativo celular inducidos por AINEs se traducen en una disminución en la viabilidad celular, células Caco-2 fueron incubadas durante 20 o 60 minutos con cada uno de los AINEs en estudio (250  $\mu$ M). Posteriormente se cuantificó la liberación de LDH en cada uno de dichos cultivos celulares como un indicador de muerte celular. Como se muestra en la figura 7, ninguno de los AINEs incrementó la liberación de LDH tras 20 minutos; por el contrario, tras 60 minutos de incubación, todos los AINEs incrementaron la liberación de LDH, siendo piroxicam el más citotóxico, con un incremento cercano al 190% respecto al control. El menos citotóxico fue ibuprofeno, que incrementó la muerte celular, respecto del control en un 82%.

### **5.3 Resultados relacionados con el objetivo específico 3**

#### **5.3.1 Efecto de concentraciones crecientes de coenzima Q y de NADH sobre la inhibición del Cx-I inducida por AINEs.**

Con el objeto de entender el posible mecanismo de inhibición del Cx-I por parte de los AINEs, mitocondrias aisladas de epitelio duodenal fueron incubadas con distintas concentraciones de cada uno de los sustratos del complejo I, coenzima Q o NADH, en ausencia y en presencia de cada uno de los AINEs en estudio (50  $\mu\text{M}$ ). La actividad control fue definida como la actividad del complejo I al ser ensayada en ausencia de AINEs, empleando 65  $\mu\text{M}$  de coenzima Q y 130  $\mu\text{M}$  de NADH. Dicha actividad se mantuvo constante al ensayar el Cx-I en el rango de concentraciones de coenzima Q y de NADH arriba mencionado (ver Anexo figuras 1, 2 y 3).

Las figuras 8 A-E muestran los resultados de experimentos en los que mitocondrias aisladas fueron incubadas en forma simultánea con coenzima Q y con cada uno de los AINEs durante 10 minutos. Luego de la incubación, la actividad del complejo I fue medida siguiendo la oxidación de NADH a 340 nm. Respecto a la actividad control, representada como barra blanca y con un 100% (mitocondrias incubadas con 65  $\mu\text{M}$  de coenzima Q), la actividad del Cx-I en mitocondrias expuestas a los AINEs (incubadas con 65  $\mu\text{M}$  de coenzima Q), fue menor en todos los casos (tal actividad se representa como segunda barra gris en cada uno de los gráficos de las figuras 8 A-E). El efecto inhibitorio de los AINEs, que para una concentración de coenzima Q de 65  $\mu\text{M}$  varió de 40 a 50% según el AINE), se incrementó levemente (entre un 5-15%, dependiendo del AINE) al disminuir la concentración de coenzima Q a 32.5  $\mu\text{M}$ . En cambio, al aumentar la concentración de coenzima (de 65 hasta 520  $\mu\text{M}$ ) la inhibición del Cx-I inducida por cada uno de los AINEs decreció en forma concentración dependiente respecto a coenzima Q. Una concentración de 520  $\mu\text{M}$  de coenzima Q permitió prevenir por completo el efecto inhibitorio de indometacina, ibuprofeno y aspirina, restaurándose la

actividad normal del Cx-I. En el caso de diclofenaco y piroxicam, el efecto máximo de recuperación de la actividad del Cx-I fue entre 75-80% del valor control.

En las figuras 8 A-E se mostró el efecto de la adición simultánea de una concentración fija de los diversos AINEs (50  $\mu\text{M}$ ) y de concentraciones crecientes de coenzima Q. En las figuras 9 A-E, en cambio, se grafican los resultados de experimentos en los cuales mitocondrias fueron incubadas durante 10 minutos con cada uno de los AINEs (50  $\mu\text{M}$ ) en ausencia de coenzima Q. Posteriormente, se adicionó a dichas mitocondrias concentraciones crecientes de coenzima Q (32.5 - 520  $\mu\text{M}$ ). Tras la adición de coenzima Q, la actividad del complejo I fue inmediatamente medida. Como se muestra en las figuras 9 A-E, respecto a la actividad control, representada como barra blanca y con un 100% (mitocondrias incubadas con 65  $\mu\text{M}$  de coenzima Q), la actividad del Cx-I en mitocondrias expuestas a los AINEs (a las cuales se les adicionó 65  $\mu\text{M}$  de coenzima Q), fue menor en todos los casos (tal actividad se representa como segunda barra gris en cada uno de los gráficos de las figuras 9 A-E). Nuevamente la adición de una concentración menor de coenzima Q (32.5  $\mu\text{M}$ ) aumentó el efecto inhibitorio de los AINEs. Aunque la adición de concentraciones mayores de coenzima Q, hasta 520  $\mu\text{M}$ , permitió revertir la inhibición del complejo I inducida por cada uno de los AINEs, el efecto protector de concentraciones crecientes de coenzima Q fue solo parcial respecto a la actividad control. La máxima recuperación de la actividad fue para indometacina (cerca al 80%) y la mínima fue para diclofenaco (60%).

Por otra parte, las figuras 10 A-E muestran los resultados de experimentos en que mitocondrias aisladas de epitelio duodenal fueron simultáneamente incubadas durante 10 minutos con 50  $\mu\text{M}$  de cada uno de los AINEs y con 65  $\mu\text{M}$  de coenzima Q. Posteriormente, se adicionó a dichas mitocondrias concentraciones crecientes de NADH (65 - 520  $\mu\text{M}$ ) y la actividad del complejo I fue medida. Como se muestra en las figuras 10 A-E, respecto a la actividad control, representada como una barra blanca y con un 100% (mitocondrias incubadas con 130  $\mu\text{M}$  de NADH), la actividad de mitocondrias

incubadas con cada uno de los AINEs (en presencia de 130  $\mu\text{M}$  de NADH) fue menor (tal actividad se representa como la segunda barra gris en los gráficos de las figuras 10 A – E). La adición de concentraciones menores (32.5  $\mu\text{M}$ ) o mayores (260-520  $\mu\text{M}$ ) de NADH no tuvo ningún efecto sobre la inhibición del Cx-I inducida por cada uno de los AINEs en estudio.

## **5.4 Resultados relacionados con el objetivo específico 4**

### **5.4.1 Efecto de quercetina sobre la inhibición del Cx-I inducida por AINEs.**

Basados en antecedentes que apuntan hacia quercetina como un protector frente al daño gastrointestinal inducido por AINEs, se estudió la potencial capacidad de este flavonoide para prevenir y/o revertir la inhibición del Cx-I, al ser adicionado a mitocondrias aisladas de epitelio duodenal en forma simultánea con el AINE. Las figuras 11 (A-E) muestran en forma comparativa las curvas de % actividad del Cx-I respecto al logaritmo de la concentración de AINE para mitocondrias incubadas con cada uno de los AINEs en estudio (5 – 100  $\mu\text{M}$ ), en ausencia y en presencia de quercetina 5  $\mu\text{M}$ . En todos los casos se obtuvieron curvas de inhibición concentración dependiente. Sin embargo, la adición de quercetina desplazó las curvas obtenidas en ausencia de dicho flavonoide -en el rango de concentraciones de AINE estudiado- hacia una menor inhibición del Cx-I. No se observaron diferencias significativas entre las pendientes de ambas curvas para ninguno de los AINEs ( $p > 0.05$ ). Cabe destacar que quercetina no afectó la actividad basal del complejo I, en un rango de concentraciones de 1 a 10  $\mu\text{M}$  (ver anexo figura 4)

La Tabla 1 resume los valores de  $\text{IC}_{50}$  correspondientes a la inhibición de la actividad del Cx-I inducida por cada uno de los AINEs obtenidos a partir de las figuras 11 A-E. Como se puede ver, en todos los casos Quercetina incremento en forma sustancial los valores de  $\text{IC}_{50}$ . El efecto máximo de quercetina fue observado en el caso de la inhibición inducida por aspirina y alcanzó un 1000%, es decir, incrementó en 10 veces la concentración de aspirina necesaria para inhibir en un 50% la actividad del complejo I.

En el caso de la inhibición inducida por ibuprofeno, el aumento de la IC50 fue de un 200% (efecto mínimo).

Para evaluar si el efecto de quercetina sobre la inhibición del complejo I inducida por AINEs también se observa en células Caco-2, dichas células fueron incubadas con cada uno de los AINEs en estudio (250  $\mu$ M) en ausencia o presencia de quercetina 5  $\mu$ M. Posteriormente se aislaron las mitocondrias y la actividad del complejo I fue medida. La figura 12 da cuenta de la capacidad de quercetina para prevenir la inhibición del complejo I inducida por cada uno de los AINEs ensayados. En todos los casos el efecto de quercetina permitió recuperar totalmente la actividad control.

#### **5.4.2 Efecto de quercetina sobre la producción de superóxido mitocondrial**

Continuando con los estudios de evaluación del potencial efecto de quercetina como protector frente al daño celular inducido por AINEs, se estudió la capacidad de dicho flavonoide para prevenir el aumento en los niveles de superóxido observado al incubar mitocondrias con cada uno de los AINEs en estudio. Para ello mitocondrias aisladas de epitelio duodenal de rata fueron incubadas durante 20 minutos con cada uno de los AINEs (50  $\mu$ M) en ausencia y presencia de quercetina 5  $\mu$ M. Posteriormente la oxidación de la sonda fluorescente DHE fue cuantificada como un indicador de los niveles de superóxido presentes en cada muestra. La figura 13 muestra la capacidad de quercetina para prevenir el aumento en la producción de superóxido mitocondrial inducido por todos los AINEs ensayados. Dicha prevención fue parcial, siendo inhibido el incremento inducido por ibuprofeno (en un 31%), indometacina (en un 38%), diclofenaco (en un 52%) y piroxicam (en un 60%). Cabe destacar que en el caso de aspirina, el efecto de quercetina fue total 91%).

Para comprobar si a nivel celular, quercetina también es capaz de prevenir el aumento en la producción de superóxido mitocondrial inducido por AINEs, células Caco-2, pre-cargadas con la sonda Mitosox<sup>®</sup>, fueron incubadas durante 20 minutos con cada uno de

los AINEs (250  $\mu$ M) en ausencia o en presencia de 5  $\mu$ M de quercetina. Posteriormente las células fueron lisadas y la fluorescencia producto de la oxidación de Mitosox<sup>®</sup> fue cuantificada. Como muestra la figura 14, el efecto protector de quercetina contra el aumento en la producción de superóxido mitocondrial fue cercano a un 100% para todos los AINEs ensayados.

#### **5.4.3 Efecto de quercetina sobre el incremento en el tenor oxidativo celular inducido por AINEs.**

Con el fin de evaluar si quercetina tiene un efecto protector contra el aumento en el tenor oxidativo celular inducido por los AINEs en estudio, se incubaron células Caco-2 durante 60 minutos con cada uno de dichos agentes (250  $\mu$ M) en ausencia o presencia de quercetina 5  $\mu$ M. Posteriormente las células fueron lisadas y el tenor oxidativo celular fue evaluado como la fluorescencia producto de la oxidación de la sonda DCDHF. Como se muestra en la figura 15, quercetina previno en forma significativa el aumento en el tenor oxidativo celular inducido por todos los AINEs estudiados. El efecto protector fue total para aspirina, indometacina e ibuprofeno (en un 99%, 85% y 63%, respectivamente) mientras que para diclofenaco y piroxicam la protección solo fue parcial (en un 51% y 53%, respectivamente).

#### **5.4.4 Efecto de quercetina sobre la viabilidad de células Caco-2 expuestas a AINEs.**

Con el objetivo de evaluar el potencial de quercetina como un protector frente a la disminución en la viabilidad celular inducida por AINEs en células Caco-2, dichas células fueron incubadas durante 60 minutos con 250  $\mu$ M de cada uno de los AINEs en ausencia o presencia de quercetina 5  $\mu$ M. Como se muestra en la figura 16, quercetina previno por completo el incremento en la liberación de LDH inducido por cada uno de los AINEs en estudio.

## **5.5 Resultados relacionados con el objetivo específico 5**

### **5.5.1 Efecto de quercetina sobre la actividad del complejo I, complejos I-III y sobre el consumo de oxígeno mitocondrial.**

Con el propósito de entender el posible mecanismo mediante el cual quercetina previene la inhibición del Cx-I inducida por los diversos AINEs, se estudió el efecto de dicho polifenol sobre la actividad de los complejos mitocondriales I y I-III y sobre el consumo de oxígeno a nivel mitocondrial.

En la figura 17, donde se muestra la actividad del Cx-I, la barra blanca representa la actividad control, correspondiente al ensayo del complejo en presencia de 130  $\mu\text{M}$  de NADH y 65  $\mu\text{M}$  de coenzima Q. En dicha figura se puede observar que en ausencia de coenzima Q la actividad del Cx-I se reduce en forma sustancial, alcanzando tan solo un 12% de la actividad control. Bajo tal condición, la adición de concentraciones crecientes de quercetina (1-10  $\mu\text{M}$ ) permitió recuperar la actividad del Cx-I en forma concentración dependiente, alcanzándose un 80% del valor control a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ .

En la figura 18, se muestra la actividad de la cadena de transporte de electrones comprendida entre el Cx-I y el Cx-III. En estos experimentos se utilizó NADH y coenzima Q como dador inicial y como carrier de electrones, respectivamente, y citocromo c como aceptor final de estos. La actividad control (barra blanca en la figura 18, 100%) se definió como la reducción de citocromo c (50  $\mu\text{M}$ ) en presencia de NADH (130  $\mu\text{M}$ ) y de coenzima Q (65  $\mu\text{M}$ ). En ausencia de coenzima Q o de NADH, la reducción de citocromo c disminuyó a un 28% del valor control. Bajo una condición de ausencia de coenzima Q (pero en presencia de NADH), la adición de 5  $\mu\text{M}$  de quercetina permitió recuperar la actividad del sistema Cx-I-Cx-III alcanzando un 61% de la actividad control. Con 10  $\mu\text{M}$  de quercetina la actividad de los complejos I-III fue casi totalmente recuperada (92%, sin diferencias significativas con el control).



En la figura 19, donde se muestra el consumo de oxígeno mitocondrial, se definió el control como el consumo al incubar las mitocondrias con 130  $\mu\text{M}$  NADH, 65  $\mu\text{M}$  coenzima Q y 50  $\mu\text{M}$  citocromo c (barra blanca, 100%). Dicho control disminuyó a un 18% al retirar la coenzima Q del medio. Al adicionar quercetina a las mitocondrias, en ausencia de coenzima Q, el consumo de oxígeno se incrementó, llegando a un 70% del basal con una concentración de quercetina de 5  $\mu\text{M}$  y a un 97% (recuperación completa) con 10  $\mu\text{M}$ .

## 6 DISCUSIÓN

---

Los efectos secundarios asociados al consumo de AINEs limitan enormemente su uso como terapias para combatir la inflamación y el dolor crónico asociado a condiciones como la artritis reumatoide, el lupus, y otras patologías similares (Langman et al. 1994; Brun et al. 2001; Ong et al. 2007; Vonkeman et al. 2010). Por ende, es importante estudiar los mecanismos mediante que subyacen a los efectos no deseados inducidos por los AINEs, principalmente aquellos del tipo gastrointestinal. Del mismo modo, es altamente deseable avanzar en el desarrollo de estrategias que limiten o eliminen dichos efectos. El objetivo primordial de la presente tesis fue investigar los efectos nocivos que los AINEs, indometacina, diclofenaco, piroxicam, ibuprofeno y aspirina, tienen sobre el funcionamiento y el estado oxidativo tanto de mitocondrias aisladas de epitelio duodenal de rata como de células Caco-2. Se abordó también en esta investigación el potencial que quercetina, un polifenol natural, podría tener como protector frente a dichos efectos tóxicos, así como los posibles mecanismos que subyacen a dicha protección.

Una de las teorías más aceptadas que explica la ocurrencia de efectos secundarios gastrointestinales asociados al uso de AINEs se relaciona con la disfunción mitocondrial que dichos agentes inducirían a nivel de las células epiteliales del tracto gastrointestinal (estómago y duodeno principalmente; Mahmud et al. 1996b; Somasundaran et al. 2000; Somasundaran et al. 2002). La mencionada disfunción mitocondrial llevaría al desencadenamiento de una respuesta oxidativa, inicialmente a nivel mitocondrial y posteriormente a nivel celular, que podría redundar en un incremento en la muerte celular a nivel del epitelio gastrointestinal, y por tanto a una disminuida función de barrera a lo largo de todo el tracto gastrointestinal. En efecto existen varios reportes que involucran a diferentes AINEs con un aumento en el estrés oxidativo, a nivel del tracto gastrointestinal, en animales tratados con dichos agentes (Villegas et al. 2000; Sánchez et al. 2002; Villegas et al. 2002), incluyendo los trabajos recientemente realizados por el

laboratorio en el cual la presente investigación fue llevada a cabo (Carrasco-Pozo et al. 2010; Carrasco-Pozo et al. 2011).

Cabe destacar, sin embargo, que el evento “gatillante del incremento en el tenor oxidativo celular” aún no ha sido descrito con precisión (Somasundaran et al. 1997; Watanabe et al. 2011). Reportes anteriores, obtenidos en el laboratorio en el que se desarrolló la presente tesis, sugieren que indometacina, un AINE paradigma en cuanto a daño gastrointestinal, sería capaz de inhibir el complejo I mitocondrial de mitocondrias aisladas de epitelio duodenal de rata, así como de células Caco-2 expuestas al mencionado AINE (Carrasco-Pozo et al. 2010). Dicha inhibición llevaría a un descenso en los niveles de ATP y a un incremento en la producción de superóxido a nivel mitocondrial, signos característicos de una disfunción mitocondrial.

Los resultados del presente estudio comprueban la capacidad inhibitoria de indometacina sobre el complejo I, y además demuestran que los otros AINEs aquí testeados, diclofenaco, piroxicam, ibuprofeno y aspirina, son también efectivos inhibidores de dicho complejo mitocondrial. Experimentos conducidos en mitocondrias aisladas muestran que cada uno de los AINEs en estudio inhibe el complejo I en forma concentración dependiente, a concentraciones que van desde 5 hasta 100  $\mu\text{M}$ . Tal concentración-dependencia sugiere que estos agentes promoverían su acción inhibitoria del complejo I actuando “en forma directa” sobre un sitio específico (muy posiblemente interactuando con un sitio relevante a la actividad catalítica de una proteína o bien compitiendo con un sustrato de dicha proteína) en la función de tal complejo. A pesar de ser un efecto común a todos los AINEs estudiados, la potencia inhibitoria ( $\text{IC}_{50}$ ) de estos resultó distinta. Así, diclofenaco y piroxicam muestran mayor eficiencia (2-3 veces) al inhibir el complejo I comparados con aspirina, indometacina e ibuprofeno. Los resultados obtenidos en mitocondrias aisladas fueron replicados en células Caco-2 expuestas a cada uno de los AINEs mencionados, observándose el mismo patrón de potencias inhibitorias antes referido. Esto es, los agentes fueron efectivos en inhibir el

complejo I, aun cuando estos fueron adicionados al medio extracelular, en lugar de su adición directa sobre mitocondrias. El hecho que la inhibición del complejo I se haya observado en mitocondrias aisladas de células expuestas, da cuenta de que el efecto de los AINEs sobre el complejo I no se pierde a pesar del procedimiento experimental que supone el aislamiento de tales organelos. Es decir, los AINEs ingresan a la mitocondria desde el espacio extracelular y su efecto permanece aún tras la remoción del contenido extracelular (por lavado), y el posterior aislamiento de las mitocondrias, reflejando, muy posiblemente, la permanencia de los AINEs al interior de estos organelos. Sin embargo, al exponer células Caco-2 a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  de los AINEs, esto es, idéntica a aquella que en mitocondria aislada resultó efectiva para inhibir el complejo I, no se observó una inhibición efectiva del complejo I. Al adicionar a las células Caco-2, concentraciones de AINEs 5 veces mayores (250  $\mu\text{M}$ ), se observó un nivel de inhibición similar al observado en mitocondrias aisladas. El requerimiento de mayor concentración de AINEs podría explicarse en términos de que en el caso de los experimentos realizados en células Caco-2, las moléculas de AINEs deben ingresar a la célula, superando limitaciones de transporte a través de la membrana plasmática, y luego enfrentar la posibilidad de ser biotransformadas y eliminadas; esto último podría suponer mermas respecto a la concentración extracelular que se traducirían en una menor concentración de AINEs realmente disponible para acceder a la mitocondria, donde finalmente estos agentes ejercerían sus efectos inhibitorios sobre el complejo I.

Los resultados dan cuenta que los 5 AINEs estudiados, es decir todos, comparten la capacidad para inhibir el complejo I. Tal evento podría ser clave en el desencadenamiento de una disfunción mitocondrial, puesto que el mencionado complejo es el punto de entrada para el NADH en la cadena transportadora de electrones mitocondrial (Janssen et al. 2007). El transporte de electrones desde el NADH hasta el oxígeno molecular a través de la cadena transportadora es un evento clave en la síntesis mitocondrial de ATP (Schultz et al. 2001); ello ocurre dado que la CTE genera un

gradiente de protones entre la matriz y el espacio intermembranas de dicho organelo, que es aprovechado por el complejo V para la síntesis de ATP en un proceso conocido como fosforilación oxidativa. Estudios previos dan cuenta de que una inhibición del complejo I redundaría en un disminuido transporte de electrones, lo que a su vez implicaría una menor síntesis de ATP (Jewess et al. 1994; Schapira 2010). Otro efecto que resulta de una inhibición del complejo I es una incrementada producción de radicales superóxido. Bajo condiciones fisiológicas el complejo I es un productor de superóxido, debido principalmente a la existencia transiente de un radical flavina-semiquinona (Verkhovskaya et al. 2008; Zhang et al. 2008). Sin embargo, ante una inhibición del complejo I, lo que impide o limita el paso de electrones entre un centro redox y el siguiente dentro de la estructura del complejo, dicha producción de superóxido se ve exacerbada (Lambert et al. 2004a; Lambert et al. 2004b). Lo anterior se desprende de la acumulación de electrones en estado de transferencia a lo largo de los clústeres Fe-S y en el sitio de unión a ubiquinona, los cuales pueden reducir monovalentemente una molécula de oxígeno, dando lugar a la formación de anión superóxido (St-Pierre et al. 2002; Turrens 2003). Con el fin de estudiar si la inhibición del complejo I inducida por AINEs resulta en un aumento en la producción de superóxido, en la investigación realizada se cuantificaron los niveles del mencionado radical en mitocondrias aisladas expuestas a cada uno de los AINEs en estudio. Los resultados obtenidos muestran que los AINEs estudiados son capaces de incrementar los niveles de superóxido dentro de la mitocondria. Dicho efecto se observó solo tras 20 minutos de exposición a estos agentes, no así a los 10 minutos. Dado que a los 10 minutos de exposición de mitocondrias a los AINEs sí se observa una inhibición del complejo I, es muy posible que el aumento observado solo a los 20 minutos de cuenta de que la producción de superóxido sucede (en lugar de preceder) a la inhibición de dicho complejo y que se requeriría entre 10 y 20 minutos de exposición para que el incremento en la producción de superóxido se haga experimentalmente evidente. Nuevamente se observaron diferencias en la eficacia con que cada uno de los AINEs incrementó los niveles de superóxido mitocondrial, siendo

diclofenaco y piroxicam los que presentaron una mayor capacidad para inducir dicho aumento. Esto último se condice la mayor potencia inhibitoria que, relativo a los otros AINEs, diclofenaco y piroxicam mostraron sobre el complejo I y reafirma la hipótesis de que el aumento en los niveles de superóxido estaría efectivamente relacionado con la inhibición del complejo I.

Con el fin de comprobar si el efecto sobre la producción mitocondrial de superóxido también se observa al incubar células Caco-2 con los diferentes AINEs, se utilizó la sonda fluorescente MitoSox<sup>®</sup>. Dicha sonda, además de ser específica para superóxido, se localiza rápida y específicamente en la mitocondria, lo que permite evaluar el efecto de los AINEs, sobre la producción de superóxido de dicho organelo en particular. Los resultados obtenidos con MitoSox<sup>®</sup> en células Caco-2 indican que la capacidad de los AINEs para inducir un aumento en los niveles de superóxido mitocondrial, observada en mitocondrias aisladas de epitelio duodenal, es también observable al adicionar dichos agentes al medio extracelular.

