



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**MOLÉCULAS HÍBRIDAS DE ISOXAZOL Y TETRAHIDROQUINOLINA:
POSIBLES INHIBIDORES DEL PORO DE TRANSICIÓN DE PERMEABILIDAD
MITOCONDRIAL**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO
DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA**

**AUTORA: JAVIERA ALEJANDRA OSORIO RETAMAL
PROFESOR GUÍA: PhD. BQ. DANIEL GONZÁLEZ REINOSO**

**TALCA-CHILE
2019**

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019

*A mis padres Guillermo y Rosa, por el esfuerzo y amor
brindado durante mi proceso de formación profesional.*

*A mis amigos, quienes me han apoyado desde que
decidí formar parte de esta hermosa carrera.*

AGRADECIMIENTOS

Un sincero agradecimiento a mi profesor guía, el Dr. Daniel González Reinoso quien me orientó y brindó su apoyo incondicional durante el desarrollo de esta memoria. Agradecer también a la Dra. Margarita Isabel Gutiérrez Cabrera del Instituto de Química de Recursos Naturales de la Universidad de Talca, quien a través del proyecto PIEI QUIMBIO UTALCA, nos facilitó parte del material necesario para llevar a cabo la investigación. Por último, agradecer a mis amigos y compañeros memoristas de la escuela de Tecnología Médica, Carlos Manríquez Montecinos y Andrea Rojas Mendoza por su colaboración e infinito apoyo a lo largo de este proceso.

INDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
1. RESUMEN	4
2. INTRODUCCIÓN	5
3. MARCO TEORICO	7
3.1 Isquemia reperfusión	8
3.2 Poro de transición de permeabilidad mitocondrial	10
3.3 Elementos constituyentes del mPTP	12
3.3.1 F ₀ F ₁ ATP sintasa	14
3.4 Opciones farmacológicas para la inhibición del mPTP	17
3.4.1 Ciclosporina A	17
3.4.2 Sangliferhín A	19
3.4.3 TRO40303	21
3.4.4 <i>N</i> -(3-cloro-2-metilfenil)-5-(4-fluoro-3-hidroxifenil)isoxazol-3-carboxamida	22
3.4.5 ML 404	23
3.4.6 DS4417716	24
3.5 Ensayo de hinchazón (swelling)	25
4. HIPÓTESIS	27
5. OBJETIVOS	27
5.1 Objetivo general	27
5.2 Objetivos específicos	27
6. MATERIALES Y MÉTODOS	28
6.1 Modelo animal	28
6.2 Sacrificio de los animales	28
6.3 Extracción de hígado	29
6.4 Homogeneizado	29
6.5 Aislamiento de mitocondrias	29
6.6 Cuantificación de proteínas totales	31
6.7 Ensayo de hinchazón mitocondrial (swelling assay)	31

6.8 Fracciones mitocondriales	32
6.9 Análisis estadístico	32
6.10 Estructura química de moléculas híbridas de isoxazol y tetrahydroquinolina	33
6.11 Protocolo	35
6.11.1 Sacrificio del animal de experimentación	35
6.11.2 Extracción del hígado	36
6.11.3 Homogeneización del tejido	36
6.11.4 Aislamiento mitocondrial (centrifugación diferencial)	