El aumento en la producción de superóxido mitocondrial es un efecto potencialmente conducente a toxicidad, tanto al interior de la mitocondria como a nivel celular. Sin embargo, como tal, dicho aumento no es *per se* sinónimo de la toxicidad que caracteriza a los AINEs a nivel celular. Estudios realizados en el laboratorio en el cual se realizaron los presentes estudios dan cuenta de que la citotoxicidad de AINEs como indometacina está asociada a un aumento en marcadores de oxidación o estrés oxidativo celular (Carrasco-Pozo et al. 2010; Carrasco-Pozo et al. 2011). Bajo condiciones de generación mitocondrial en exceso de radicales superóxido, estas especies podría escapar hacia el citosol, ya sea como tal a través de poros o canales, o bien, en la forma de radicales hidroperoxi o de peróxido de hidrógeno a través de las membranas mitocondriales (Poyton et al. 2009). Es mucho más factible que especies reactivas como hidroperoxi o peróxido de hidrógeno atravesen membranas biológicas, puesto que carecen de carga que limite dicho paso, mientras que el anión superóxido, debido a la carga negativa que

posee, ve restringida su capacidad para atravesar membranas (Fisher 2009). El paso de especies pro-oxidantes hacia el citosol redundaría en un incremento en el tenor oxidativo general de la célula, lo cual, de no ser controlado, podría llevar al desencadenamiento de procesos oxidativos irreversibles y a la muerte celular (Jones et al 2010; Scherz-Shouval et al. 2011). Para comprobar si el efecto de los AINEs sobre la producción de superóxido mitocondrial se traducen en un incremento en el tenor oxidativo celular, se utilizó la sonda dicloro-dihidrofluoresceína. Dicha sonda se considera un marcador general de especies reactivas del oxígeno, aunque primordialmente reacciona con peróxido de hidrógeno, peroxinitrito e hipoclorito. Al incubar células Caco-2 con cada uno de los AINEs en estudio, no se observó un incremento en el tenor oxidativo a los 20 minutos pero sí a los 60 minutos de exposición. Lo anterior sugiere que el efecto de los AINEs sobre el estado oxidativo celular sería consecuencia de la inhibición del complejo I observada a los 10 minutos, y resultado del incremento de la producción de superóxido mitocondrial (que le sucede) observado tras 20 minutos de exposición de células Caco-2 a dichos agentes. Al igual que lo observado con la inhibición del complejo I y con el aumento en los niveles de superóxido mitocondrial, el incremento en el tenor oxidativo celular fue mayor en células tratadas con piroxicam y con diclofenaco respecto al observado con indometacina, aspirina e ibuprofeno.

En la misma línea, para responder a la interrogante acerca de si el incremento en el tenor oxidativo celular inducido por cada uno de los AINEs se ve traduce o ve reflejado en un incremento en los niveles de muerte celular, se utilizó la enzima lactato deshidrogenasa como marcador de citotoxicidad. Los resultados obtenidos dan cuenta de que la incubación de células Caco-2 con los AINEs estudiados durante 20 minutos no tiene ningún efecto sobre la viabilidad de dichas células. Sin embargo, tras 60 minutos de exposición, todos los AINEs indujeron un aumento en la liberación de LDH hacia el medio extracelular. Cabe mencionar que la liberación de LDH tras el tratamiento de células Caco-2 con piroxicam fue comparativamente mayor que la observada con los

otros cuatro AINEs ensayados. Estos resultados son coherentes con la interpretación de que el incremento en el tenor oxidativo celular inducido por AINEs estaría directamente relacionado con el incremento en la muerte celular observado para dichos agentes.

En su conjunto, los resultados referidos anteriormente dan cuenta de un posible mecanismo que explique el daño a nivel celular que inducen los AINEs sobre el epitelio del tracto gastrointestinal. Dicho mecanismo implicaría, en etapas tempranas de exposición a AINEs, una inhibición del complejo I mitocondrial, evidenciada ya a los 10 minutos en mitocondrias aisladas o en células Caco-2. La inhibición del complejo I resultaría en un aumento en la producción mitocondrial de superóxido, según lo observado en mitocondrias y en células Caco-2 expuestas a AINEs durante 20 minutos. La elevación del tenor oxidativo celular observada tras 60 minutos de incubación de células Caco-2 con AINEs, y no evidenciada tras 20 minutos, da cuenta que la elevación del tenor oxidativo es un evento posterior a la inhibición del complejo I pero conducente al daño celular inducido por AINEs. El incremento en el tenor oxidativo celular aparece entonces como una consecuencia de la elevada producción de superóxido a nivel mitocondrial. La aumentada muerte celular observada tras la incubación de células Caco-2 durante 60 minutos con cada uno de los AINEs estudiados, se desprendería del elevado tenor oxidativo celular inducido por dichos agentes.

El evento gatillante para todo el proceso descrito anteriormente parece ser la temprana inhibición del complejo I. Esto último llevó esta investigación a centrarse, posteriormente, en el estudio del posible mecanismo mediante el cual dicha inhibición ocurre.

A nivel fisiológico, el complejo I interacciona con dos sustratos dentro de su mecanismo enzimático, NADH y coenzima Q (Papa et al. 2002). El primero es el donante inicial de electrones de la cadena transportadora de electrones e interacciona con el complejo I directamente a través del sitio de flavina mononucleotido, entregando dos electrones y



oxidándose en el proceso (Janssen et al 2007). El segundo sustrato, la coenzima Q, interacciona con el complejo I en su dominio transmembrana, captando los electrones donados por el NADH, uno por uno, para posteriormente transferirlos al complejo III y continuar así con la cadena de transporte de dichos electrones (Crane 2001). Si la inhibición del complejo I inducida por AINEs ocurre a nivel de uno de los dos sitios de unión a sustrato que dicho complejo presenta, es posible estudiar su mecanismo mediante experimentos de competencia entre el AINE y el sustrato respectivo. Experimentos destinados a establecer la existencia de competencia entre cada uno de los AINEs y NADH mostraron que concentraciones crecientes de éste último no son capaces de disminuir la inhibición inducida por AINEs sobre el complejo I. Eso indicaría que la mencionada inhibición no ocurre a nivel de la unión de NADH con el complejo. Por otra parte, experimentos destinados a establecer la competencia entre los AINEs y coenzima Q revelaron que concentraciones crecientes de la mencionada coenzima, adicionada a la mitocondria en forma simultánea a la adición de cada AINE, si disminuye la inhibición del complejo I inducida por cada uno de dichos agentes. Más aún, el efecto protector sobre la inhibición del complejo I se observó también cuando la coenzima Q fue agregada tras 10 minutos de incubación de las mitocondrias con los AINEs estudiados, evidenciando que la inhibición del complejo I inducida por estos agentes es, no solo susceptible a competencia por coenzima Q sino además de naturaleza reversible. En su conjunto, los resultados anteriormente referidos nos permiten postular que la inhibición del complejo I inducida por AINEs ocurriría a nivel del sitio de unión de la molécula de coenzima Q al complejo, y que dicha inhibición es del tipo competitiva.

El establecimiento del carácter competitivo y reversible de la inhibición del complejo I por los AINEs, abrió la posibilidad de estudiar el potencial de diversas moléculas para competir con los AINEs por el sitio de unión de coenzima Q de dicho complejo, y/o para desplazar desde dicho sitio a aquellas moléculas de AINEs que ya se encuentren

ocupando tal sitio de unión. En el marco de dicho análisis, cabe mencionar la existencia de evidencias que avalan el estudio de quercetina como un potencial protector frente al daño gastrointestinal inducido por AINEs. Por ejemplo, en 1994, Alarcón de la Lastra et al. demostraron que quercetina es capaz de proteger la mucosa gástrica frente al daño inducido por indometacina, y más recientemente, Carrasco-Pozo et al. establecieron que un extracto polifenólico de cáscara de manzana (APPE), particularmente rico en quercetina, es capaz de proteger células Caco-2 *in vitro* frente a la inhibición del complejo I, al incremento en los parámetros oxidativos y al daño celular inducidos por indometacina (2010), e *in vivo* (ratas, 2011) contra el daño inducido a la mucosa gastrointestinal. Basados en tales evidencias, y en las propiedades atrapadoras de radicales superóxido e hidroxilo de quercetina (Mahakunakorn et al. 2004), en la presente tesis se investigó la capacidad de dicho polifenol tendría para proteger contra la inhibición del complejo I y sus consecuencias oxidativas inducidas por los AINEs tanto en mitocondrias aisladas como en células Caco-2.

En lo que a la inhibición del complejo I se refiere, se evaluó el efecto que tiene la adición simultánea de 5  $\mu$ M de quercetina y de cada uno de los AINEs sobre la actividad del complejo I en mitocondrias aisladas. Los resultados obtenidos indican que quercetina es capaz contraponer, en distintos grados, la inhibición del complejo I inducida por los AINEs, aumentando la IC<sub>50</sub> para cada uno de ellos. El efecto protector de quercetina fue máximo frente a la inhibición inducida por aspirina, incrementando la concentración de aspirina necesaria para inhibir en un 50% el complejo I, en un 1000%. En contraste, el mínimo efecto de quercetina sobre la inhibición del complejo I fue el observado con ibuprofeno, incrementándose el IC<sub>50</sub> en un 200%. La existencia de tal diferencia de incremento en el IC<sub>50</sub> observada para los distintos AINEs sugiere que existirían diferencias significativas en la afinidad con que cada AINE se une al sitio “competible” por quercetina en el complejo I. Los estudios hasta ahora realizados no permiten, sin embargo, discriminar entre las posibilidades de si quercetina incrementa el valor de los

IC50 como consecuencia de una acción primariamente de competencia con los AINEs por el sitio de unión de estos al complejo I (según lo anteriormente visto, correspondería al sitio de unión de coenzima Q), como resultado de su habilidad para desplazar moléculas de AINEs que ya se encuentran unidas a dicho sitio, o bien una combinación de ambos modos de acción. Extender los presentes estudios en dirección a esclarecer lo anterior pudiese ser significativo para definir, eventualmente, la modalidad óptima de intervención con quercetina ante la toxicidad inducida por AINEs como los aquí testeados.

El potencial efecto protector de quercetina sobre la inhibición del complejo I también se estudió en células Caco-2 expuestas a AINEs, donde se encontró que una concentración 5  $\mu\text{M}$  de quercetina fue capaz de proteger por completo frente a la inhibición del complejo I inducida por cada uno de los AINEs. A diferencia de lo anteriormente descrito para la acción inhibitoria de los AINEs sobre el complejo I, en los estudios de protección por quercetina contra dicho efecto, para lograr una protección (o recuperación) total no fue necesario incrementar la concentración de quercetina al pasar de un modelo de mitocondrias aisladas a uno de células Caco-2. Esto último podría explicarse en términos de la recientemente reportada capacidad que tendría quercetina para concentrarse rápida y efectivamente en la mitocondria (Biasutto et al. 2009; Fiorani et al. 2009). Según lo reportado, quercetina se acumularía hasta 100 veces en el interior de la mitocondria, comparado con la concentración extracelular a la que son sometidas las células.

El efecto protector de quercetina no se limita a contraponer la inhibición del complejo I inducida por los diversos AINEs. En efecto, quercetina también fue capaz de proteger frente al incremento en la producción de superóxido mitocondrial observado al incubar tanto mitocondrias aisladas como células Caco-2 con cada uno de los AINEs en estudio. La concentración de quercetina efectiva para promover dicha protección fue, en ambas modalidades experimentales, de 5  $\mu\text{M}$ ; El efecto protector de quercetina no fue del todo

inesperado, dada su reconocida capacidad para atrapar radicales superóxido (Mahakunakorn et al. 2004), sin embargo, sí lo fue la baja concentración de dicho flavonoide necesaria para lograr una total eliminación de la sobreproducción de dicho radical en células Caco-2 expuestas a AINEs. Este relativamente bajo requerimiento de quercetina podría expresar más bien un efecto protector frente a la causa de sobreproducción de superóxido (inhibición del complejo I) que una acción directa de neutralización del mencionado radical. Otra evidencia que avala el efecto de quercetina como protector frente a la inhibición del complejo I más que como simple atrapador de radicales, es el hecho de que, a la concentración evaluada, quercetina no fue capaz de disminuir la producción basal de superóxido mitocondrial, por lo que el efecto de acción antioxidante directa del flavonoide no sería relevante en la disminución del superóxido producido frente al tratamiento con AINEs.

Quercetina fue, además, capaz de proteger células Caco-2 frente al aumento en el tenor oxidativo celular (DCDHF) inducido por la exposición a AINEs. A una concentración de 5  $\mu$ M, quercetina indujo una protección total en células expuestas a indometacina, aspirina e ibuprofeno. Sin embargo, a diferencia de lo observado en el caso de los parámetros mitocondriales (inhibición del complejo I y aumento en la producción de superóxido), quercetina no fue capaz de proteger por completo frente al aumento en el tenor oxidativo inducido por piroxicam y diclofenaco; los dos AINEs que causaron un mayor efecto inhibitorio sobre el complejo I y que elevaron en mayor medida los parámetros oxidativos mencionados. Lo anterior podría deberse a la diferencia en los tiempos de ensayo entre los parámetros mitocondriales y aquellos que se evidencian a nivel celular, así como a las diferencias que existen entre quercetina y los AINEs en cuanto a sus cinéticas de absorción. Como se mencionó anteriormente, quercetina se acumula rápida y eficazmente en mitocondrias (Biasutto et al. 2010; Fiorani et al. 2010), lo que llevaría a que su concentración intramitocondrial máxima se alcance al poco tiempo de su adición al medio extracelular;

de acuerdo a lo aquí planteado, los AINEs no serían tan rápidamente incorporados al espacio intra-mitocondrial y su concentración máxima tardaría más en alcanzarse. Esta diferencia de concentraciones permitiría que quercetina sea más eficaz en prevenir los efectos de los AINEs a tiempos cortos (10 - 20 minutos) que a tiempos mayores (60 minutos), y a tiempos mayores, sería relativamente menos eficaz para contraponer la acción de aquellos AINEs que se muestran más potentes. Sin perjuicio de lo anterior, quercetina fue capaz de proteger por completo frente a la disminución en la viabilidad celular observada al incubar células Caco-2 con cada uno de los AINEs estudiados. La diferencia en la efectividad de quercetina para proteger frente a dicha disminución, comparada con aquella observada para proteger frente al aumento en el tenor oxidativo celular, podría dar cuenta de otros efectos protectores de quercetina, no relacionados con una disminución en el tono oxidativo general de las células, pero si importantes en el mantenimiento de la viabilidad celular.

Los resultados arriba descritos apuntan a quercetina como un eficaz protector contra los efectos mitocondriales y oxidativos inducidos por AINEs, tanto sobre mitocondrias aisladas de epitelio duodenal como sobre células Caco-2 en cultivo. Lo anterior permitiría postular al mencionado flavonoide como un potencial protector frente a los efectos gastrointestinales que presentan individuos que consumen AINEs de forma continuada. Sin embargo existe también evidencia de que altas concentraciones de quercetina (1 o 2 órdenes de magnitud mayores que las que resultan efectivas para proteger frente a la inhibición del complejo I) podrían inducir un aumento en la producción de superóxido, así como aumentar la permeabilidad de la mitocondria (De Marchi et al. 2008). Por lo tanto es importante extender las investigaciones sobre el potencial de quercetina como protector frente al efecto nocivo de los AINEs a modelos de mayor complejidad.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos destinados a entender el mecanismo inhibitorio de los AINEs sobre el complejo I, y en aquellos destinados a

estudiar la capacidad de quercetina para proteger frente a dicha inhibición, el efecto protector de quercetina implicaría una competencia entre dicho flavonoide y cada uno de los AINEs por el sitio de unión del complejo I con coenzima Q. Ante esto resultó particularmente interesante nuestro estudio acerca de ¿por qué, de desplazar la unión entre los AINEs y el complejo I, quercetina termina restaurando la actividad enzimática de dicho complejo?

Para explicar lo anterior se postula que tras desplazar a los AINEs desde su sitio de unión (coenzima Q), quercetina: (1) dejaría libre dicho sitio para que la coenzima Q actúe como aceptor de los electrones provenientes del NADH; (2) estaría actuando como “mimético de coenzima Q”, es decir como una molécula capaz de aceptar los electrones cedidos por NADH al complejo I sin perjuicio de la presencia de coenzima Q en el entorno de su sitio de unión (milieu). En ambos casos, la co-presencia de quercetina y coenzima Q no supone una limitación para que se recupere la actividad basal del complejo I, aún en presencia del AINE. De ser el segundo caso (2) el mecanismo que subyace a la acción protectora de quercetina contra la inhibición del complejo I inducida por los AINEs, es preciso postular que quercetina no solo actuaría como aceptor de los electrones captados por el complejo I desde el NADH, sino además como donante de dichos electrones al complejo III, dándole continuidad al ciclo de óxido-reducción de la cadena de transporte de electrones en lo que respecta a estos complejos. Con el fin de evaluar si quercetina cumplía tal rol como mimético de coenzima Q, esto es, como aceptor de electrones, se realizaron inicialmente experimentos en los que se midió la actividad del complejo I en mitocondrias aisladas de epitelio duodenal, en ausencia de coenzima Q, pero en presencia de quercetina. Sorprendentemente, se observó que en ausencia de coenzima Q, quercetina, en forma concentración-dependiente, fue *per se* capaz de restaurar la actividad del complejo I, perdida tras la remoción de la coenzima Q del medio de reacción.

Si bien a nivel del efecto de AINEs la actividad mimética de quercetina en el complejo I es relevante, fue preciso comprobar si dicha actividad implica también la capacidad de quercetina de ceder al complejo III el o los electrones captados a nivel del complejo I. Esta interrogante fue abordada en los experimentos en que se ensayó la capacidad de quercetina como “electron carrier” entre el complejo I y el complejo III en mitocondrias aisladas. Los resultados de tales experimentos dan cuenta que, en ausencia de coenzima Q, quercetina permite efectivamente recuperar la actividad de transporte de electrones en el sistema complejo I - Complejo III; dicha recuperación fue efectiva a una concentración de 5  $\mu\text{M}$  y completa a una concentración 10  $\mu\text{M}$ . Estos resultados implican que quercetina no solo es capaz de aceptar electrones a nivel del complejo I, sino que además es capaz de donar dichos electrones al complejo III. Es preciso destacar que quercetina por si sola, esto es sin una previa reducción en el complejo I, no es capaz de entregar electrones al complejo III, lo que se evidenció al no observar reducción de citocromo c en ausencia de NADH en el medio de incubación de las mitocondrias. Para completar los estudios sobre la capacidad de quercetina para actuar como “coenzima Q mimético”, se realizaron ensayos destinados a medir el consumo de oxígeno, como un parámetro del funcionamiento global de la CTE. Respecto a un control en ausencia de coenzima Q (control negativo), la adición de quercetina permitió, e incrementó en función de su concentración, el consumo de oxígeno a nivel mitocondrial, llegando para una concentración 10  $\mu\text{M}$ , a niveles comparables con aquellos observados en mitocondrias incubadas con 65  $\mu\text{M}$  de coenzima Q.

En su conjunto, los resultados expuestos no solo dan cuenta de un posible mecanismo mediante el cual los AINEs inducirían toxicidad mitocondrial y celular, sino además, basado en la propuesta del rol que supone, en dichas formas de toxicidad, la inhibición del complejo I, la presente investigación presenta antecedentes experimentales acerca del potencial mecanismo que subyacería a una acción gastro-protectora de quercetina.

Esto último se desprende de la evidencia aquí ofrecida en torno a la capacidad que tiene quercetina, no solo para prevenir la inhibición del complejo I inducida por los AINEs y sus consecuencias oxidativas a nivel mitocondrial y celular, sino para asegurar, a través de una acción “mimética de coenzima Q”, la continuidad del flujo de electrones a través de la cadena de transporte de electrones mitocondrial.



## 7 CONCLUSIONES

---

Los resultados obtenidos en la presente tesis muestran que los AINEs testeados, indometacina, diclofenaco, piroxicam, ibuprofeno y aspirina, todos son capaces y efectivos para inhibir el complejo I, tanto en mitocondrias aisladas de epitelio duodenal de rata como en mitocondrias aisladas de células Caco-2 expuestas a dichos agentes. Los AINEs además inducen un aumento en la producción de superóxido mitocondrial, tras la exposición de mitocondrias aisladas o de células Caco-2 a los mencionados agentes. Adicionalmente, en células Caco-2, los AINEs inducen un aumento en el tenor oxidativo, así como una disminución en la viabilidad celular.

Desde un punto de vista mecanístico, se estableció que la inhibición del complejo I inducida por AINEs es competitiva y reversible por la adición de coenzima Q, vinculando la inhibición referida con un efecto de los AINEs a nivel del sitio de unión de dicha coenzima en el complejo I.

Se estableció, además, que quercetina se comporta como un eficaz protector frente a la inhibición del complejo I inducida por AINEs, tanto en mitocondrias aisladas como en células Caco-2. Dicho efecto protector se observa al adicionar quercetina en forma conjunta con los AINEs. Quercetina es también capaz de proteger frente al aumento en la producción de superóxido mitocondrial, observado al exponer mitocondrias aisladas o células Caco-2 a cada uno de los AINEs testeados. Quercetina protege además células Caco-2 expuestas a AINEs frente al aumento en el tenor oxidativo inducido por dichos agentes.

Desde un punto de vista mecanístico, quercetina ejerce su efecto protector frente a la inhibición del complejo I inducida por AINEs a través de una acción que supondría competir y/o desplazar dichos agentes del sitio de unión de coenzima Q, y a su vez, actuar como mimético de dicha coenzima, tanto a nivel del complejo I (aceptando

electrones) como a nivel del complejo III (donando dichos electrones). Lo anterior permite recuperar la continuidad de la CTE perdida en condiciones de exposición a AINEs, así como otra condición que suponga una limitada disponibilidad de coenzima Q en el medio mitocondrial.

## PROYECCIONES DE ESTUDIOS

---

Los resultados obtenidos en la presente tesis permiten postular nuevas investigaciones que contribuirán a entender aún mejor el mecanismo mediante el cual los AINEs son capaces de desencadenar un daño a nivel del tracto gastrointestinal. Dichas investigaciones podrían orientarse hacia conocer con un mayor grado de profundidad los mecanismos involucrados en la inhibición del complejo I mitocondrial inducida por los AINEs; para ello, podrían emplearse partículas sub-mitocondriales como un sistema experimental que permitiría investigar en forma más directa la interacción entre el complejo y cada una de las moléculas aquí estudiadas. Dicho sistema podría ayudar a establecer -sin las limitaciones fisicoquímicas de acceso a la mitocondria- tanto el mecanismo de acción, como las potencias con que los AINEs inhiben el complejo I, y la Coenzima Q y quercetina protegen contra dicha inhibición. Otra proyección interesante supondría el estudio de la capacidad de cada uno de los AINEs y de quercetina para insertarse en el microambiente de la membrana interna de la mitocondria (lipofilia y concentración efectiva en dicha membrana), lugar en el cual ocurriría la postulada inhibición del complejo I. Adicionalmente, para entender el efecto protector que tiene quercetina frente a la inhibición del complejo I, resultaría de particular interés disponer de datos que permitan comparar los potenciales de óxido-reducción de coenzima Q y de quercetina (para sus respectivos grupos carbonilo), con el fin de reforzar la hipótesis de que dicho polifenol actuaría como un mimético de coenzima Q, tanto a nivel del complejo I como a nivel del complejo III de la CTE mitocondrial. Así mismo, el estudio de los efectos de quercetina en la actividad de los complejos I y III de la CTE, en modelos experimentales de ausencia total de coenzima Q, resultaría relevante para entender mejor el posible rol mimético de coenzima Q que podría cumplir quercetina, no solo frente a la inhibición del complejo I inducida por AINEs, sino en cualquier

condición, sea fisiológica o patológica, en la que los niveles, el efecto o la función de la mencionada coenzima se vean alterados.

Con el objetivo de entender mejor las consecuencias oxidativas que resultarían de la postulada inhibición del complejo I inducida por AINEs, sería interesante también realizar estudios de producción de superóxido mitocondrial en presencia de concentraciones saturantes de ambos sustratos del complejo I (NADH y coenzima Q), para evaluar el efecto de la inhibición del complejo sobre la producción de superóxido en condiciones de funcionamiento ideal de la CTE. Adicionalmente sería de gran interés diseñar estrategias que permitan estudiar de mejor manera el efecto protector de quercetina frente al daño oxidativo y a la merma en la viabilidad celular observados tras incubar células Caco-2 con cada uno de los AINEs estudiados.

## REFERENCIAS

---

- Alarcón de la Lastra C., Martín M. J., Motilva V., Antiulcer and gastroprotective effects of quercetin: a gross and histologic study, *Pharmacology*, 1994, 48: 56-62.
- Andreyev A. Y., Kushnareva Y. E., Starkov A. A., Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species, *Biochemistry (Mosc)*, 2005, 70(2): 200-14.
- Basavarajaiah S, Sigston P., Budack K., Severe salicylate poisoning treated conservatively, *J R Soc Med*, 2004, 97: 587-8.
- Benov L., Szejnberg L., Fridovich I., Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical, *Free Radic Biol Med.*, 1998, 25(7): 826-31.
- Biasutto L., Sassi N., Mattarei A., Marotta E., Cattelan P., Toninello A., Garbisa S., Zoratti M., Paradisi C., Impact of mitochondriotropic quercetin derivatives on mitochondria, *Biochim Biophys Acta*. 2010, 1797(2): 189-96.
- Birch-Machin M. A., Briggs H. L., Saborido A. A., Bindoff L. A., Turnbull D. M., An evaluation of the measurement of the activities of complexes I-IV in the respiratory chain of human skeletal muscle mitochondria, *Biochem Med Metab Biol.*, 1994, 51(1): 35-42.
- Bradford M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem.*, 1976, 72:248-54.
- Brand M. B., Esteves T. C., Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3, *Cell Metabolism*, 2005, 2: 85-93.
- Brand M. D., The sites and topology of mitochondrial superoxide production, *Exp Gerontol.*, 2010, 45(7-8): 466-72
- Brown D.C., Savage J.M., Therapeutic aspirine overdose in a three year old boy, *The Ulster Medical Journal*, 1987, 56(1): 63-5.
- Brun J., Jones R., Nonsteroidal anti-inflammatory drug-associated dyspepsia: the scale of the problem, *Am J Med.*, 2001, 110(1A): 12S-13S.
- Cadenas E., Boveris A., Ragan C. I., Stoppani A. O., Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria, *Arch Biochem Biophys.*, 1977, 180(2): 248-57
- Carrasco-Pozo C., Gotteland M., Speisky H., Protection by apple peel polyphenols against indometacin-induced oxidative stress, mitochondrial damage and cytotoxicity in Caco-2 cells, *J Pharm Pharmacol.*, 2010, 62(7): 943-50.

- Carrasco-Pozo C., Speisky H., Brunser O., Pastene E., Gotteland M., Apple Peel Polyphenols Protect against Gastrointestinal Mucosa Alterations Induced by Indomethacin in Rats, *J Agric Food Chem.*, 2011, 59(12): 6459-66.
- Chattopadhyay I., Bandyopadhyay U., Biswas K., Maity P., Banerjee R. K., Indomethacin inactivates gastric peroxidase to induce reactive-oxygen-mediated gastric mucosal injury and curcumin protects it by preventing peroxidase inactivation and scavenging reactive oxygen, *Free Radic Biol Med.*, 2006, 40(8): 1397-408.
- Chaudière J., Ferrari-Iliou R., Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms, *Food Chem Toxicol.*, 1999, 37(9-10): 949-62.
- Chen Y., McMillan-Ward E., Kong J., Israels S. J., Gibson S. B., Mitochondrial electron-transport-chain inhibitors of complexes I and II induce autophagic cell death mediated by reactive oxygen species, *J Cell Sci.*, 2007, 120(Pt 23): 4155-66.
- Cooper C.E., Brown G.C., The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance, *J Bioenerg Biomembr.*, 2008, 40(5): 533-9.
- Crane F. L., Biochemical functions of coenzyme Q10, *J Am Coll Nutr.*, 2001, 20(6): 591-8.
- De Marchi U., Biasutto L., Garbisa S., Toninello A., Zoratti M., Quercetin can act either as an inhibitor or an inducer of the mitochondrial permeability transition pore: A demonstration of the ambivalent redox character of polyphenols, *Biochim Biophys Acta.*, 2009, 1787(12): 1425-32.
- Degli Esposti M., Ghelli A., Ratta M., Cortes D., Estornell E., Natural substances (acetogenins) from the family Annonaceae are powerful inhibitors of mitochondrial NADH dehydrogenase (Complex I), *Biochem J.*, 1994, 301(1): 161-7.
- Dey I., Lejeune M., Chadee K., Prostaglandin E<sub>2</sub> receptor distribution and function in the gastrointestinal tract, *Br J Pharmacol.*, 2006, 149: 611–23.
- Dorta D. J., Pigoso A. A., Mingatto F. E., Rodrigues T., Pestana C. R., Uyemura S. A., Santos A. C., Curti C., Antioxidant activity of flavonoids in isolated mitochondria, *Phytother Res.*, 2008, 22(9): 1213-8.
- Duchen M. R., Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology, *Molecular Aspects of Medicine*, 2004, 25: 365–451.
- Fato R., Bergamini C., Bortolus M., Maniero A. L., Leoni S., Ohnishi T., Lenaz G., Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species, *Biochim Biophys Acta.*, 2009, 1787(5): 384-92.
- Fiorani M., Guidarelli A., Blasa M., Azzolini C., Candiracci M., Piatti E., Cantoni O., Mitochondria accumulate large amounts of quercetin: prevention of mitochondrial damage and release upon oxidation of the extramitochondrial fraction of the flavonoid, *J Nutr Biochem.* 2010, 21(5): 397-404.
- Fisher A.B., Redox signaling across cell membranes, *Antioxid Redox Signal.*, 2009, 11(6): 1349-56.
- Gledhill J. R., Walker J. E., Inhibitors of the catalytic domain of mitochondrial ATP synthase, *Biochem Soc Trans.*, 2006, 34(Pt 5): 989-92.

- Halestrap A., Biochemistry: a pore way to die, *Nature*, 2005, 434(7033): 578-9.
- Harris D. A., Das A. M., Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart, *Biochem J.* 1991, 280 (3):561-73.
- He Y., Leung K. W., Zhang Y. H., Duan S., Zhong X. F., Jiang R. Z., Peng Z., Tombran-Tink J., Ge J., Mitochondrial complex I defect induces ROS release and degeneration in trabecular meshwork cells of POAG patients: protection by antioxidants, *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 2008, 49(4): 1447-58.
- Hong S., Pedersen P.L., ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas, *Microbiol Mol Biol Rev.*, 2008, 72(4): 590-641.
- Janssen A., Trijbels F., Sengers R., Smeitink J., van den Heuvel L., Wintjes L., Stoltenberg-Hogenkamp B., Rodenburg R., Spectrophotometric assay for complex I of the respiratory chain in tissue samples and cultured fibroblasts, *Clinical Chemistry*, 2007, 53(4): 729-34.
- Jewess P.J., Insecticides and acaricides which act at the rotenone-binding site of mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase; competitive displacement studies using a 3H-labelled rotenone analogue, *Biochem Soc Trans.*, 1994, 22(1): 247-51.
- Jomova K., Valko M., Advances in metal-induced oxidative stress and human disease, *Toxicology*, 2011, 283(2-3): 65-87.
- Jones D. P., Go Y. M., Redox compartmentalization and cellular stress, *Diabetes Obes Metab.*, 2010, 12 Suppl 2: 116-25.
- Kohli M., Yu J., Seaman C., Bardelli A., Kinzler K. W., Vogelstein B., Lengauer C., Zhang L., SMAC/Diablo-dependent apoptosis induced by nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) in colon cancer cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(48): 16897-902.
- Kowaltowski A. J., Castilho R. F., Vercesi A. E., Mitochondrial permeability transition and oxidative stress, *FEBS Letters*, 2001, 495: 12-5.
- Lambert A. J., Brand M. D., Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I), *J Biol Chem.*, 2004a, 279(38): 39414-20.
- Lambert A. J., Brand M. D., Superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane, *Biochem. J.*, 2004b, 382: 511-7
- Langman M. J., Weil J., Wainwright P., Lawson D. H., Rawlins M. D., Logan R. F., Murphy M., Vessey M. P., Colin-Jones D. G., Risks of bleeding peptic ulcer associated with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs, *Lancet.*, 1994, 343(8905): 1075-8.
- Lee J. H., Kim G. H., Evaluation of antioxidant and inhibitory activities for different subclasses flavonoids on enzymes for rheumatoid arthritis, *J Food Sci.*, 2010, 75(7): H212-7.
- Linsinger G., Wilhelm S., Wagner H., Häcker G., Uncouplers of oxidative phosphorylation can enhance a Fas death signal, *Mol Cell Biol.*, 1999, 19(5): 3299-311.

- Mahakunakorn P., Tohda M., Murakami Y., Matsumoto K., Watanabe H., Antioxidant and free radical-scavenging activity of Choto-san and its related constituents, *Biol Pharm Bull.*, 2004, 27: 38-46.
- Mahmud T., Scott D. L., Bjarnason I., A unifying hypothesis for the mechanism of NSAID related gastrointestinal toxicity, *Ann Rheum Dis.*, 1996a, 55(4): 211-3.
- Mahmud T., Rafi S. S., Scott D. L., Wrigglesworth J. M., Bjarnason I., Nonsteroidal antiinflammatory drugs and uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation, *Arthritis Rheum.*, 1996b, 39(12): 1998-2003.
- Maity P., Bindu S., Dey S., Goyal M., Alam A., Pal C., Mitra K., Bandyopadhyay U., Indomethacin, a non-steroidal anti-inflammatory drug, develops gastropathy by inducing reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathology and associated apoptosis in gastric mucosa: a novel role of mitochondrial aconitase oxidation. *J. Biol. Chem.*, 2009, 284: 3058-68.
- Masubuchi Y., Nakayama S., Horie T., Role of mitochondrial permeability transition in diclofenac-induced hepatocyte injury in rats, *Hepatology*, 2002, 35(3): 544-51.
- Matsuno-Yagi A., Hatefi Y., Ubiquinol:cytochrome c oxidoreductase (complex III). Effect of inhibitors on cytochrome b reduction in submitochondrial particles and the role of ubiquinone in complex III, *J Biol Chem.*, 2001, 276(22): 19006-11.
- Matsuzaki S., Szweda L. I., Humphries K. M., Mitochondrial superoxide production and respiratory activity: biphasic response to ischemic duration, *Arch Biochem Biophys.*, 2009, 484(1): 87-93.
- Miyadera H., Shiomi K., Ui H., Yamaguchi Y., Masuma R., Tomoda H., Miyoshi H., Osanai A., Kita K., Omura S., Atpenins, potent and specific inhibitors of mitochondrial complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(2): 473-7.
- Mukhopadhyay P., Rajesh M., Yoshihiro K., Haskó G., Pacher P., Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells, *Biochem Biophys Res Commun.*, 2007, 358(1): 203-8.
- Murphy M. P., How mitochondria produce reactive oxygen species, *Biochem J.* 2009, 417(1): 1-13.
- O'Donnell V. B., Spycher S., Azzi A., Involvement of oxidants and antioxidant-generating enzyme(s) in tumor-necrosis-alpha-mediated apoptosis: role for lipoxygenase but not mitochondrial respiratory chain, *Biochem J.*, 1995, 310: 133-41.
- Ong C. K., Lirk P., Tan C. H., Seymour R. A., An evidence-based update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs, *Clin Med Res.*, 2007, 5(1): 19-34.
- Papa S., Sardanelli A. M., Scacco S., Petruzzella V., Technikova-Dobrova Z., Vergari R., Signorile A., The NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) of the mammalian respiratory chain and the cAMP cascade, *J Bioenerg Biomembr.*, 2002, 34(1): 1-10.
- Patel P, Mandal B., Greenway M. W., Hyperkalaemic quadripareisis secondary to chronic diclofenac treatment, *Postgrad Med J*, 2001, 77: 50-51.
- Pedersen P. L., Amzel L. M., ATP synthases. Structure, reaction center, mechanism, and regulation of one of nature's most unique machines, *J Biol Chem.* 1993, 268(14): 9937-40.



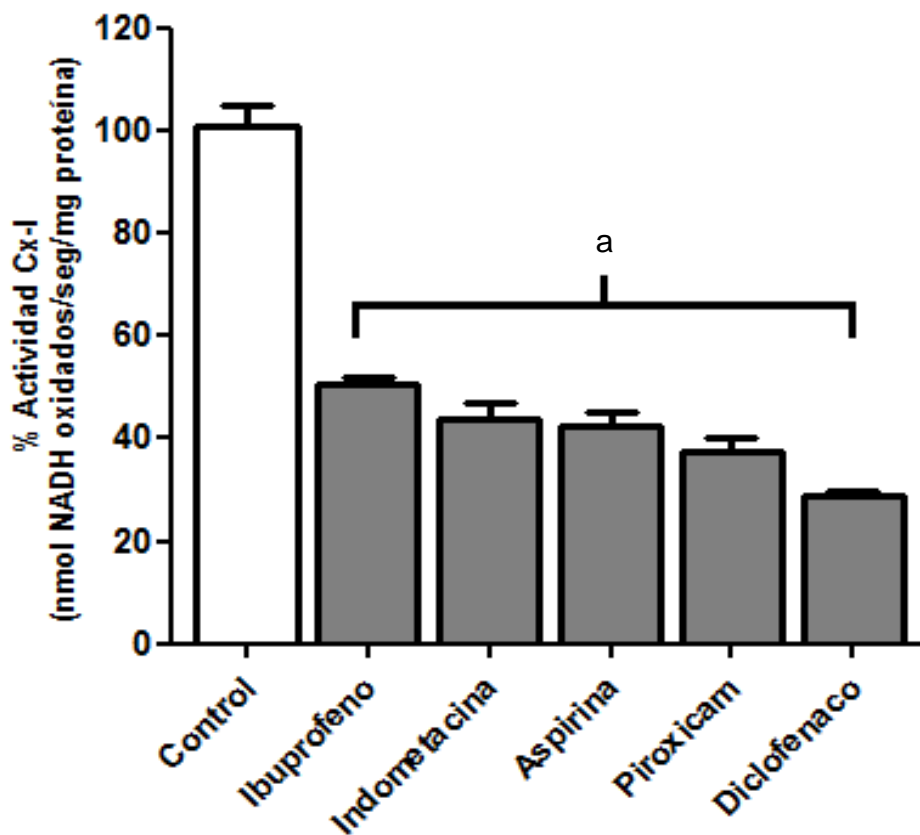
- Petrosillo G., Ruggiero F. M., Paradies G., Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome c from mitochondria, *FASEB J.*, 2003, 17(15): 2202-8.
- Poyton R. O., Ball K. A., Castello P. R., Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signalling, *Trends Endocrinol Metab.*, 2009, 20(7): 332-40.
- Rao P. N., Knaus E.E., Evolution of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): Cyclooxygenase (COX) Inhibition and Beyond, *J Pharm Pharmaceut Sci.*, 2008, 11 (2): 81s-110s.
- Richardson J. R., Quan Y., Sherer T. B., Greenamyre J. T., Miller G. W., Paraquat neurotoxicity is distinct from that of MPTP and rotenone, *Toxicol Sci.*, 2005, 88(1): 193-201.
- Royall J. A., Ischiropoulos H., Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cultured endothelial cells, *Arch Biochem Biophys.*, 1993, 302(2): 348-55.
- Sánchez S., Martín M. J., Ortiz P., Motilva V., Alarcón de la Lastra C., Effects of dipyrone on inflammatory infiltration and oxidative metabolism in gastric mucosa: comparison with acetaminophen and diclofenac, *Dig Dis Sci.*, 2002, 47(6):1389-98.
- Schapira A.H., Complex I: inhibitors, inhibition and neurodegeneration, *Exp Neurol.*, 2010, 224(2): 331-5.
- Scherz-Shouval R., Elazar Z., Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology, *Trends Biochem Sci.*, 2011 36(1): 30-8.
- Schultz B., Sunney C., Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes, *Annu Rev Biophys Biomol Struct.*, 2001, 30: 23-65.
- Sies H., Oxidative stress: oxidants and antioxidants, *Exp Physiol.*, 1997, 82(2): 291-5.
- Sivalingam N., Basivireddy J., Balasubramanian K. A., Jacob M., Curcumin attenuates indomethacin-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction, *Arch Toxicol.*, 2008, 82(7): 471-81.
- Smolinske S. C., Hall A. H., Vandenberg S. A., Spoerke D. G., McBride P. V., Toxic effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in overdose. An overview of recent evidence on clinical effects and dose-response relationships, *Drug Saf.*, 1990, 5(4): 252-74.
- Somasundaram S., Rafi S., Hayllar J., Sigthorsson G., Jacob M., Price A. B., Macpherson A., Mahmud T., Scott D., Wrigglesworth J. M., Bjarnason I., Mitochondrial damage: a possible mechanism of the "topical" phase of NSAID induced injury to the rat intestine, *Gut*, 1997; 41(3): 344-53.
- Somasundaram S., Sigthorsson G., Simpson R. J., Watts J., Jacob M., Tavares I. A., Rafi S., Roseth A., Foster R., Price A. B., Wrigglesworth J. M., Bjarnason I., Uncoupling of intestinal mitochondrial oxidative phosphorylation and inhibition of cyclooxygenase are required for the development of NSAID-enteropathy in the rat, *Aliment Pharmacol Ther.*, 2000, 14(5): 639-50.
- Somasundaram S., Simpson R., Rafi S., Shergill J. K., Bjarnason I., Wrigglesworth J., 2, 4-diamino-6-hydroxy pyrimidine inhibits NSAIDs induced nitrosyl-complex EPR signals and ulcer in rat jejunum, *BMC Gastroenterol.*, 2002, 2: 8.

- St-Pierre J., Buckingham J. A., Roebuck S. J., Brand M. D., Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain, *J Biol Chem.*, 2002, 277(47): 44784-90.
- Treberg J. R., Quinlan C. L., Brand M. D., Evidence for Two Sites of Superoxide Production by Mitochondrial NADH-Q Oxidoreductase (Complex I), *J Biol Chem.* 2011 Jun 8. [Epub ahead of print].
- Turrens J. F., Mitochondrial formation of reactive oxygen species, *J Physiol.*, 2003, 552(Pt 2): 335-44.
- Vale J. A., Meredith T. J., Acute poisoning due to non-steroidal anti-inflammatory drugs. Clinical features and management, *Med Toxicol.*, 1986, 1(1): 12-31
- Vane J. R., Bakhle Y. S., Botting R. M., Cyclooxygenases 1 and 2, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1998a, 38: 97-120.
- Vane, J. R., Botting, R. M., Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. *Inflamm. Res.*, 1998b, 47(S2): S78-S87.
- Verkhovskaya M. L., Belevich N., Euro L., Wikström M., Verkhovsky M. I., Real-time electron transfer in respiratory complex I, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(10): 3763-7.
- Villegas I., Martín M. J., La Casa C., Motilva V., Alarcón de la Lastra C., Effects of meloxicam on oxygen radical generation in rat gastric mucosa, *Inflamm Res.*, 2000, 49(7):361-6.
- Villegas I., Martín M. J., La Casa C., Motilva V., Alarcón De La Lastra C., Effects of oxicam inhibitors of cyclooxygenase on oxidative stress generation in rat gastric mucosa. A comparative study, *Free Radic Res.*, 2002, 36(7):769-77.
- Vonkeman H. E., van de Laar M. A., Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: adverse effects and their prevention, *Semin Arthritis Rheum.*, 2010, 39(4): 294-312.
- Watanabe T., Tanigawa T., Nadatani Y., Otani K., Machida H., Okazaki H., Yamagami H., Watanabe K., Tominaga K., Fujiwara Y., Arakawa T., Mitochondrial disorders in NSAIDs-induced small bowel injury, *J Clin Biochem Nutr.*, 2011, 48(2): 117-21.
- Watmough N. J., Frerman F. E., The electron transfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductases, *Biochim Biophys Acta.*, 2010, 1797(12): 1910-6.
- Wood D. M., Monaghan J.,Streete P., Jones A. L., Dargan P. I., Fatality after deliberate ingestion of sustained-release ibuprofen: a case report, *Critical Care*, 2006, 10(2): R44.
- Zhang L., Xu H., Chen C. L., Green-Church K. B., Freitas M. A., Chen Y. R., Mass spectrometry profiles superoxide-induced intra-molecular disulfide in the FMN-binding subunit of mitochondrial complex I, *J Am Soc Mass Spectrom.*, 2008, 19(12): 1875-86.
- Zickermann V., Kerscher S., Zwicker K., Tocilescu M. A., Radermacher M., Brandt U., Architecture of complex I and its implications for electron transfer and proton pumping, *Biochim Biophys Acta.*, 2009, 1787(6): 574-83.
- Zimmermann K. C., Waterhouse N. J., Goldstein J. C., Schuler M., Green D. R., Aspirin induces apoptosis through release of cytochrome c from mitochondria, *Neoplasia*, 2000, 2(6): 505-13.

## FIGURAS Y TABLAS

---

FIGURA 1

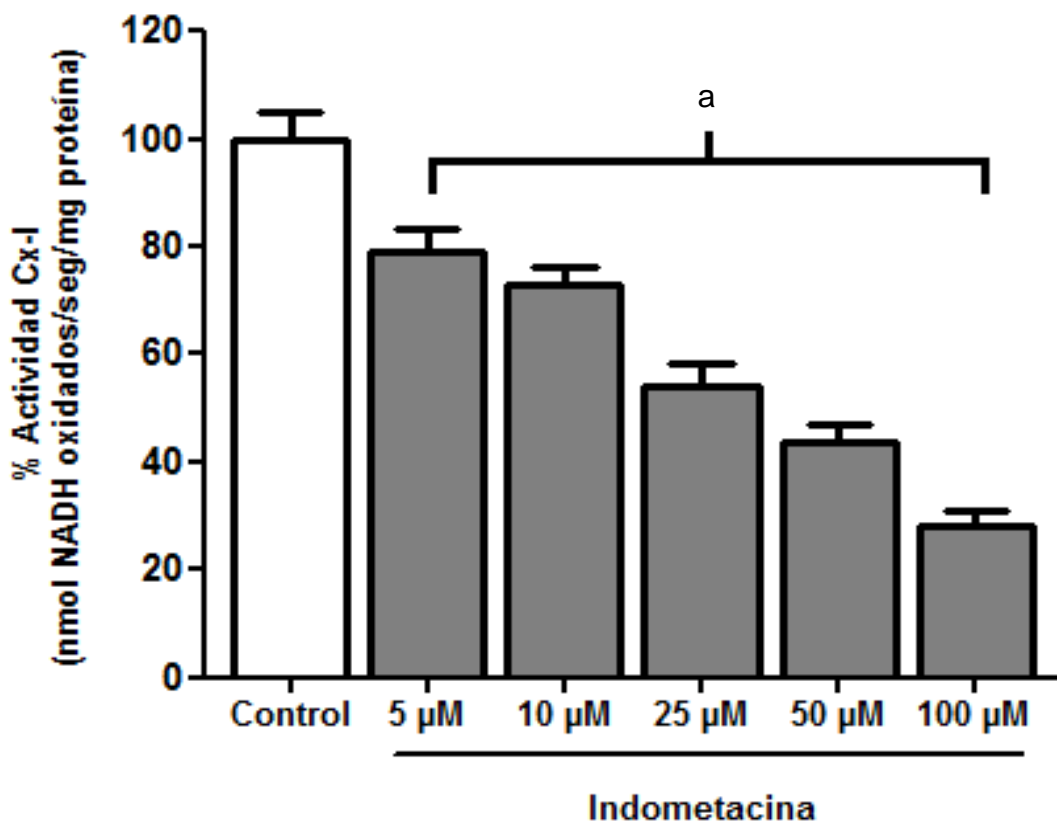


**Figura 1. Efecto de diferentes AINEs sobre la actividad del complejo I mitocondrial.**

Las mitocondrias fueron incubadas con diferentes AINEs (50  $\mu$ M) durante 10 min. previo al inicio de la reacción. La actividad del complejo I se midió mediante la oxidación de NADH a 340 nm. La actividad control corresponde a la medida en mitocondrias incubadas en ausencia de AINEs.

a:  $p < 0,001$  relativo al control.

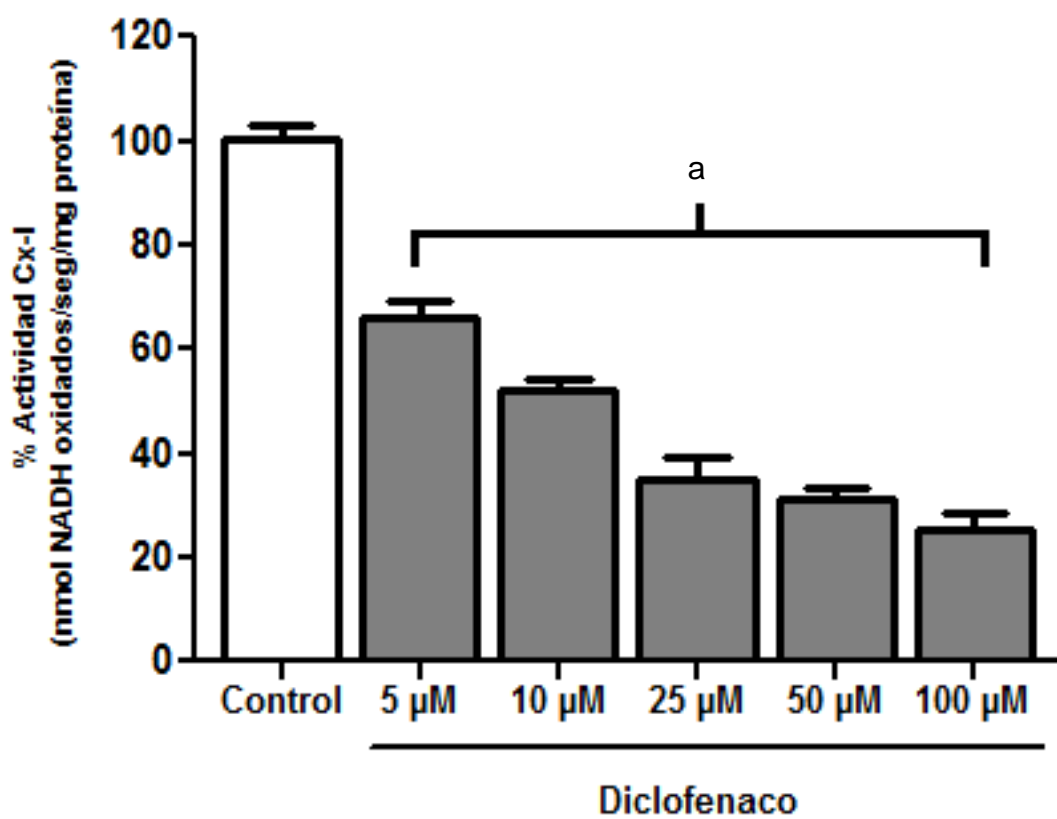
**FIGURA 2**



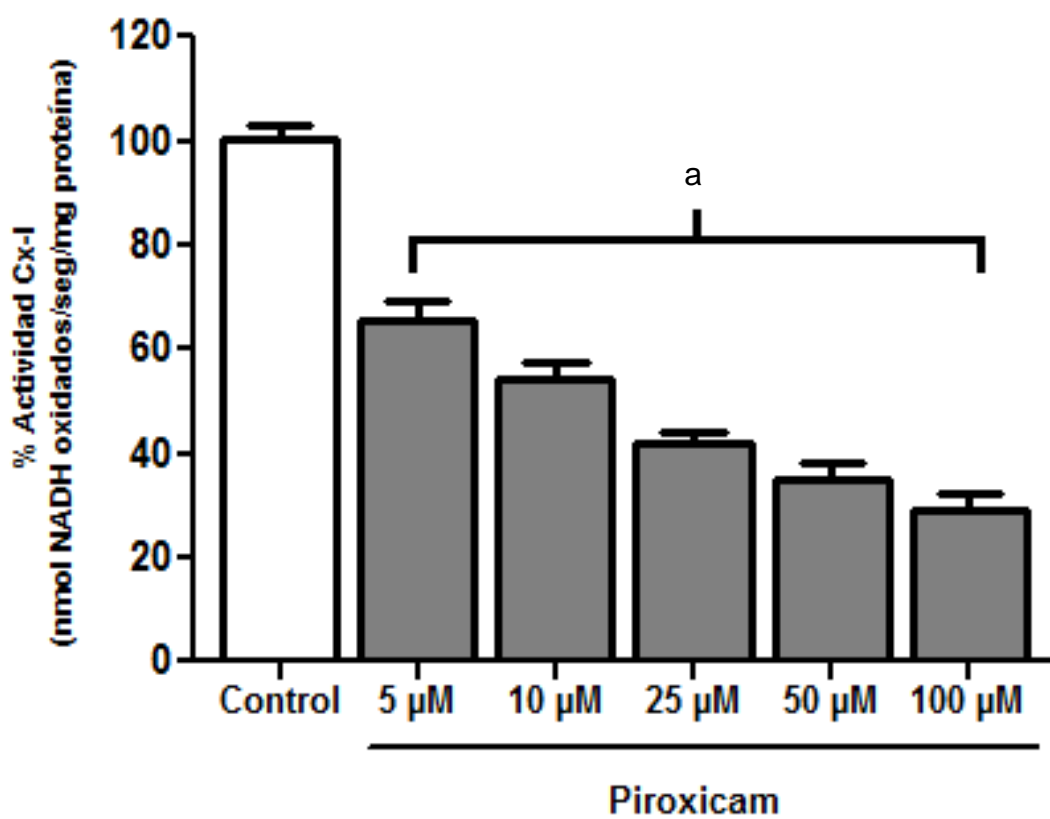
**Figura 2 (A). Efecto de indometacina sobre la actividad del complejo I.**

Concentraciones crecientes (5-100 µM) de indometacina se agregaron a mitocondrias aisladas de duodeno epitelial de rata. Luego de 10 minutos de incubación la actividad del Cx-I fue medida. El control representa la actividad del Cx-I en ausencia de AINEs.

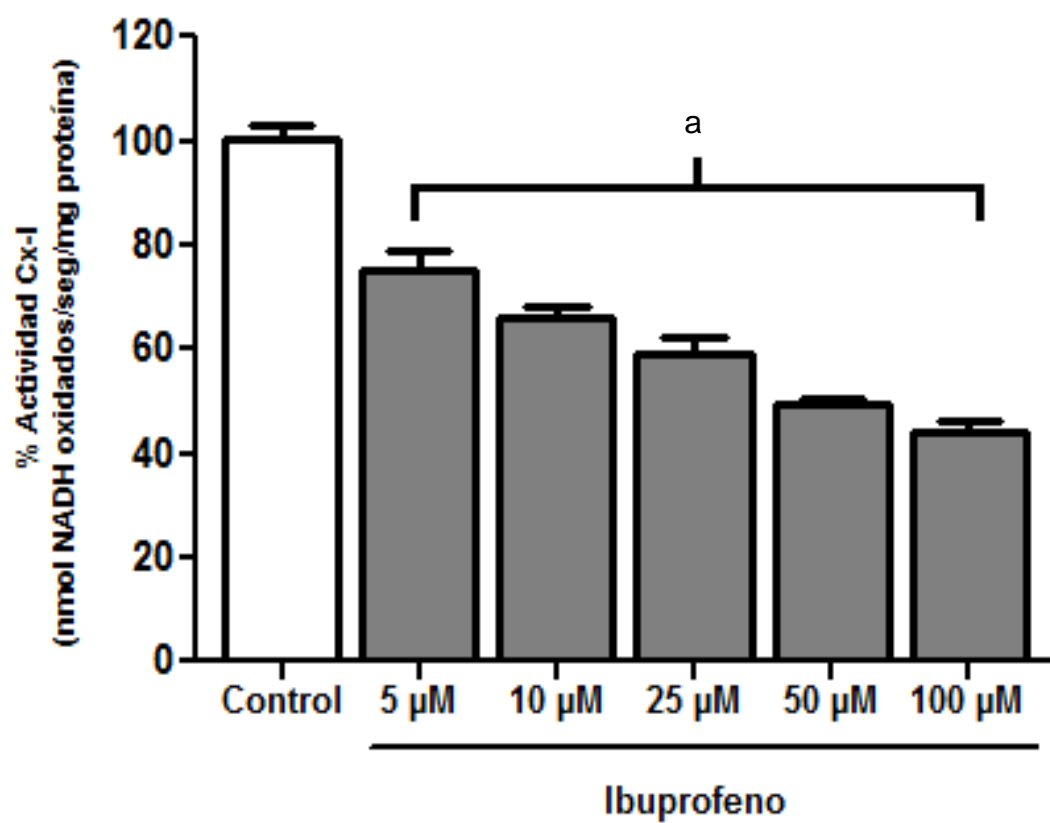
a:  $p < 0,001$  relativo al control.



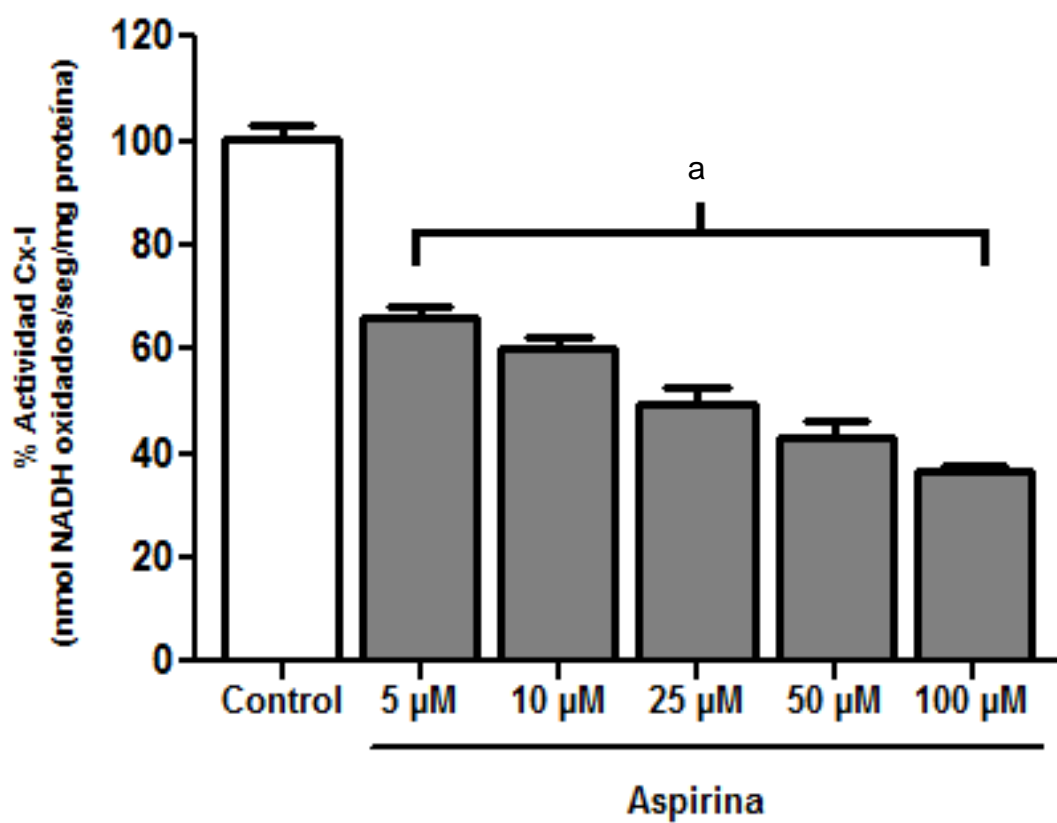
**Figura 2 (B). Efecto de diclofenaco sobre la actividad del complejo I.**  
 Se utilizó la misma metodología descrita para la figura 2 (A).  
 a:  $p < 0,001$  relativo al control.



**Figura 2 (C). Efecto de piroxicam sobre la actividad del complejo I.**  
 Se utilizó la misma metodología descrita para la figura 2 (A).  
 a:  $p < 0,001$  relativo al control.



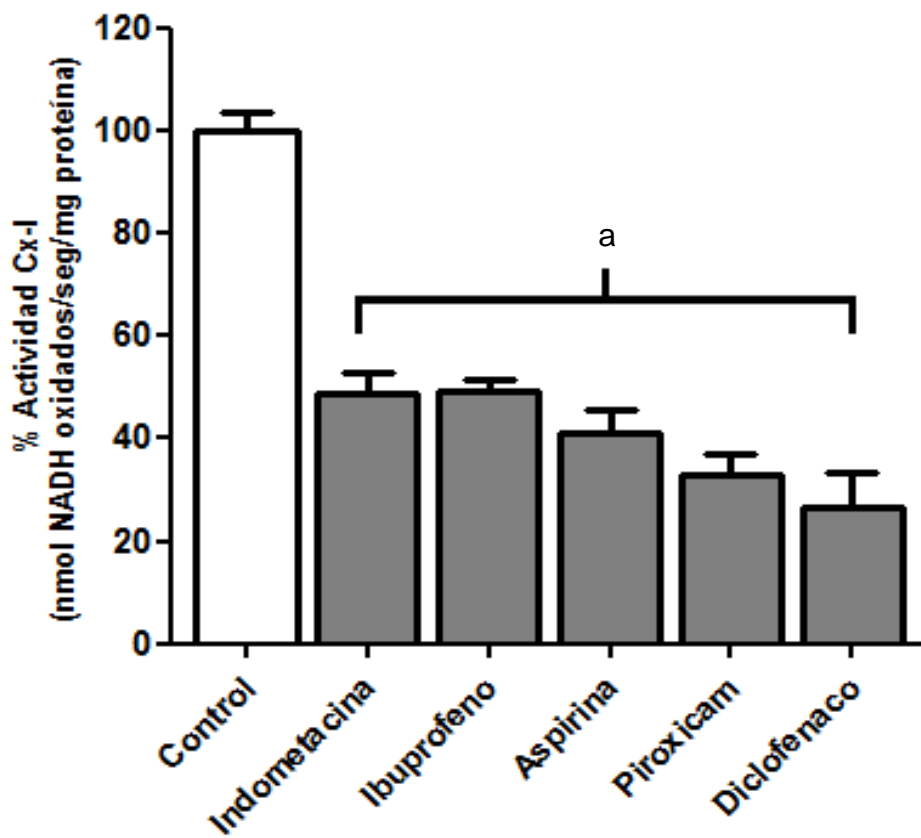
**Figura 2 (D). Efecto de ibuprofeno sobre la actividad del complejo I.**  
Se utilizó la misma metodología descrita para la figura 2 (A).  
a:  $p < 0,001$  relativo al control.



**Figura 2 (E). Efecto de aspirina sobre la actividad del complejo I.**  
 Se utilizó la misma metodología descrita para la figura 2 (A).  
 a:  $p < 0,001$  relativo al control.



**FIGURA 3**

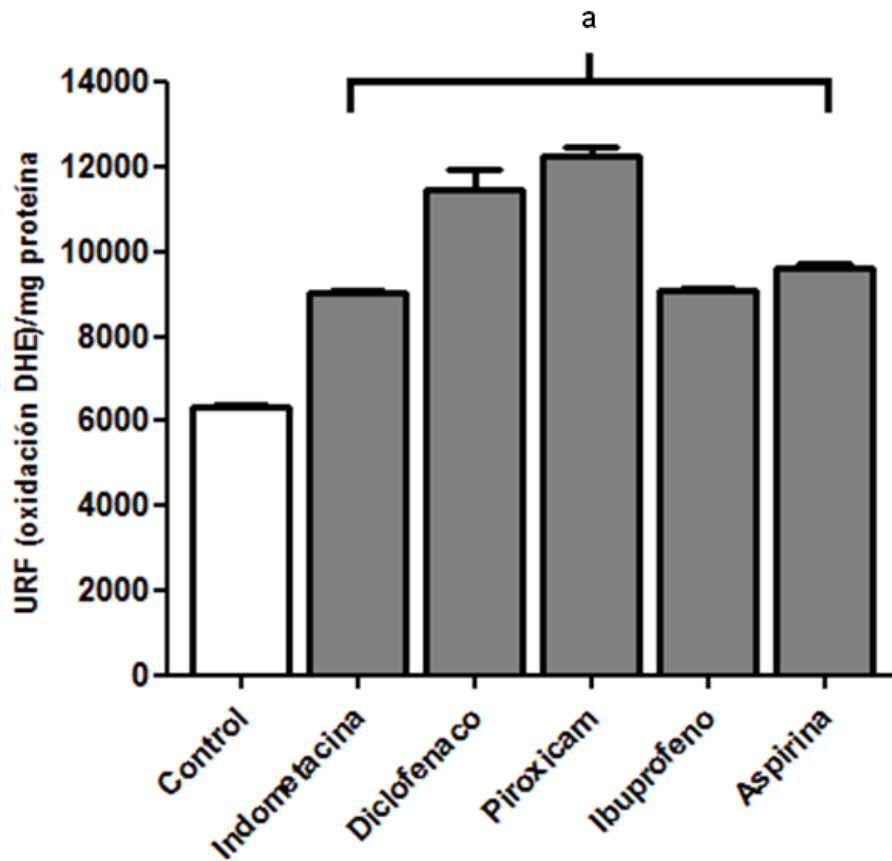


**Figura 3. Actividad del complejo I en células Caco-2 expuestas a AINEs.**

Células Caco-2 fueron expuestas a los diferentes AINEs (250  $\mu$ M) durante 10 minutos. Las mitocondrias fueron aisladas y la actividad del complejo I medida siguiendo la oxidación de NADH a 340 nm. La actividad control corresponde a células incubadas solo en presencia de vehículo

a:  $p < 0,001$  relativo al control.

**FIGURA 4**

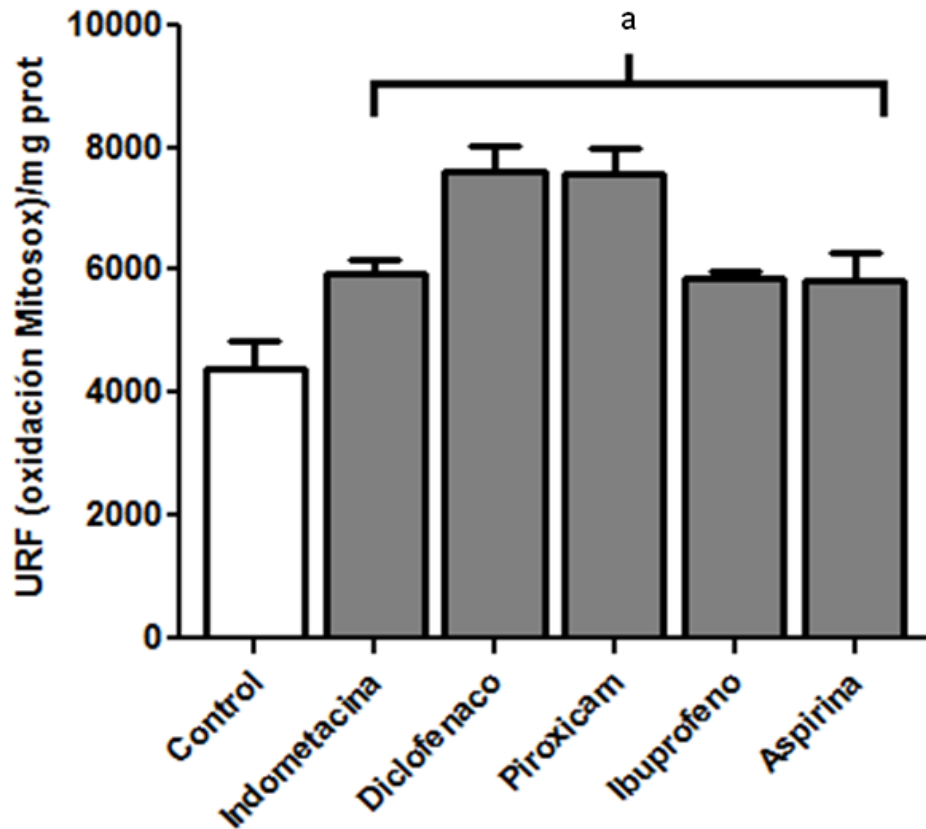


**Figura 4. Producción de superóxido en mitocondrias expuestas a AINEs.**

Mitocondrias aisladas de epitelio duodenal de rata, pre-incubadas con la sonda fluorescente DHE ( $10 \mu\text{M}$ ), fueron incubadas durante 20 minutos con diferentes AINEs ( $50 \mu\text{M}$ ). Luego de la incubación las mitocondrias fueron lisadas y la oxidación de DHE fue cuantificada mediante la medición de fluorescencia ( $470_{\text{Ex}}/590_{\text{Em}}$ ). Los resultados se expresan como unidades relativas de fluorescencia, normalizadas por los miligramos de proteína presentes en cada muestra. El control corresponde a mitocondrias incubadas solamente con el vehículo.

a:  $p < 0,001$  relativo al control.

**FIGURA 5**

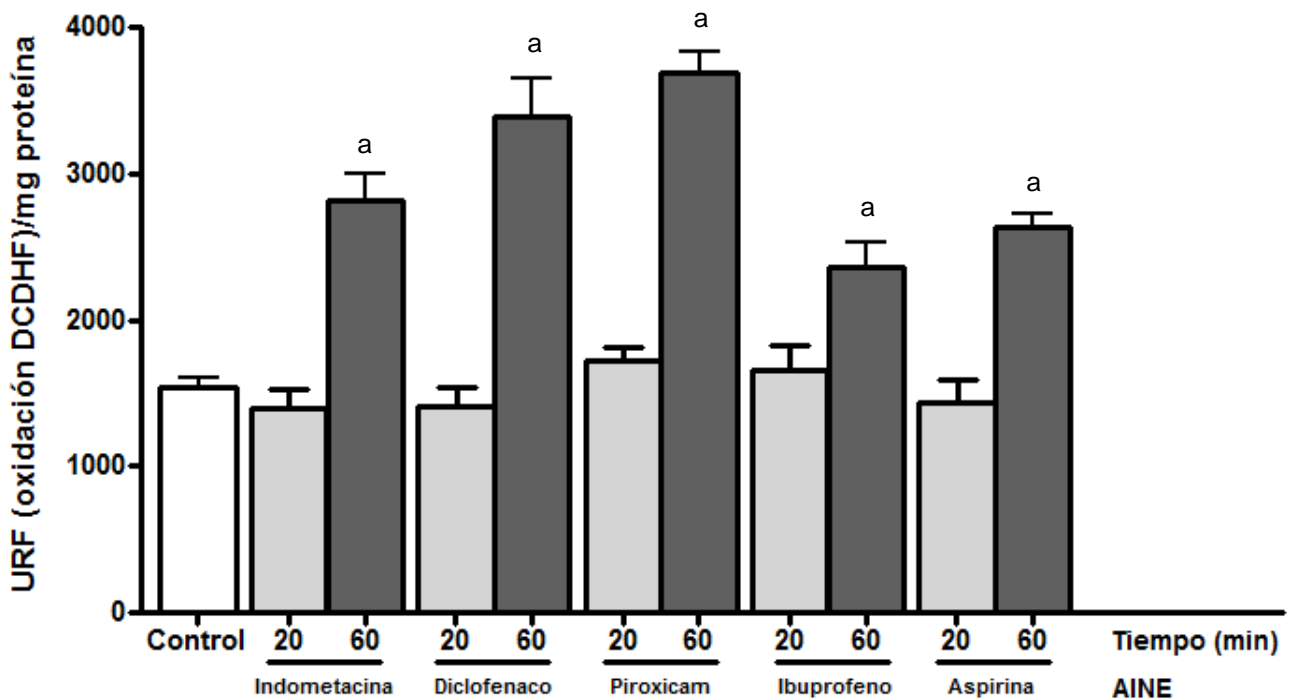


**Figura 5. Producción de superóxido mitocondrial en células Caco-2 expuestas a AINEs.**

Células Caco-2, pre-incubadas con la sonda fluorescente Mitosox ( $5 \mu\text{M}$ ), fueron incubadas durante 20 minutos con diferentes AINEs ( $250 \mu\text{M}$ ). Luego de la incubación las células fueron lisadas y la oxidación de Mitosox fue cuantificada mediante la medición de fluorescencia ( $510_{\text{Ex}}/580_{\text{Em}}$ ). Los resultados se expresan como unidades relativas de fluorescencia, normalizadas por los miligramos de proteína presentes en cada muestra. El control corresponde a células incubadas solamente con el vehículo.

a:  $p < 0,001$  relativo al control.

**FIGURA 6**

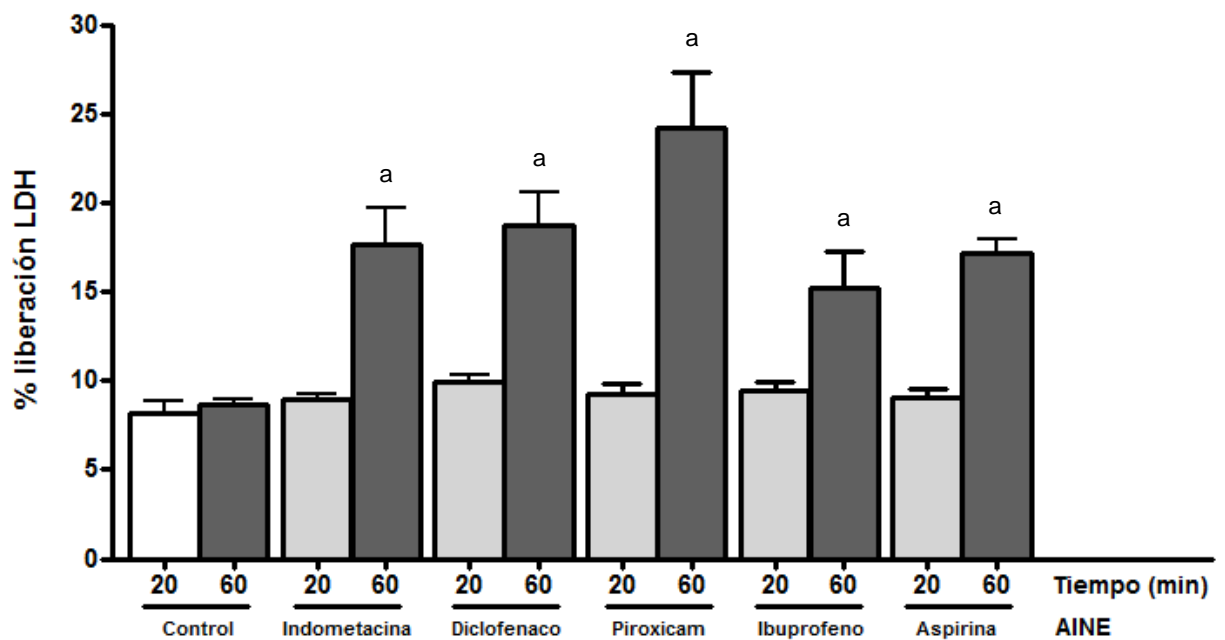


**Figura 6. Tenor oxidativo de células Caco-2 expuestas a AINEs.**

Células Caco-2, pre-incubadas con la sonda fluorescente DHDCF (50  $\mu$ M), fueron incubadas durante 20 o 60 minutos con diferentes AINEs (250  $\mu$ M). Luego de la incubación las células fueron lisadas y la oxidación de DHDCF fue cuantificada mediante la medición de fluorescencia (495<sub>Ex</sub>/520<sub>Em</sub>). Los resultados se expresan como unidades relativas de fluorescencia, normalizadas por los miligramos de proteína presentes en cada muestra. El control corresponde a células incubadas solamente con el vehículo.

a:  $p < 0,001$  relativo al control.

**FIGURA 7**



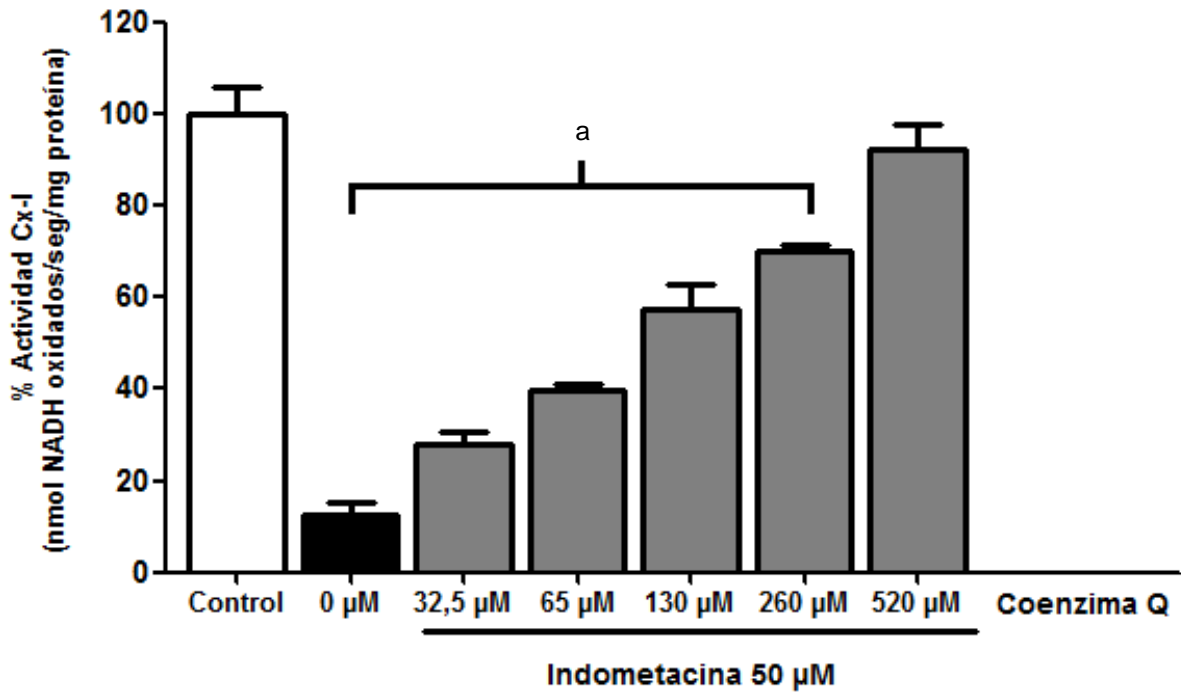
**Figura 7. Citotoxicidad de AINEs medida como liberación de LDH.**

Células Caco-2 fueron expuestas a los diferentes AINEs (250  $\mu$ M) durante 20 o 60 minutos. La cuantificación de la liberación de LDH se realizó mediante el kit “CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay”. El control corresponde a células incubadas solo con el vehículo.

Los valores se representan como un porcentaje de la liberación de LDH observada al incubar células con tritón X-100 (0.03% en PBS) por 10 minutos.

a:  $p < 0,001$  relativo al control.

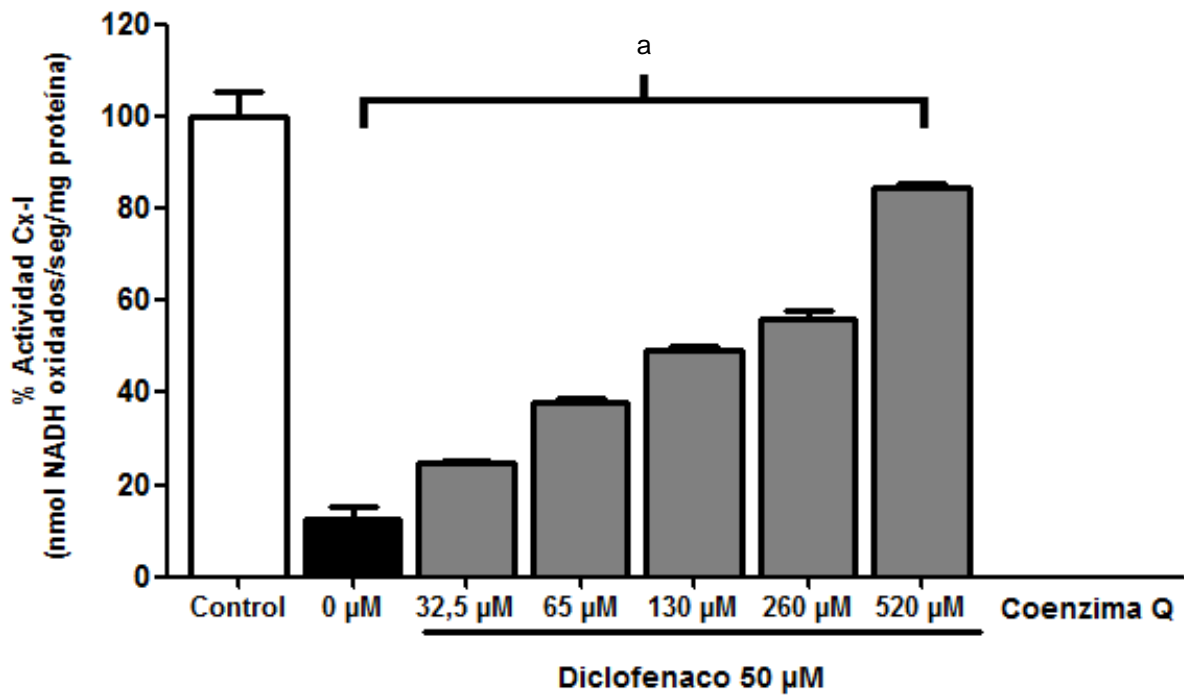
**FIGURA 8**



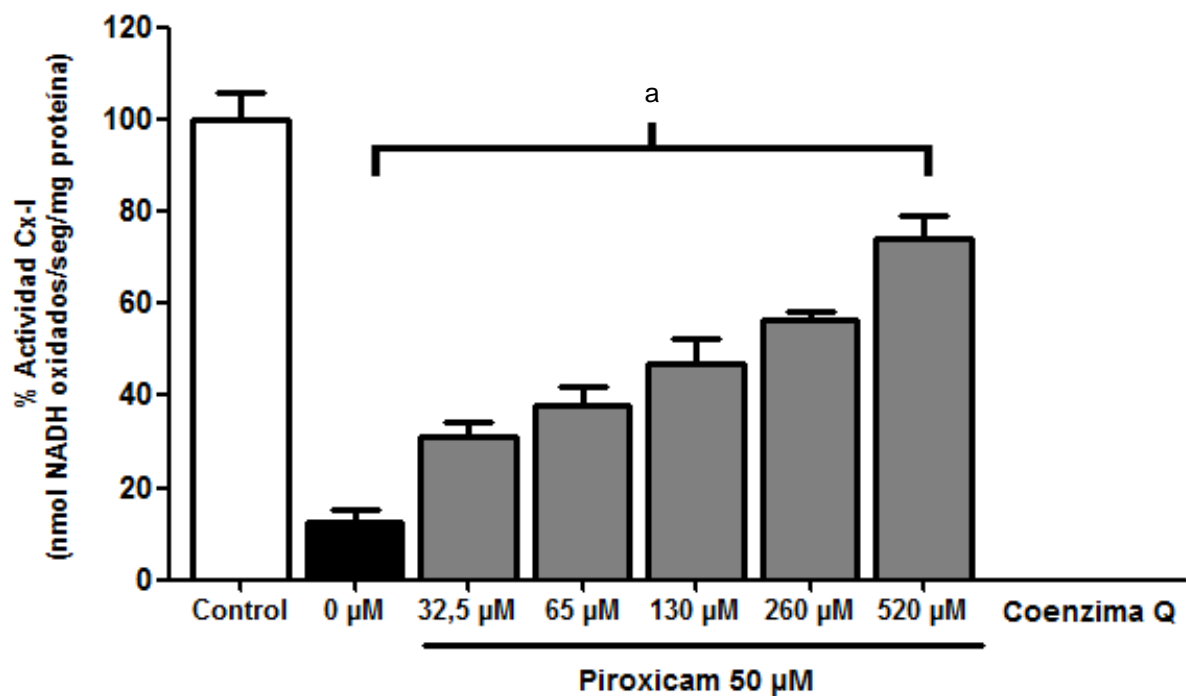
**Figura 8 (A). Efecto de co-incubación con concentraciones crecientes de coenzima Q sobre la inhibición del complejo I inducida por indometacina.**

Mitocondrias aisladas de epitelio duodenal de rata fueron co-incubadas con concentraciones crecientes de coenzima Q (32,5-520  $\mu\text{M}$ ) en presencia de diferentes AINEs (50  $\mu\text{M}$ ) por 10 minutos. La actividad del complejo I fue medida como la oxidación de NADH a 340 nm. La actividad control corresponde a mitocondrias incubadas con 65  $\mu\text{M}$  de coenzima Q en ausencia de AINEs. La actividad control del complejo I no varió al disminuir la concentración de coenzima Q a 32,5  $\mu\text{M}$  ni al aumentarla en el rango de 130 a 520  $\mu\text{M}$ .

a:  $p < 0,001$  relativo al control.

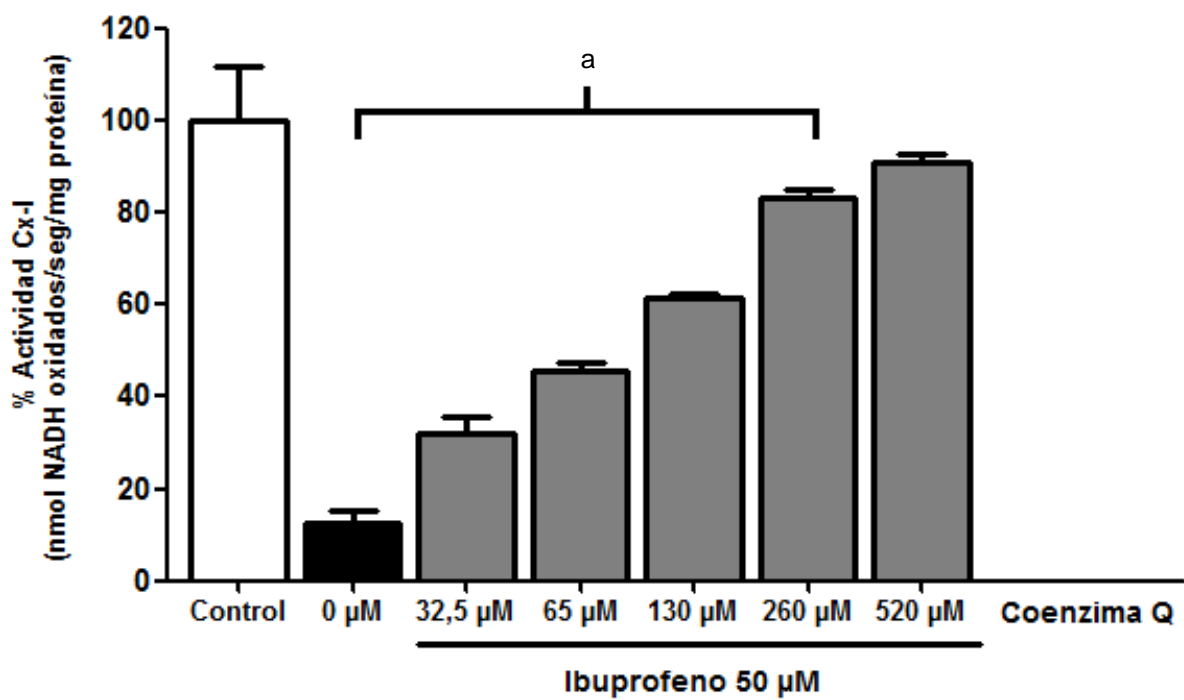


**Figura 8 (B).** Efecto de co-incubación con concentraciones crecientes de coenzima Q sobre la inhibición del complejo I inducida por diclofenaco. Se utilizó la misma metodología referida en le figura 8 (A).  
a:  $p < 0,001$  relativo al control.



**Figura 8 (C). Efecto de co-incubación con concentraciones crecientes de coenzima Q sobre la inhibición del complejo I inducida por piroxicam.**  
 Se utilizó la misma metodología referida en la figura 8 (A).  
 a:  $p < 0,001$  relativo al control.

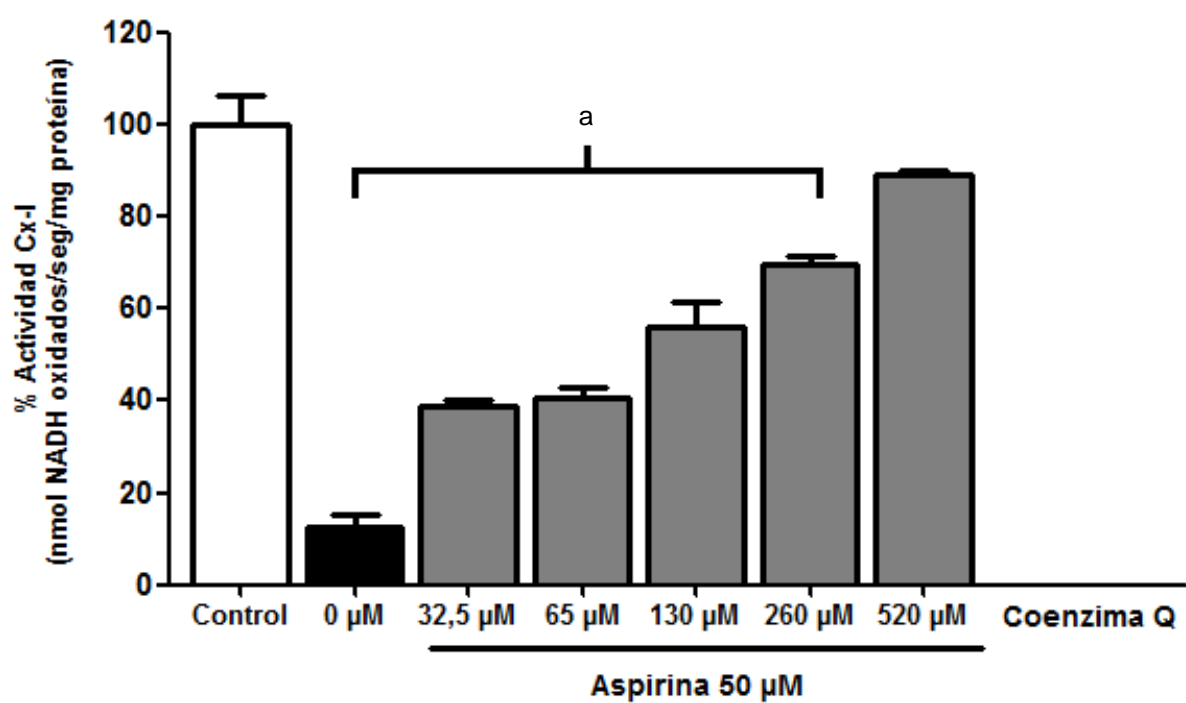




**Figura 8 (D).** Efecto de co-incubación con concentraciones crecientes de coenzima Q sobre la inhibición del complejo I inducida por ibuprofeno.

Se utilizó la misma metodología referida en le figura 8 (A).

a:  $p < 0,001$  relativo al control.

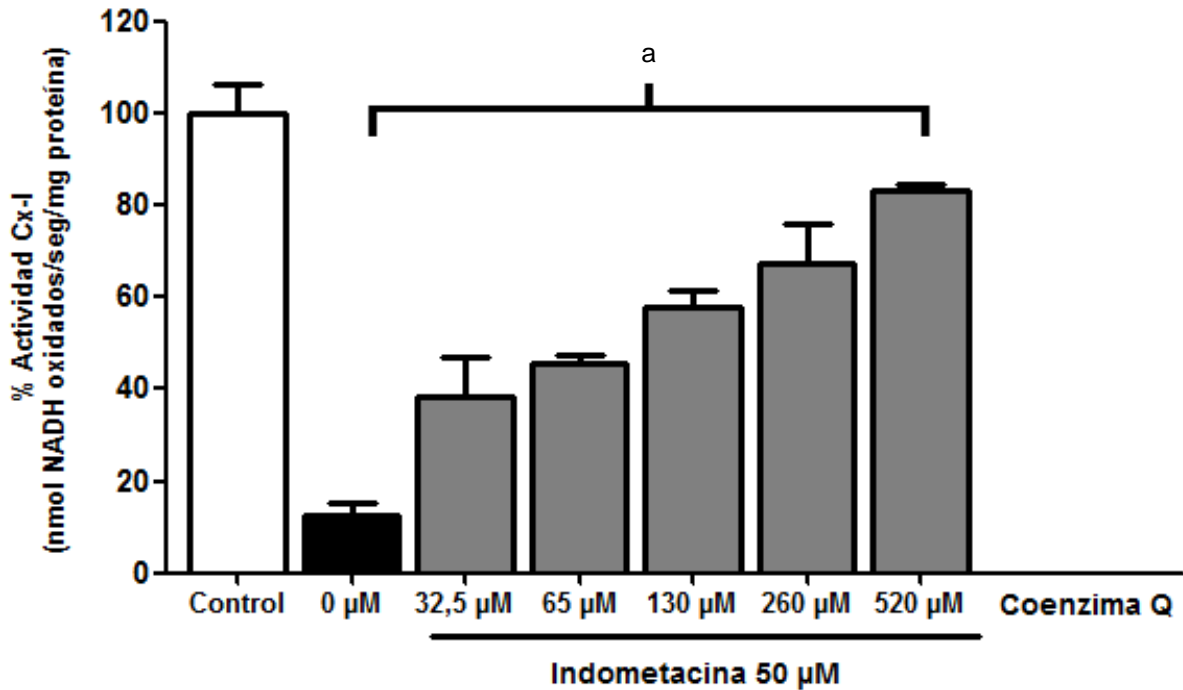


**Figura 8 (E). Efecto de co-incubación con concentraciones crecientes de coenzima Q sobre la inhibición del complejo I inducida por aspirina.**

Se utilizó la misma metodología referida en la figura 8 (A).

a:  $p < 0,001$  relativo al control.

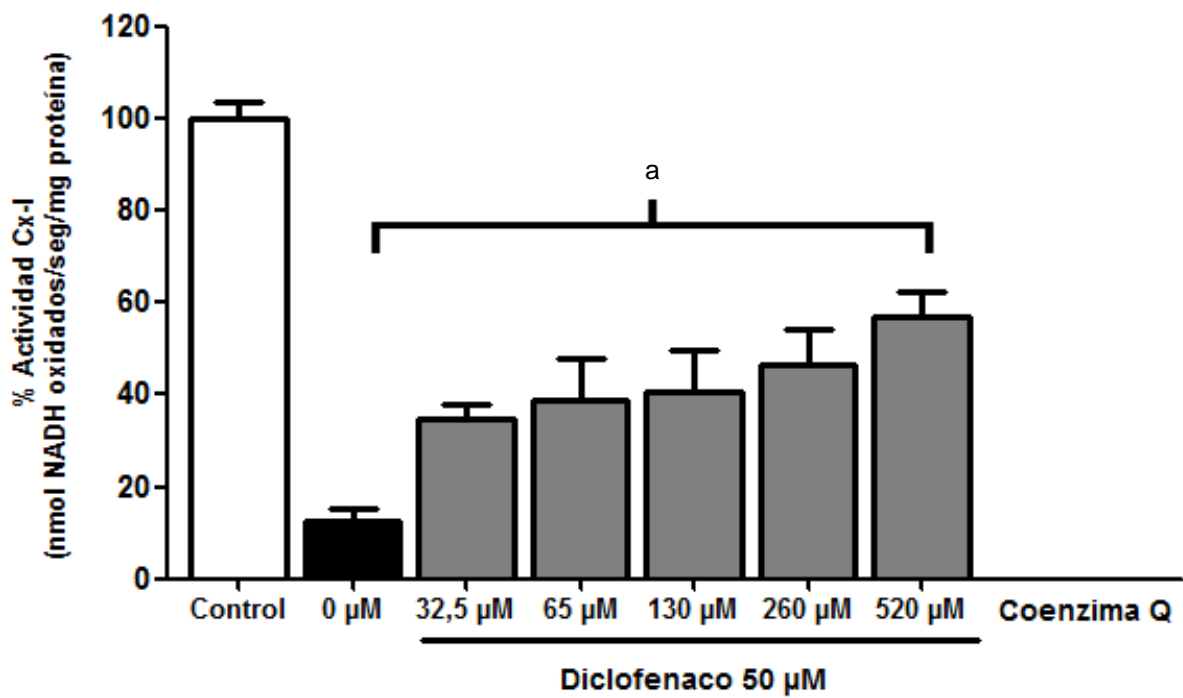
FIGURA 9



**Figura 9 (A). Efecto de la post-incubación con concentraciones crecientes de coenzima Q sobre la inhibición del complejo I inducida por indometacina.**

Mitocondrias aisladas de epitelio duodenal de rata fueron incubadas con diferentes AINEs (50  $\mu$ M) por 10 minutos. Posteriormente se agregaron concentraciones crecientes de coenzima Q (32,5-520  $\mu$ M) y se midió la actividad del complejo I como la oxidación de NADH a 340 nm. La actividad control corresponde a mitocondrias incubadas con 65  $\mu$ M de coenzima Q en ausencia de AINEs. La actividad control del complejo I no varió al disminuir la concentración de coenzima Q a 32,5  $\mu$ M ni al aumentarla en el rango de 130 a 520  $\mu$ M.

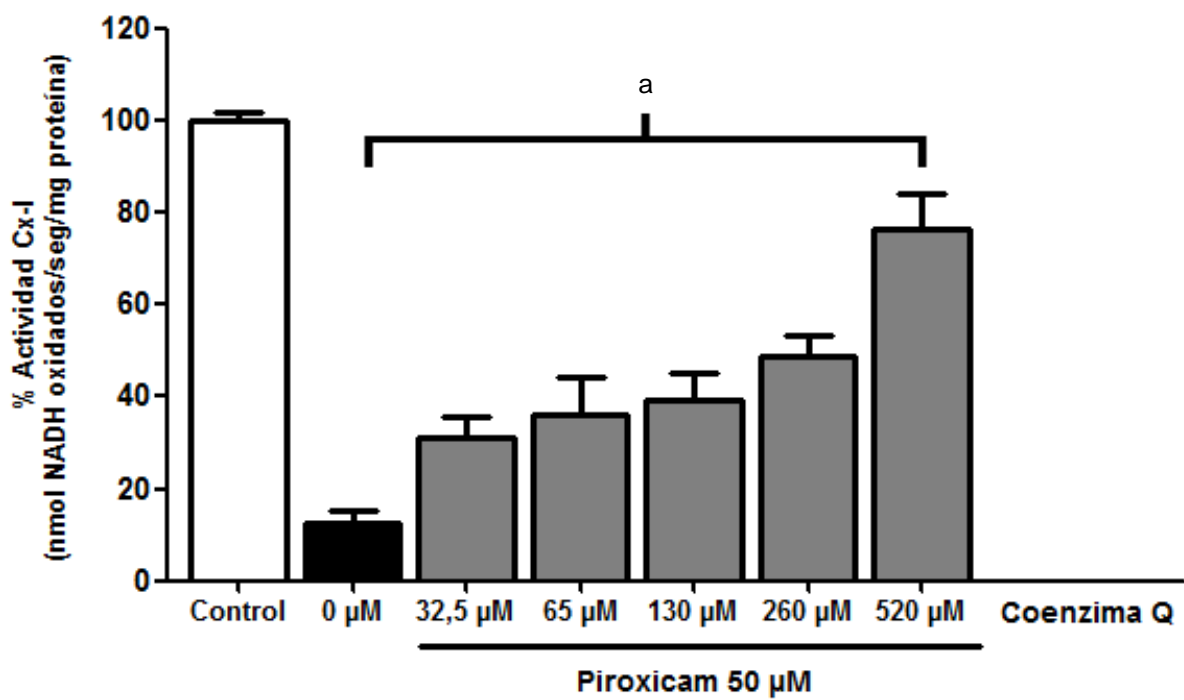
a:  $p < 0,001$  relativo al control.



**Figura 9 (B). Efecto de la post-incubación con concentraciones crecientes de coenzima Q sobre la inhibición del complejo I inducida por diclofenaco.**

Se utilizó la misma metodología descrita para la figura 9 (A).

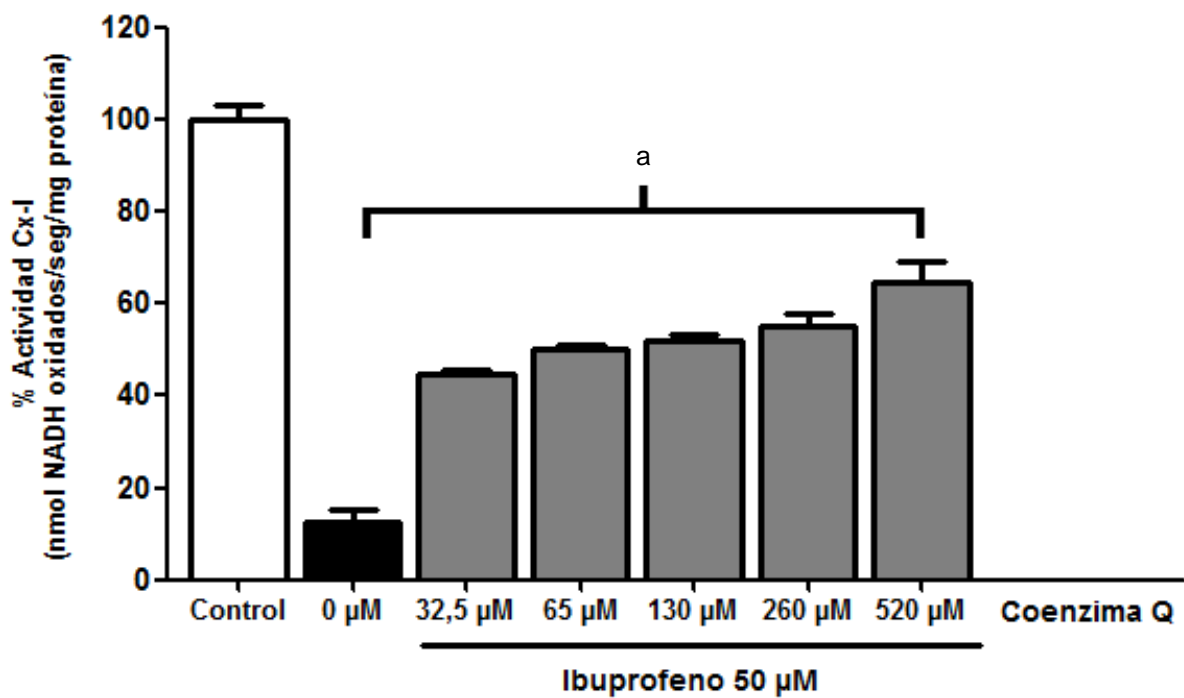
a:  $p < 0,001$  relativo al control.



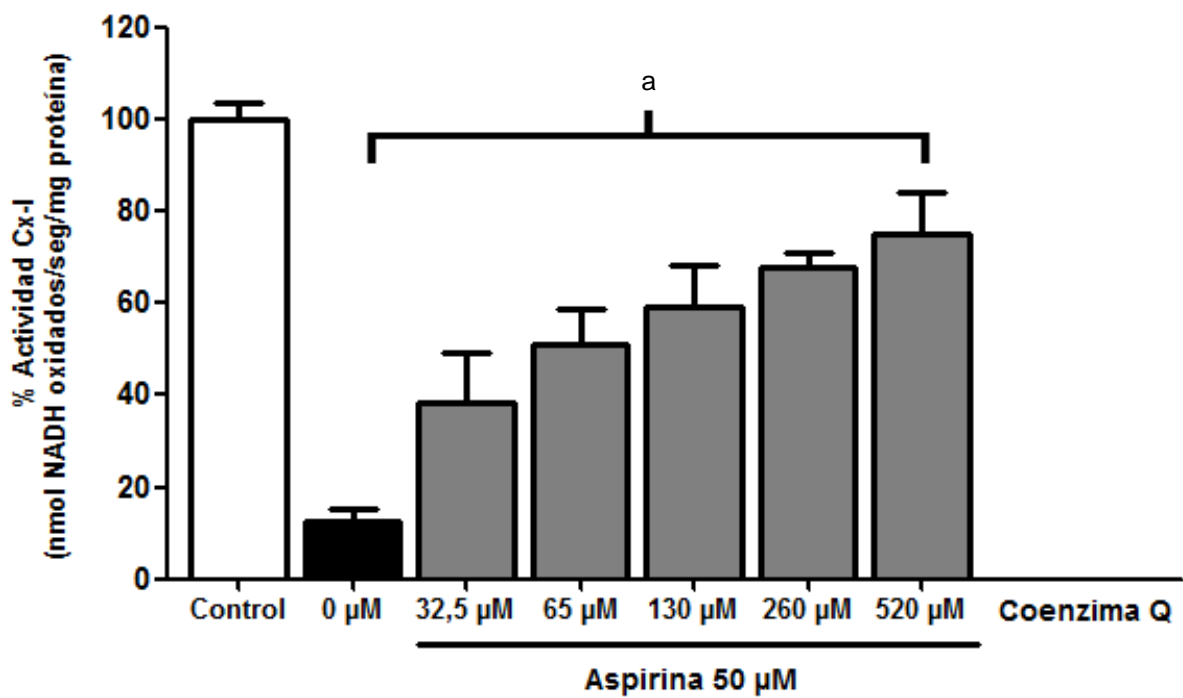
**Figura 9 (C). Efecto de la post-incubación con concentraciones crecientes de coenzima Q sobre la inhibición del complejo I inducida por piroxicam.**

Se utilizó la misma metodología descrita para la figura 9 (A).

a:  $p < 0,001$  relativo al control.



**Figura 9 (D).** Efecto de la post-incubación con concentraciones crecientes de coenzima Q sobre la inhibición del complejo I inducida por ibuprofeno. Se utilizó la misma metodología descrita para la figura 9 (A).  
a:  $p < 0,001$  relativo al control.

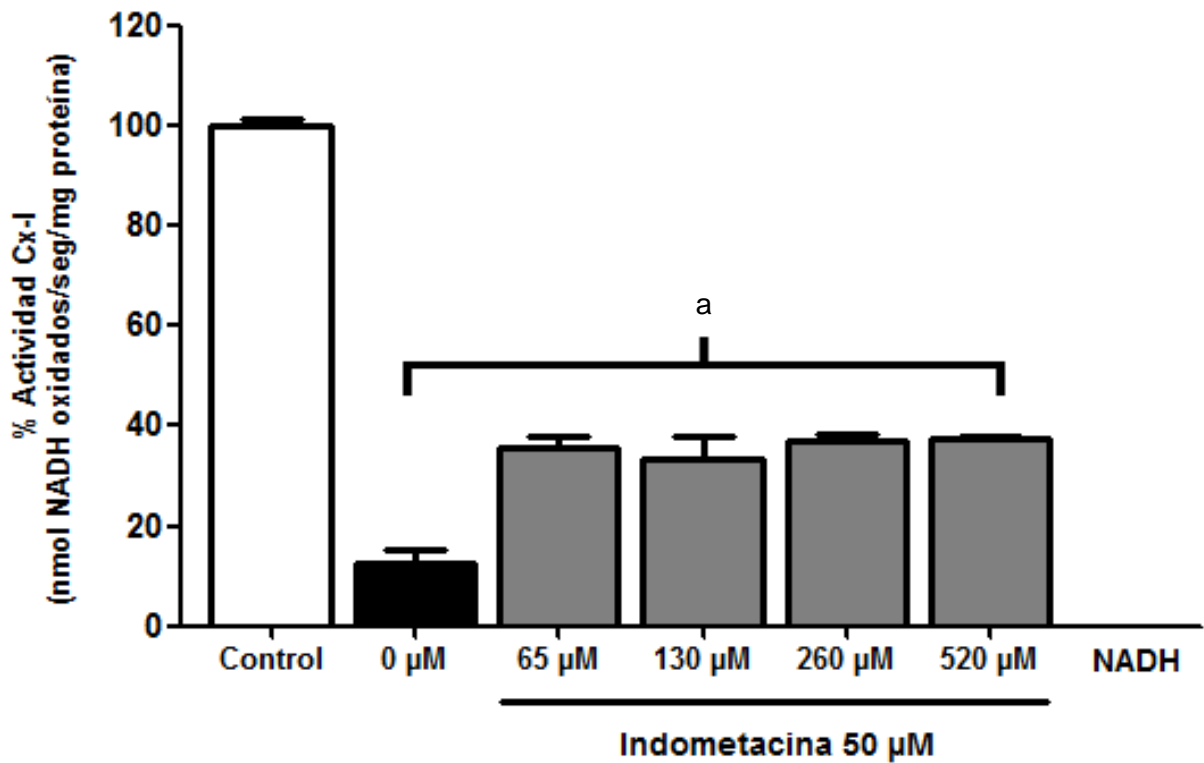


**Figura 9 (E).** Efecto de la post-incubación con concentraciones crecientes de coenzima Q sobre la inhibición del complejo I inducida por aspirina.

Se utilizó la misma metodología descrita para la figura 9 (A).

a:  $p < 0,001$  relativo al control.

**FIGURA 10**

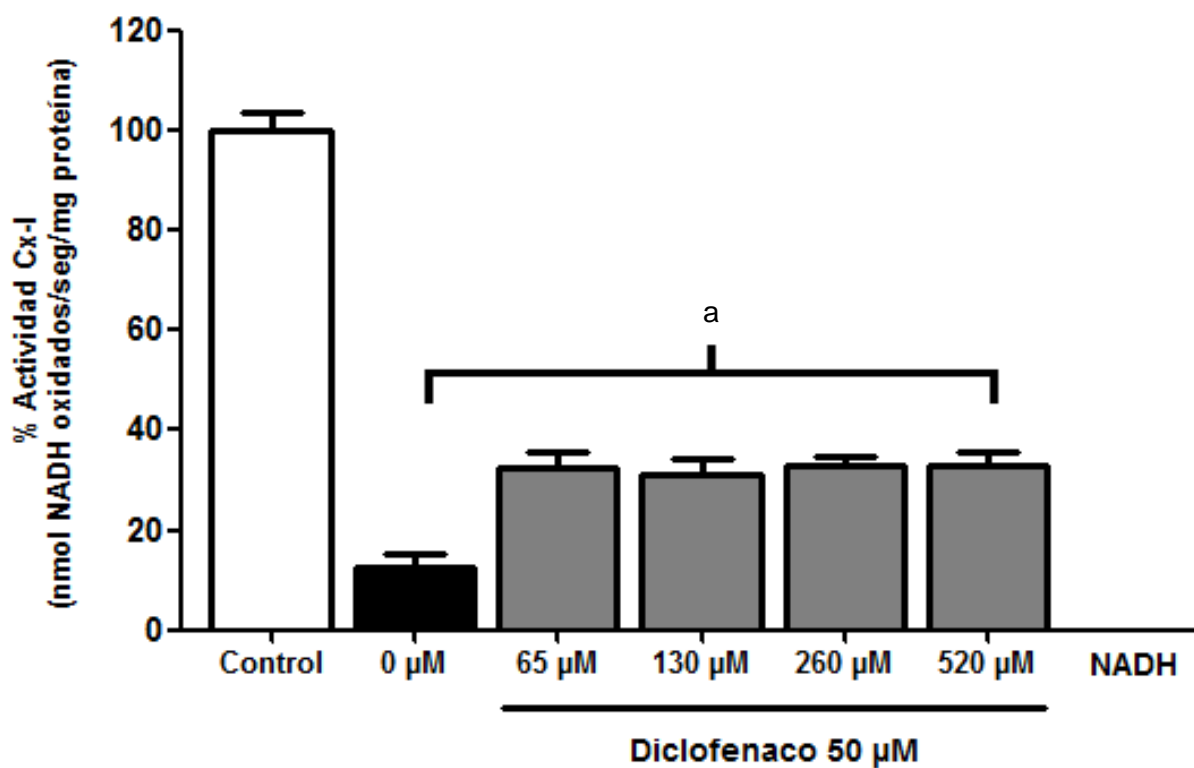


**Figura 10 (A). Efecto de concentraciones crecientes de NADH sobre la inhibición del complejo I inducida por indometacina.**

Mitocondrias aisladas de epitelio duodenal de rata fueron incubadas con diferentes AINEs (50  $\mu\text{M}$ ) por 10 minutos. Posteriormente se agregaron concentraciones crecientes de NADH (65-520  $\mu\text{M}$ ) y se midió la actividad del complejo I como la oxidación de NADH a 340 nm. La actividad control corresponde a mitocondrias incubadas con 130  $\mu\text{M}$  de NADH en ausencia de AINEs. La actividad control del complejo I no varió al disminuir la concentración de NADH a 65  $\mu\text{M}$  ni al aumentarla a 260 o 520  $\mu\text{M}$ .

a:  $p < 0,001$  relativo al control.

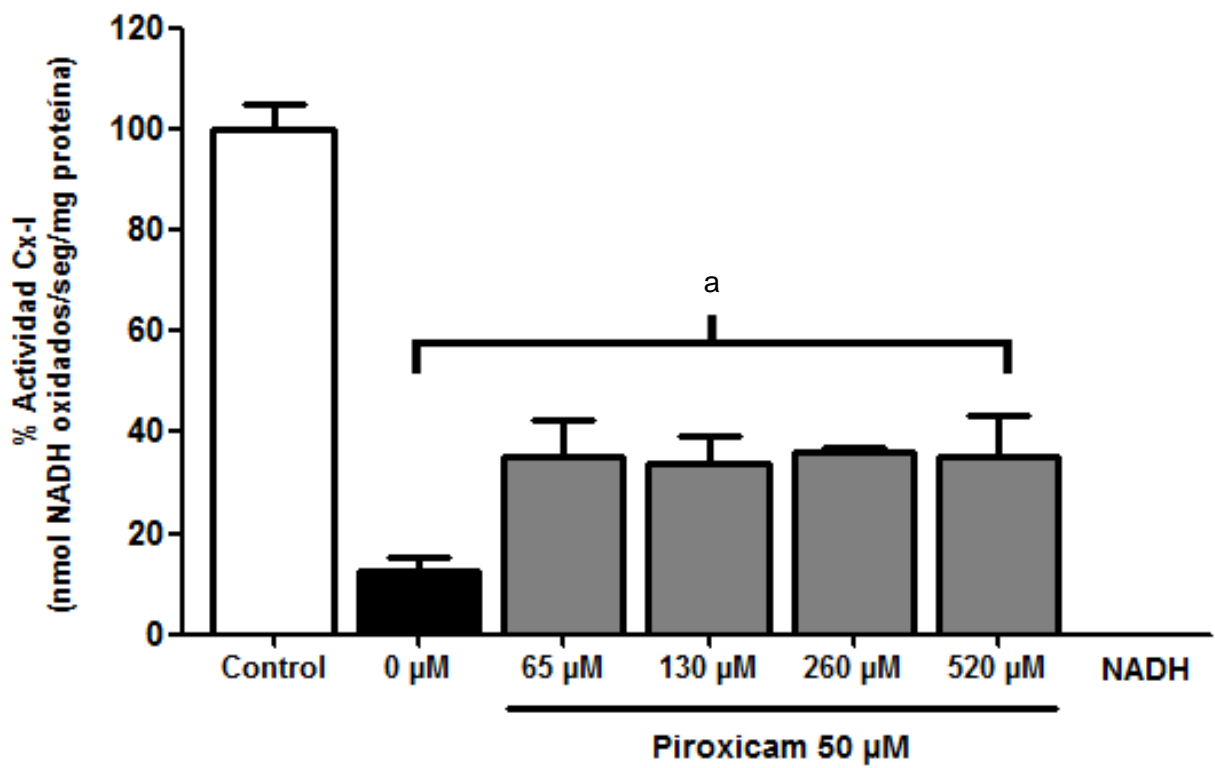




**Figura 10 (B). Efecto de concentraciones crecientes de NADH sobre la inhibición del complejo I inducida por diclofenaco.**

Se utilizó la misma metodología referida en la figura 10 (A).

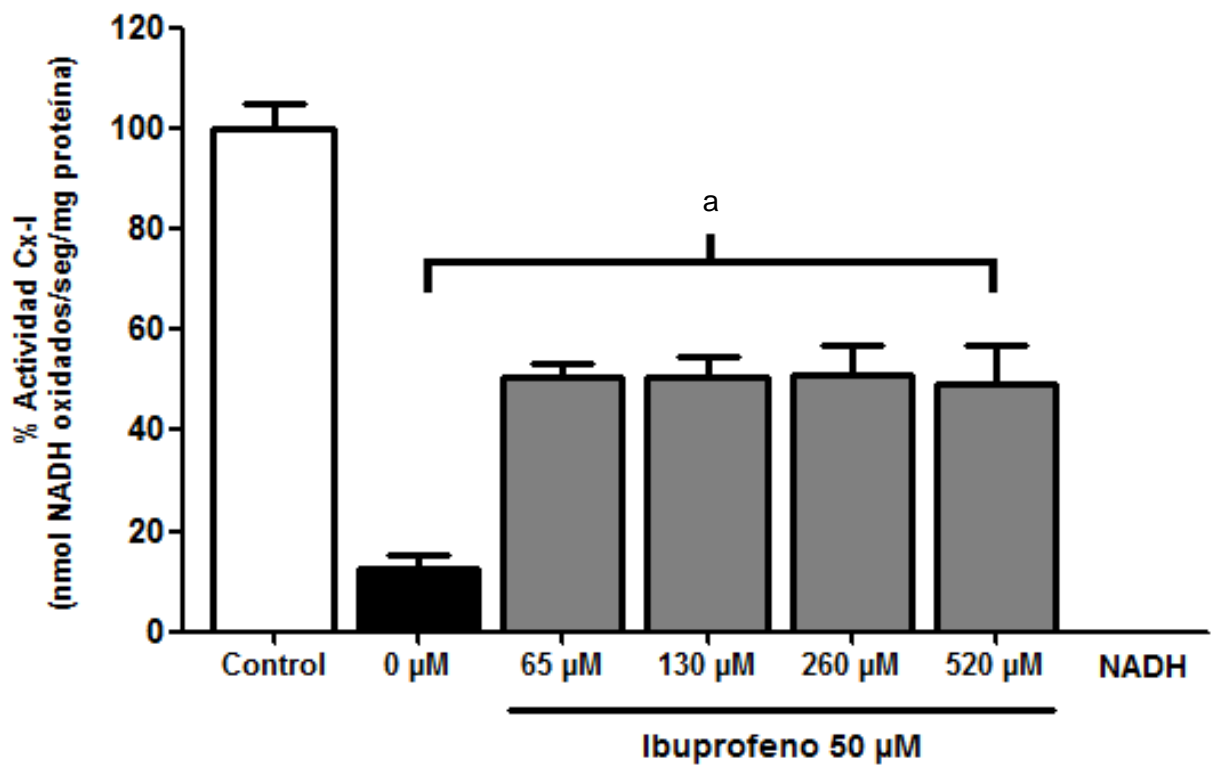
a:  $p < 0,001$  relativo al control.



**Figura 10 (C). Efecto de concentraciones crecientes de NADH sobre la inhibición del complejo I inducida por piroxicam.**

Se utilizó la misma metodología referida en la figura 10 (A).

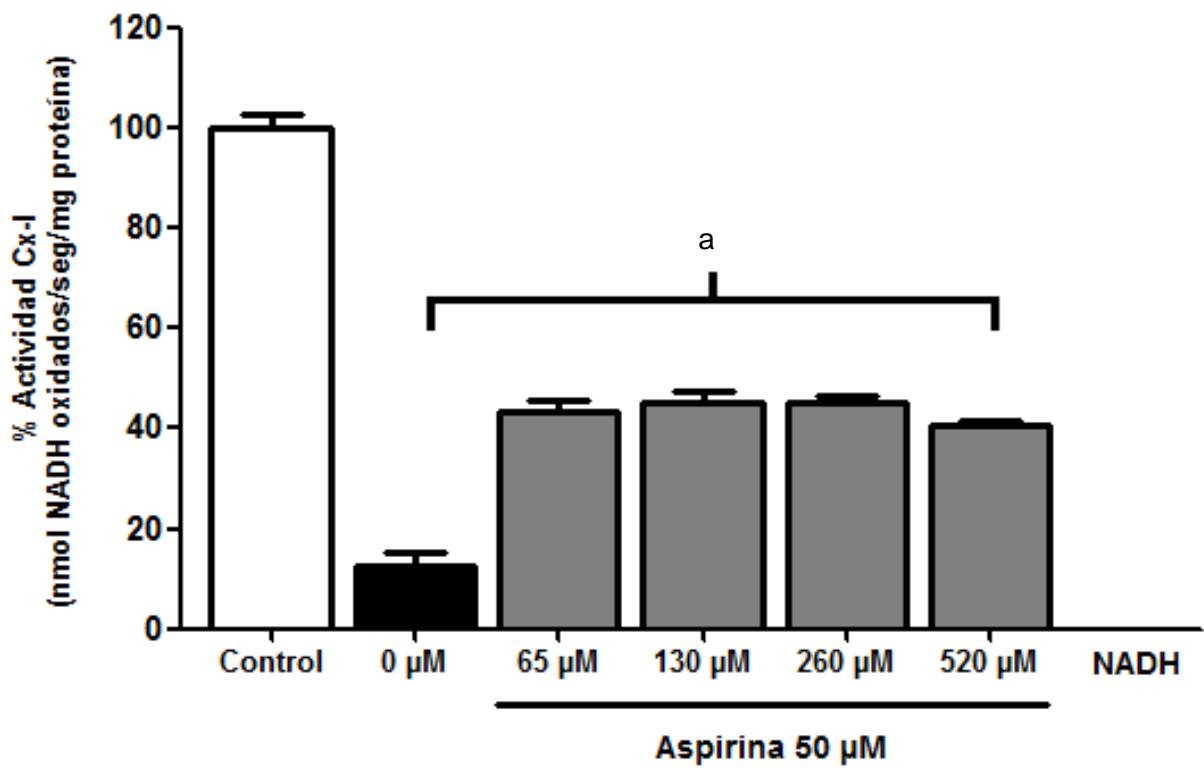
a:  $p < 0,001$  relativo al control.



**Figura 10 (D). Efecto de concentraciones crecientes de NADH sobre la inhibición del complejo I inducida por ibuprofeno.**

Se utilizó la misma metodología referida en la figura 10 (A).

a:  $p < 0,001$  relativo al control.

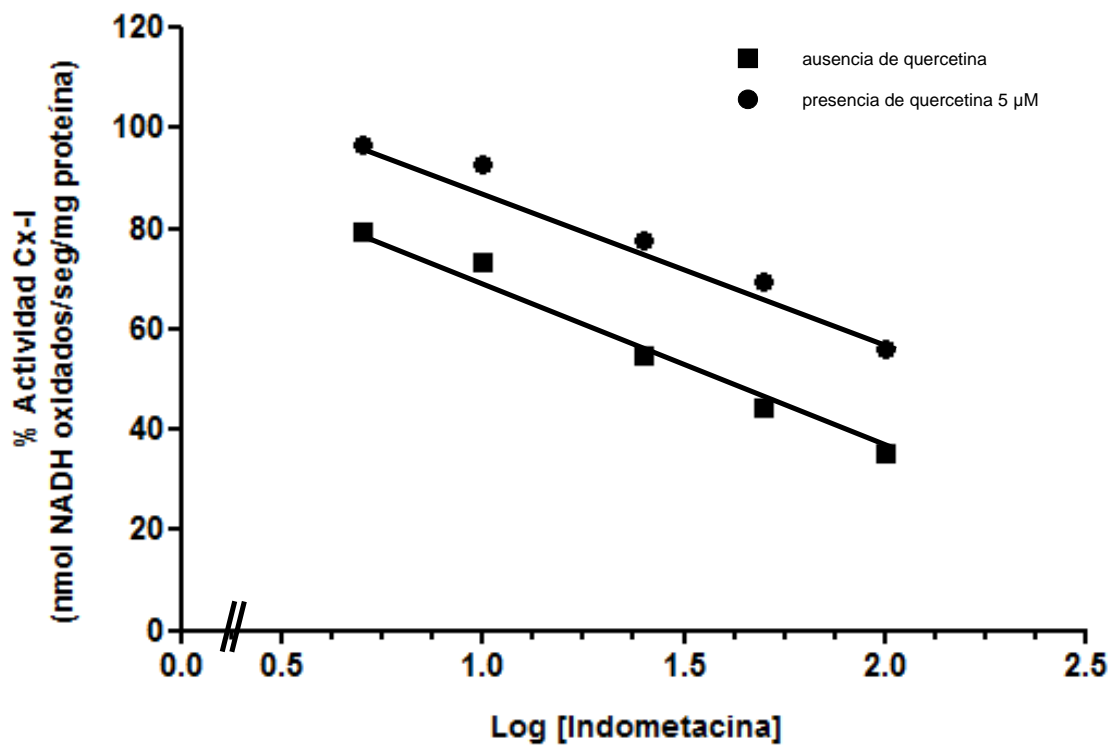


**Figura 10 (E). Efecto de concentraciones crecientes de NADH sobre la inhibición del complejo I inducida por aspirina.**

Se utilizó la misma metodología referida en la figura 10 (A).

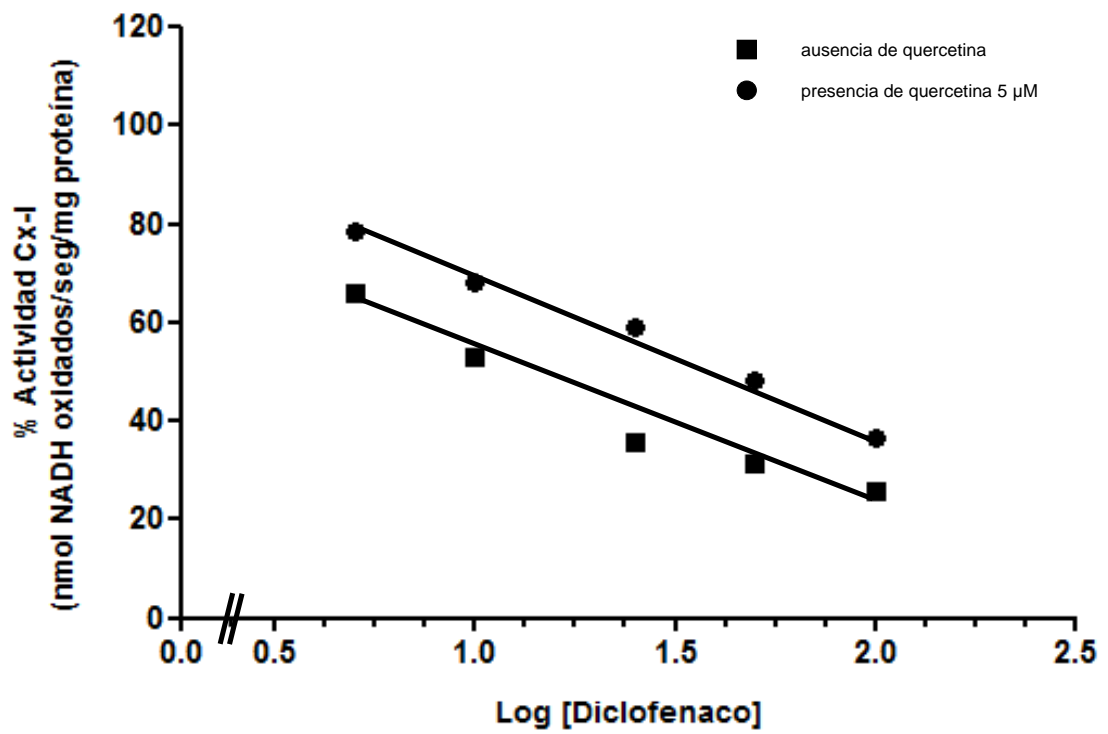
a:  $p < 0,001$  relativo al control.

**FIGURA 11**



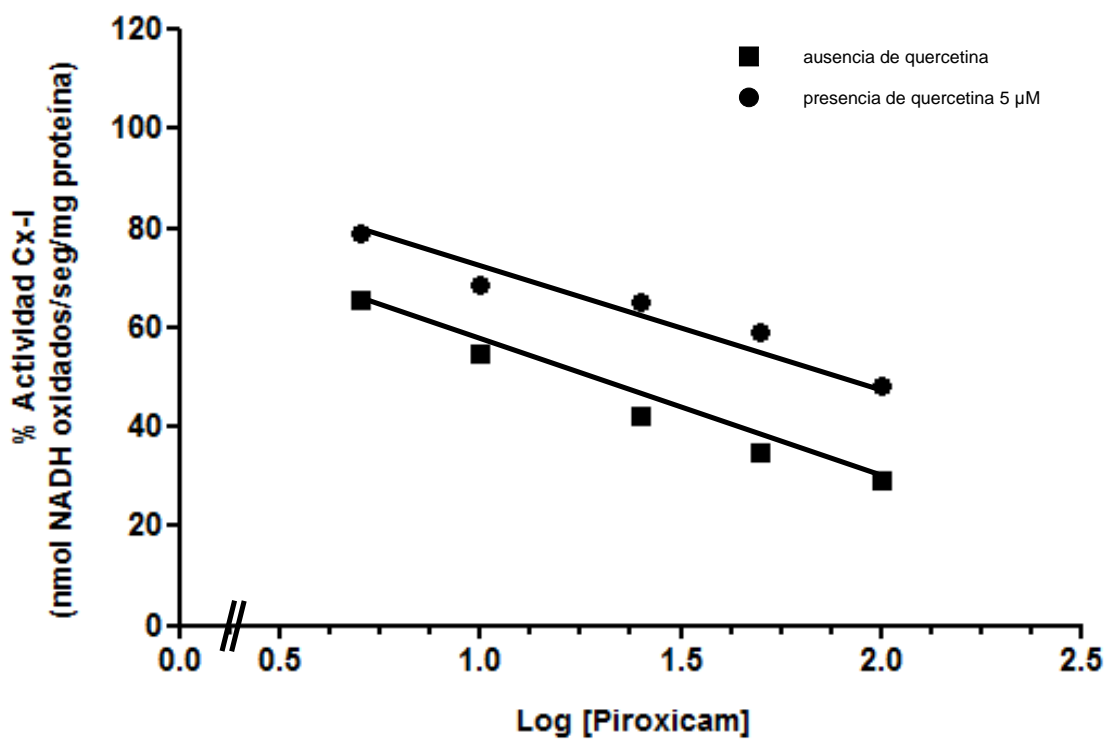
**Figura 11 (A). Efecto de quercetina sobre la inhibición del complejo I inducida por indometacina.**

Mitocondrias aisladas de epitelio duodenal de rata fueron incubadas con concentraciones crecientes de diferentes AINEs (5-100 µM) en ausencia o presencia de quercetina 5 µM durante 10 minutos. Posteriormente se ensayó la actividad del complejo I mediante la oxidación de NADH a 340 nm. Los resultados se muestran en curvas de % actividad Cx-I v/s el logaritmo de la concentración del AINE respectivo. La actividad control corresponde a la obtenida de mitocondrias incubadas solo con el vehículo. La adición de 5 µM de quercetina no alteró dicha actividad control.



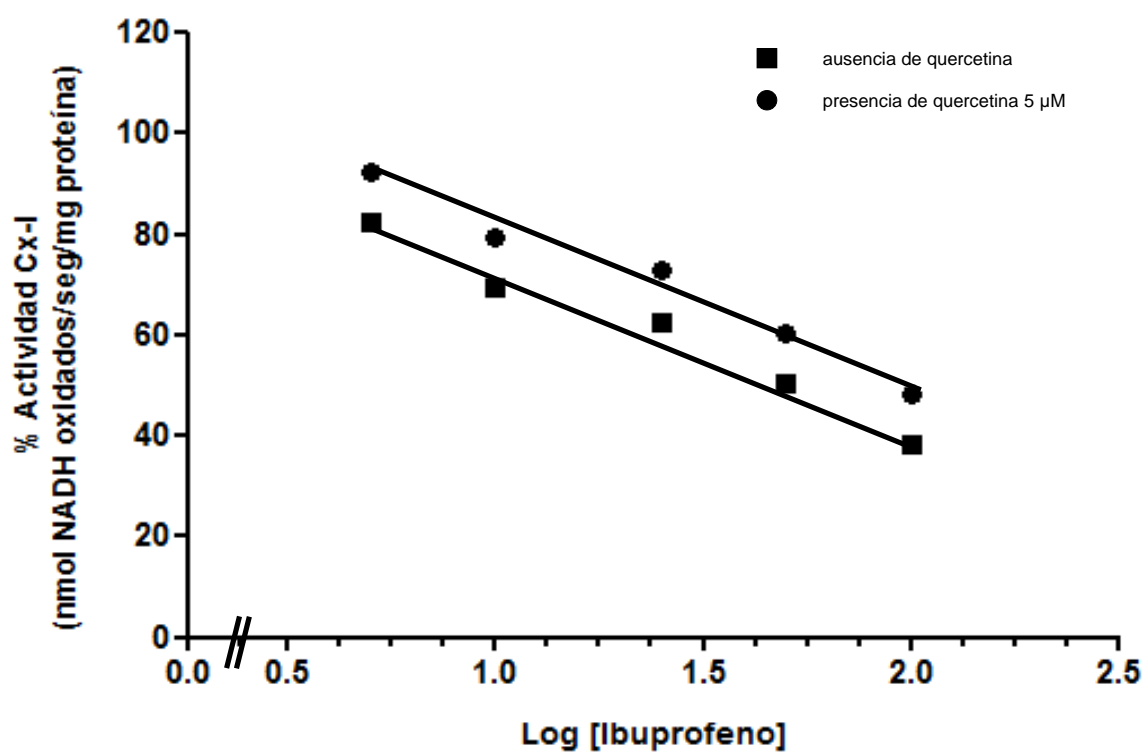
**Figura 11 (B). Efecto de quercetina sobre la inhibición del complejo I inducida por diclofenaco.**

Se utilizó la misma metodología referida para la figura 11 (A).



**Figura 11 (C). Efecto de quercetina sobre la inhibición del complejo I inducida por piroxicam.**

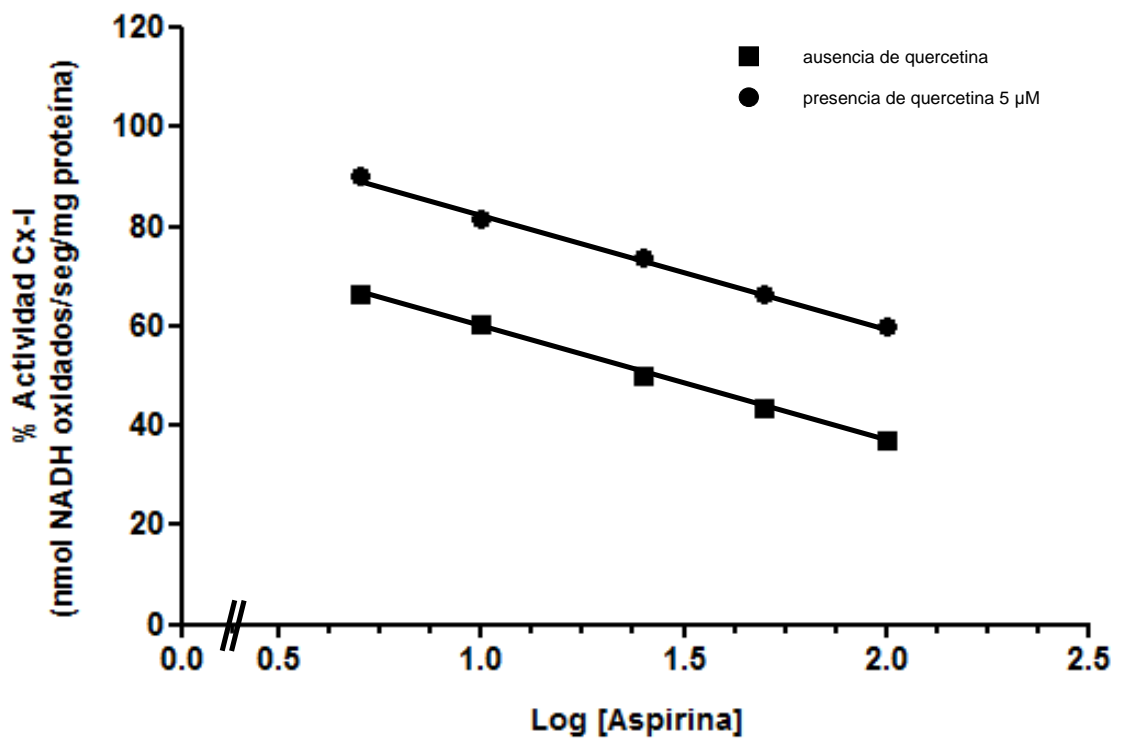
Se utilizó la misma metodología referida para la figura 11 (A).



**Figura 11 (D).** Efecto de quercetina sobre la inhibición del complejo I inducida por ibuprofeno.

Se utilizó la misma metodología referida para la figura 11 (A).





**Figura 11 (E). Efecto de quercetina sobre la inhibición del complejo I inducida por aspirina.**

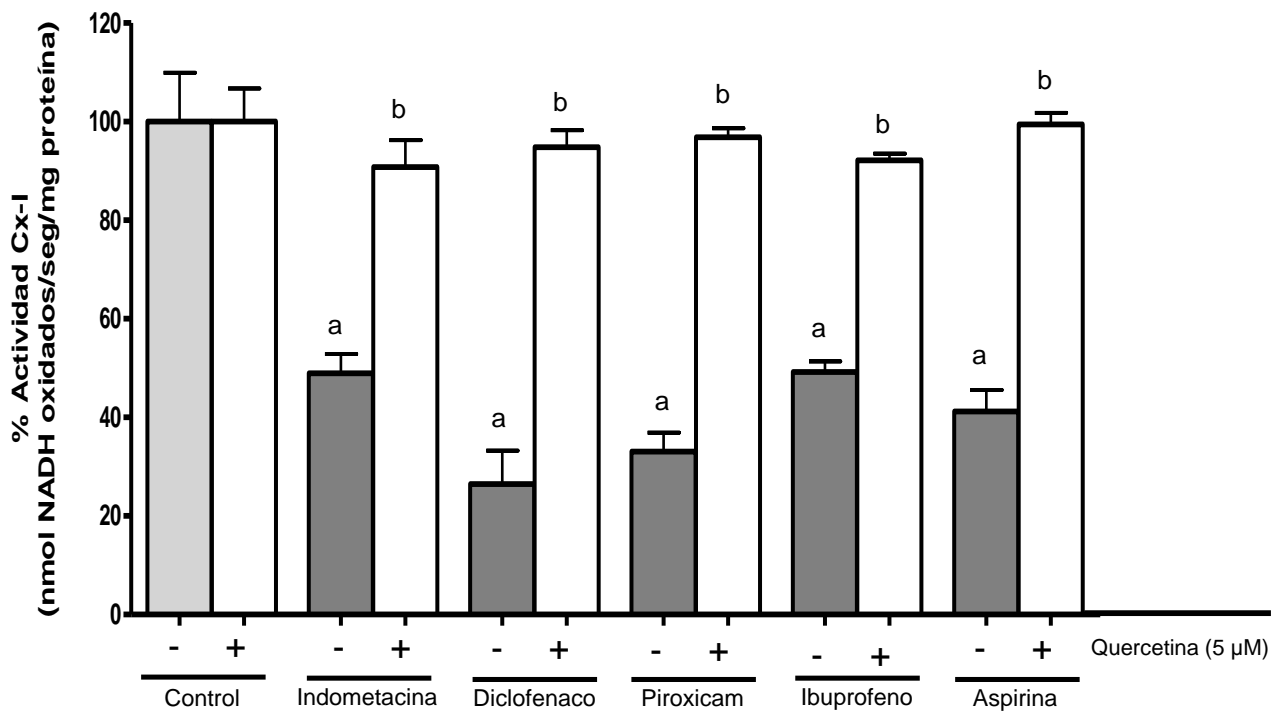
Se utilizó la misma metodología referida para la figura 11 (A).

## TABLA 1

Tabla 1. Efecto de quercetina sobre el IC<sub>50</sub> del complejo I para diferentes AINEs.

AINES	IC <sub>50</sub> (μM)	
	SIN QUERCETINA	CON QUERCETINA 5 μM
INDOMETACINA	32,1	184,2
DICLOFENACO	13,0	41,6
PIROXICAM	15,7	104,6
IBUPROFENO	49,8	99,3
ASPIRINA	26,5	269,4

**FIGURA 12**

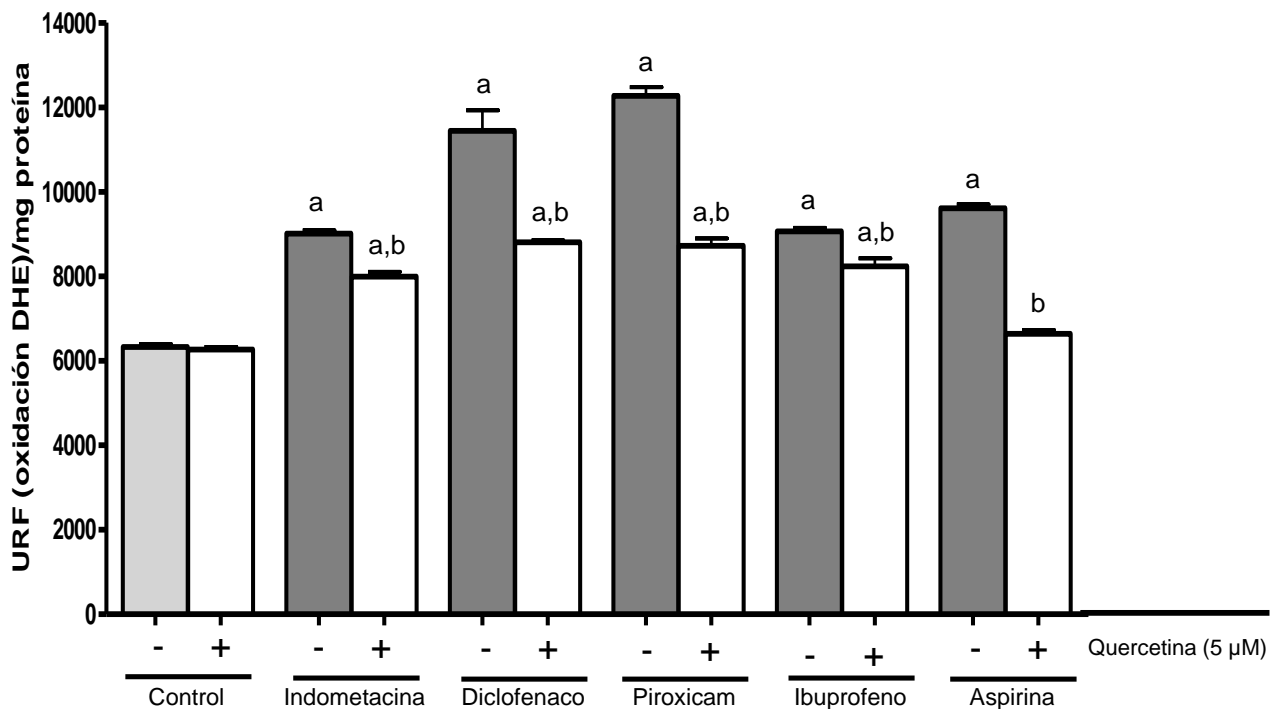


**Figura 12. Efecto de quercetina sobre la inhibición del complejo I inducida por AINEs en células Caco-2.**

Células Caco-2 fueron expuestas a los diferentes AINEs (250 µM) durante 10 minutos en ausencia o presencia de quercetina (5 µM). Las mitocondrias fueron aisladas y la actividad del complejo I medida siguiendo la oxidación de NADH a 340 nm. La actividad control corresponde a células incubadas en ausencia de AINEs.

a:  $p < 0,001$  relativo al control., b:  $p < 0,001$  relativo al mismo AINE en ausencia de quercetina.

**FIGURA 13**

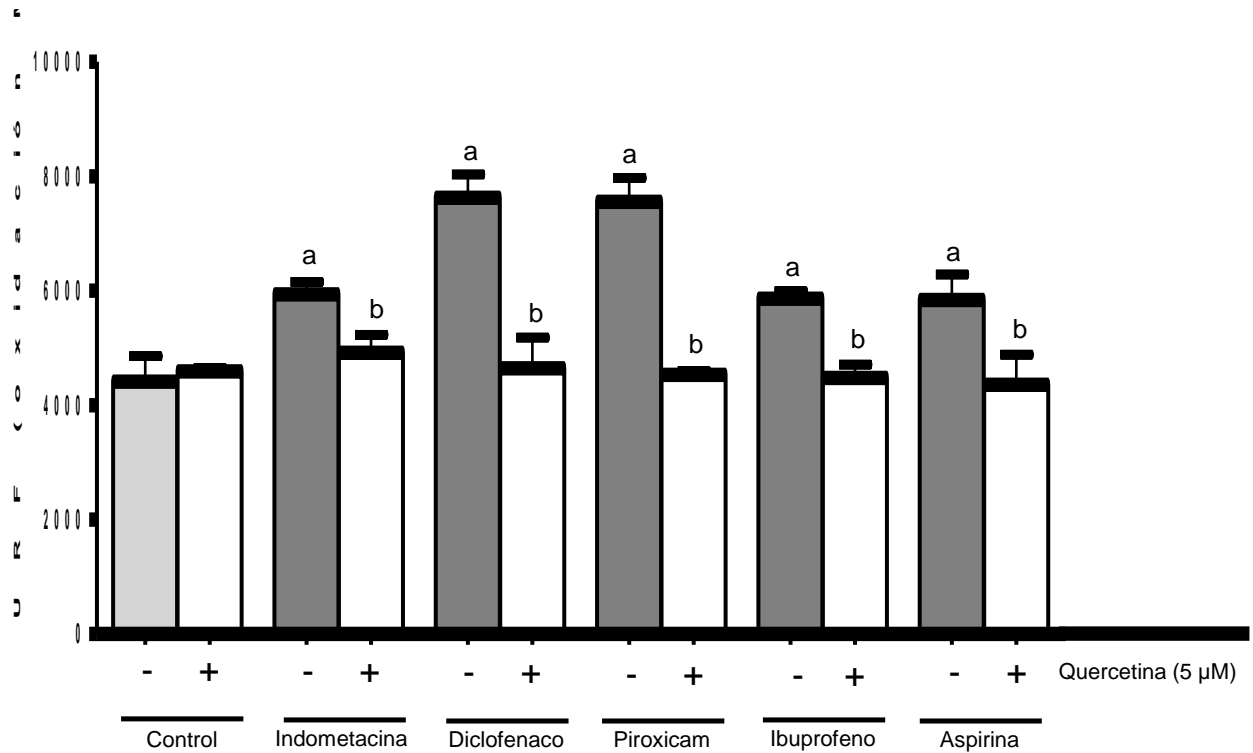


**Figura 13. Efecto de quercetina sobre el incremento en la producción de superóxido mitocondrial inducido por AINEs.**

Mitocondrias aisladas de epitelio duodenal de rata, pre-incubadas con la sonda fluorescente DHE (10 μM), fueron incubadas con distintos AINEs (50 μM) en ausencia o presencia de quercetina (5 μM) durante 20 minutos. Posteriormente las mitocondrias fueron lisadas y su fluorescencia cuantificada ( $470_{Ex}/590_{Em}$ ). Los controles corresponden a la incubación de mitocondrias en ausencia de AINEs. Los resultados se expresan como unidades relativas de fluorescencia, normalizadas por los miligramos de proteína presentes en cada muestra

a:  $p < 0,001$  relativo al control, b:  $p < 0,001$  relativo al mismo AINE en ausencia de quercetina.

**FIGURA 14**

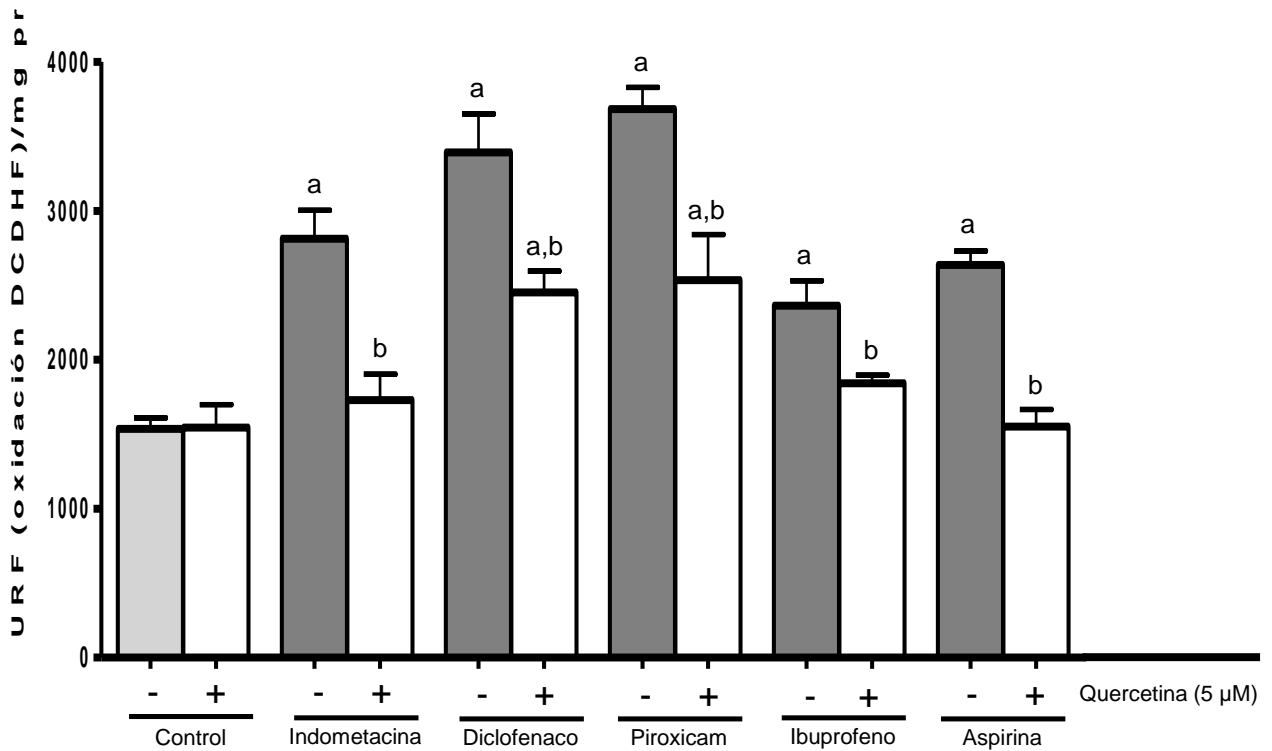


**Figura 14. Efecto de quercetina sobre el incremento en la producción de superóxido mitocondrial en células Caco-2 inducido por AINEs.**

Células Caco-2, pre-incubadas con la sonda fluorescente Mitosox (5 μM), fueron incubadas durante 20 minutos con diferentes AINEs (250 μM) en ausencia o presencia de quercetina (5 μM). Luego de la incubación las células fueron lisadas y la oxidación de Mitosox fue cuantificada mediante la medición de fluorescencia ( $510_{Ex}/580_{Em}$ ). Los resultados se expresan como unidades relativas de fluorescencia, normalizadas por los miligramos de proteína presentes en cada muestra. Los controles corresponden a células incubadas solamente con el vehículo.

a:  $p < 0,001$  relativo al control., b:  $p < 0,001$  relativo al mismo AINE en ausencia de quercetina.

**FIGURA 15**

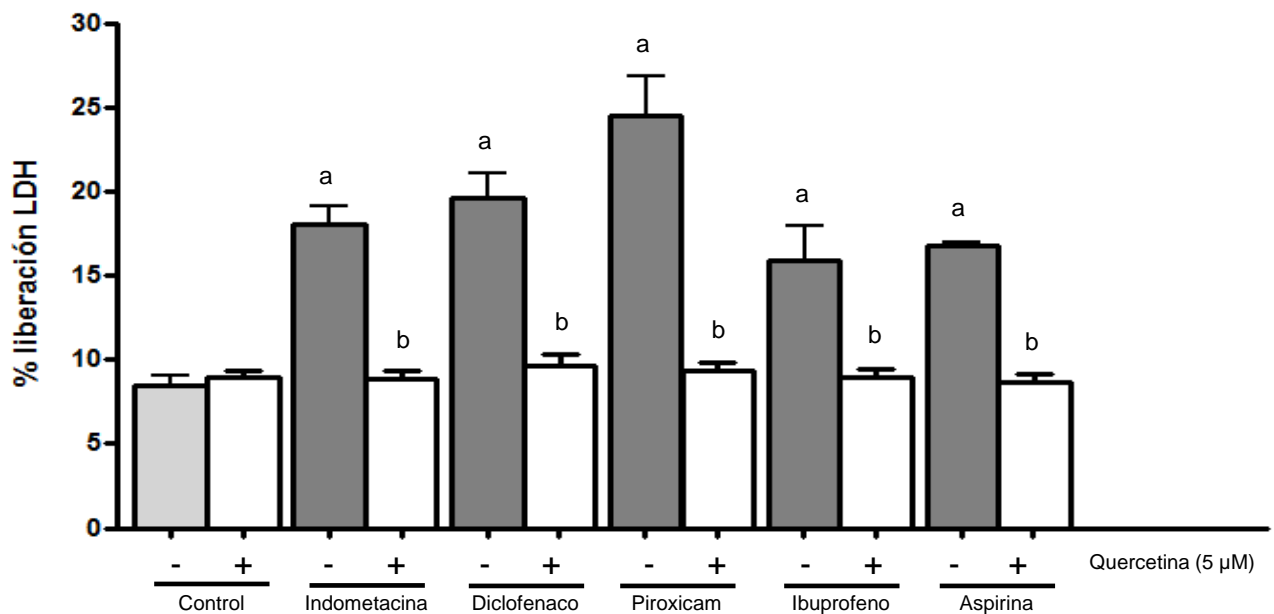


**Figura 15. Efecto de Quercetina sobre el tenor oxidativo de células Caco-2 expuestas a AINEs.**

Células Caco-2, pre-incubadas con la sonda fluorescente DHDCF (50 µM), fueron incubadas durante 60 minutos con diferentes AINEs (250 µM) en ausencia o presencia de quercetina (5 µM). Luego de la incubación las células fueron lisadas y la oxidación de DCDHF fue cuantificada mediante la medición de fluorescencia ( $495_{Ex}/520_{Em}$ ). Los resultados se expresan como unidades relativas de fluorescencia, normalizadas por los miligramos de proteína presentes en cada muestra. Los controles corresponden a células incubadas solamente con el vehículo.

a:  $p < 0,001$  relativo al control, b:  $p < 0,001$  relativo al mismo AINE en ausencia de quercetina.

**FIGURA 16**



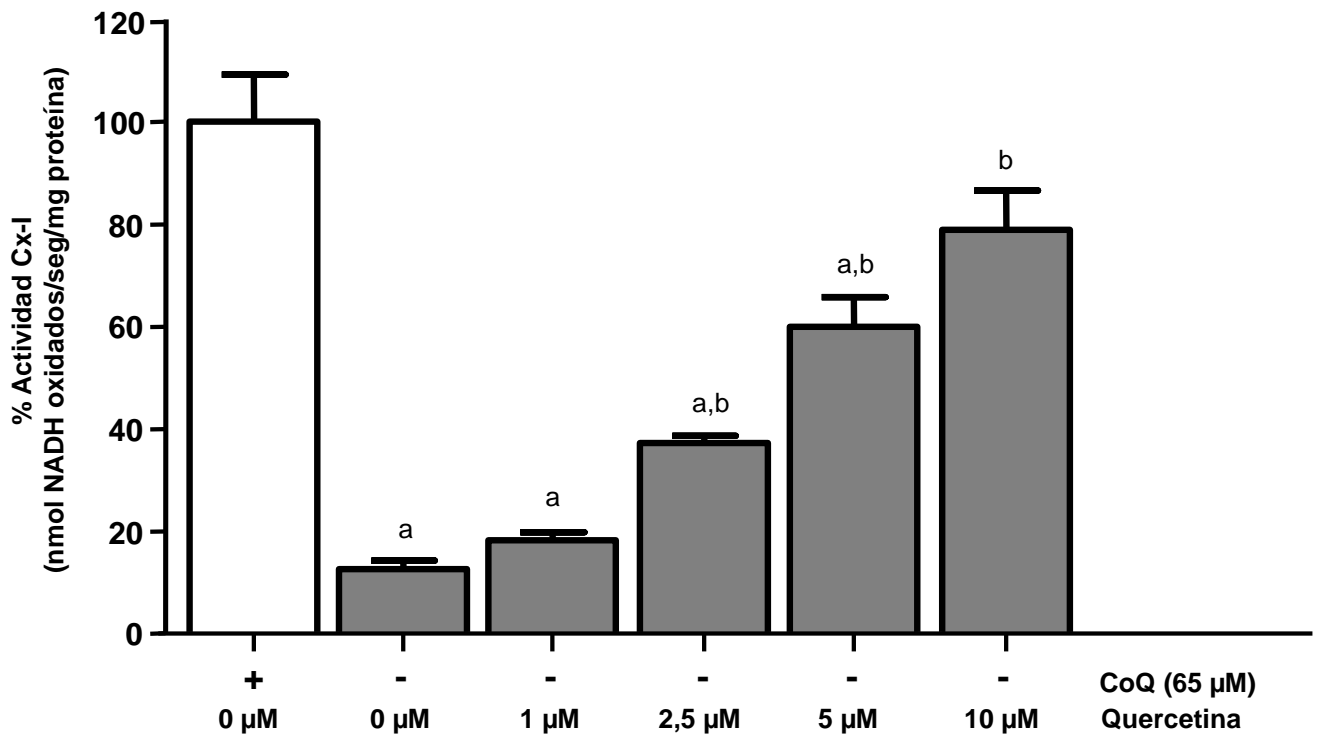
**Figura 16. Efecto de quercetina sobre la viabilidad de células Caco-2 expuestas a AINEs.**

Células Caco-2 fueron expuestas a los diferentes AINEs (250 μM) durante 60 minutos en ausencia y presencia de quercetina 5 μM. La cuantificación de la liberación de LDH se realizó mediante el kit “CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay”. El control corresponde a células incubadas solo con el vehículo.

Los valores se representan como un porcentaje de la liberación de LDH observada al incubar células con tritón X-100 (0.03% en PBS) por 10 minutos.

a:  $p < 0,001$  relativo al control, b:  $p < 0,001$  relativo al mismo AINE en ausencia de quercetina.

**FIGURA 17**

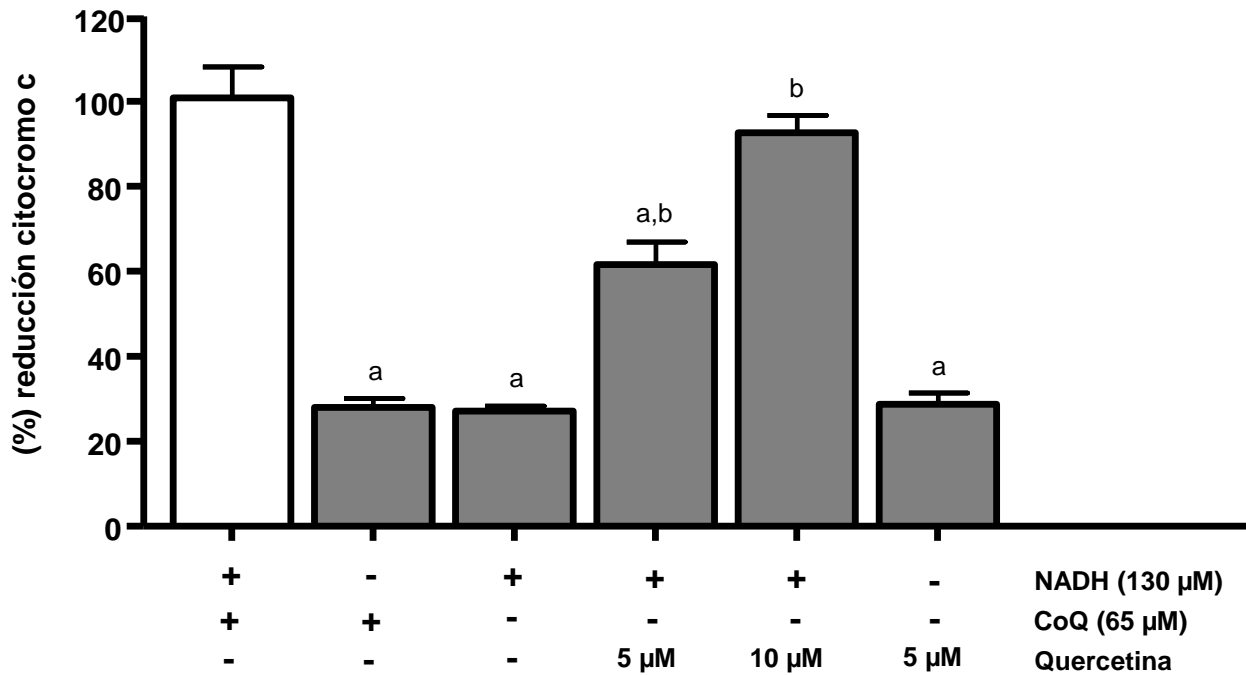


**Figura 17. Quercetina como “coenzima Q mimético” en la actividad del complejo I.** Mitocondrias fueron incubadas durante 10 minutos con quercetina (1-10 μM) en ausencia de coenzima Q. La actividad del complejo I se midió como la oxidación de NADH a 340 nm. El control corresponde a la actividad medida en mitocondrias incubadas con 65 μM coenzima Q en ausencia de quercetina.

a:  $p < 0,001$  relativo al control en presencia de CoQ, b:  $p < 0,001$  relativo al control en ausencia de CoQ y quercetina.



**FIGURA 18**

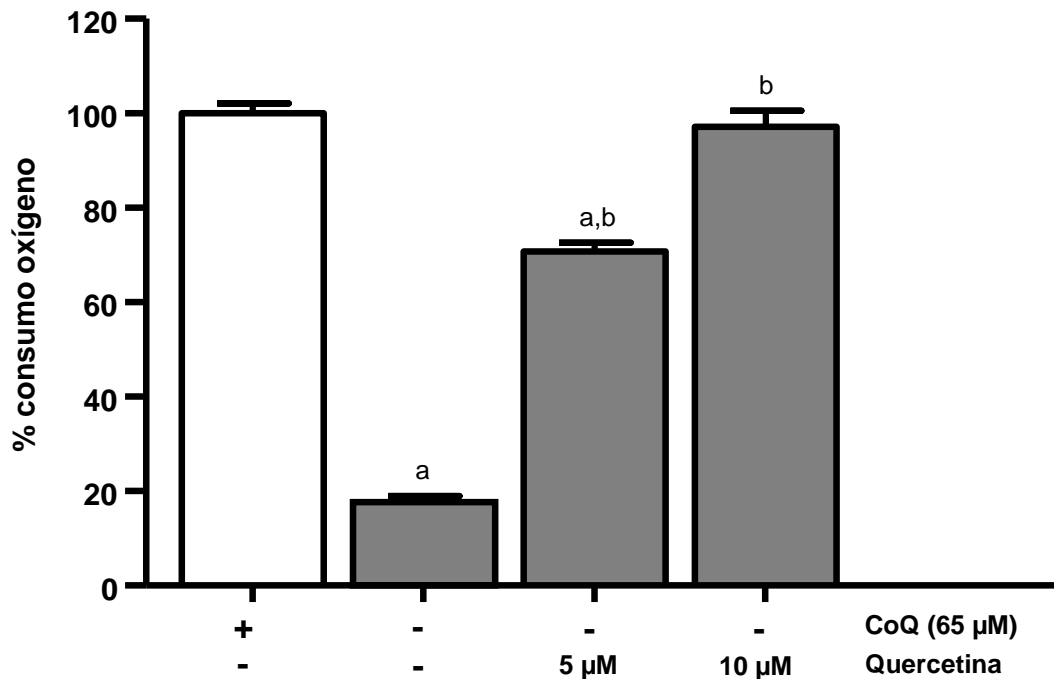


**Figura 18. Quercetina como “coenzima Q mimético” en la actividad del sistema complejo I – complejo III.**

Mitocondrias fueron incubadas durante 10 minutos con quercetina 5 y 10 μM en ausencia de coenzima Q. La actividad del sistema complejo I – complejo III fue medida como al reducción de citocromo c (550 nm) al incubar mitocondrias con NADH como donante de electrones en el complejo I y CoQ o quercetina como transportador de electrones entre el complejo I y el complejo III. La actividad control corresponde a mitocondrias incubadas con coenzima Q 65 μM en ausencia de quercetina.

a:  $p < 0,001$  relativo al control en presencia de NADH y CoQ, b:  $p < 0,001$  relativo al control e presencia de NADH pero en ausencia de CoQ y quercetina.

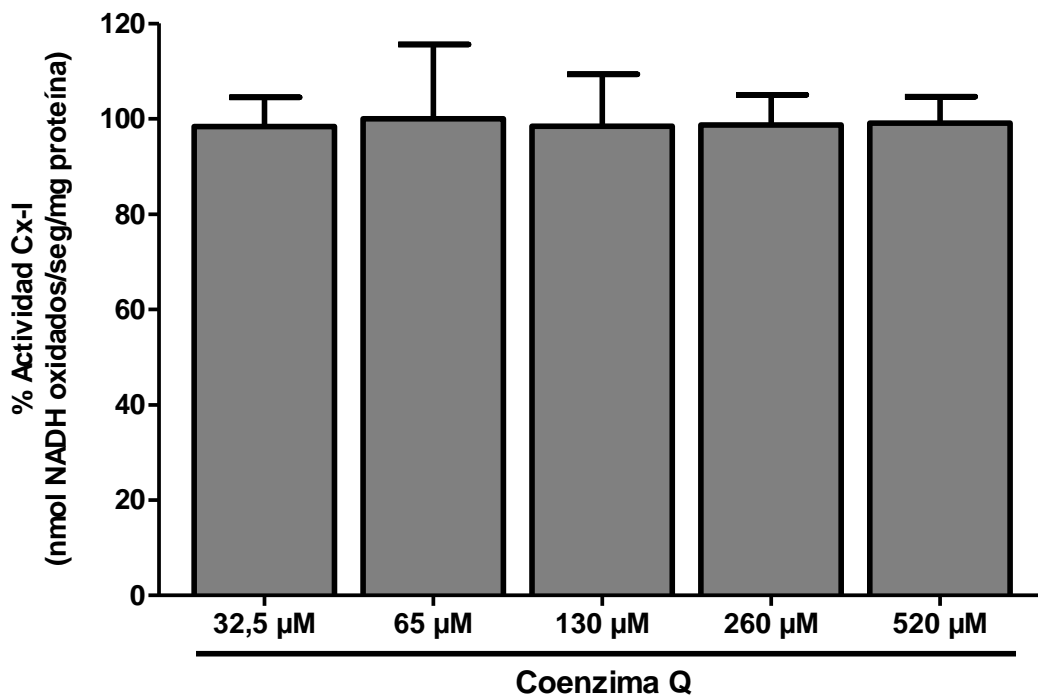
**FIGURA 19**



**Figura 19. Quercetina como “coenzima Q mimético” en el consumo de oxígeno mitocondrial.**

Mitocondrias fueron incubadas con quercetina 5 y 10 μM en ausencia de CoQ. El consumo de oxígeno se monitoreó al adicionar NADH como sustrato donante de electrones para la cadena transportadora de electrones. EL control se definió como el consumo de oxígeno al incubar mitocondrias con CoQ 65 μM en ausencia de quercetina. a:  $p < 0,001$  relativo al control en presencia de CoQ, b:  $p < 0,001$  relativo al control en ausencia de CoQ y quercetina.

FIGURA 1

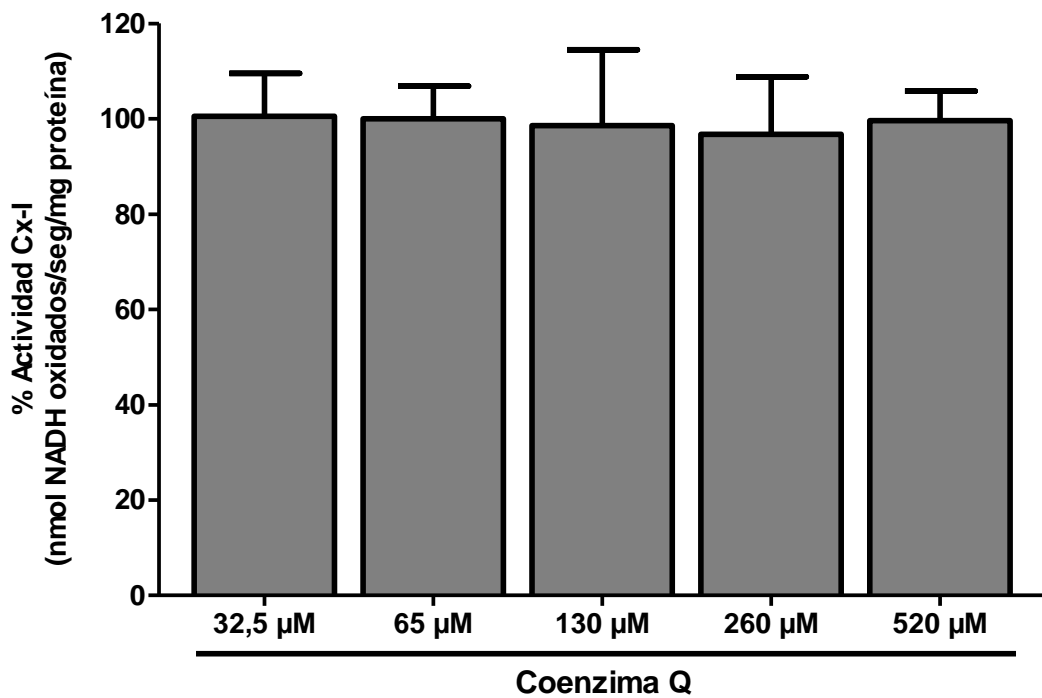


**Figura 1. Actividad del complejo I con distintas concentraciones de coenzima Q (co-incubación).**

Mitocondrias aisladas de epitelio duodenal fueron incubadas durante 10 minutos con distintas concentraciones de coenzima Q. Posteriormente se agregó NADH 130 μM y se midió la actividad del complejo I mediante la oxidación de NADH a 340 nm.

No existen diferencias significativas entre las barras.

**FIGURA 2**

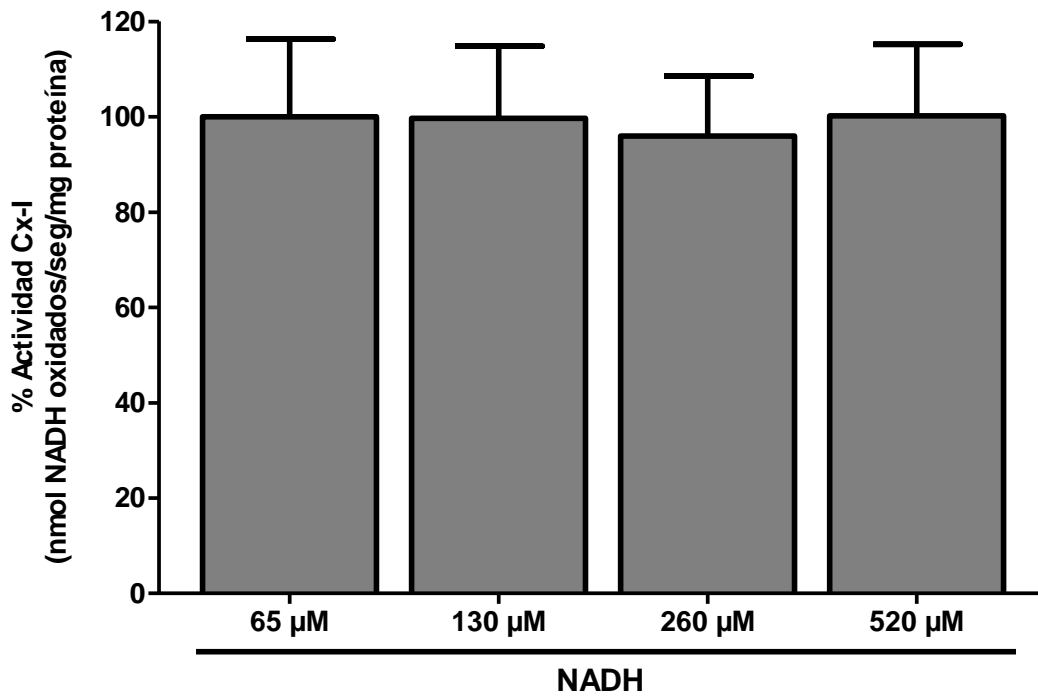


**Figura 2. Actividad del complejo I con distintas concentraciones de coenzima Q (post-incubación).**

Mitocondrias aisladas de epitelio duodenal fueron suplementadas con distintas concentraciones de coenzima Q y una concentración fija de NADH (130 μM). Inmediatamente después se midió la actividad del complejo I mediante la oxidación de NADH a 340 nm.

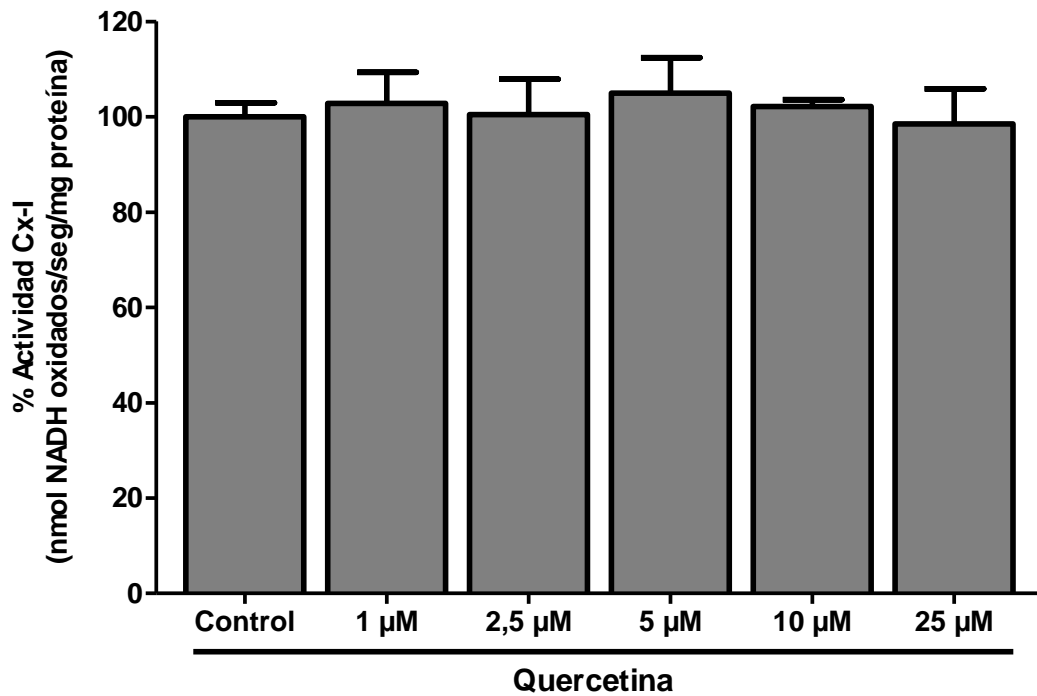
No existen diferencias significativas entre las barras.

**FIGURA 3**



**Figura 3. Actividad del complejo I con distintas concentraciones de NADH.** Mitocondrias aisladas de epitelio duodenal fueron incubadas durante 10 minutos con 65  $\mu\text{M}$  de coenzima Q. Posteriormente se agregaron distintas concentraciones de NADH y se midió la actividad del complejo I mediante la oxidación de NADH a 340 nm. No existen diferencias significativas entre las barras.

**FIGURA 4**



**Figura 4. Actividad del complejo I con distintas concentraciones de quercetina.**

Mitocondrias aisladas de epitelio duodenal fueron incubadas durante 10 minutos con distintas concentraciones de quercetina en presencia de coenzima Q 65 μM. Posteriormente se agregó NADH 130 μM y se midió la actividad del complejo I mediante la oxidación de NADH a 340 nm.

No existen diferencias significativas entre las barras.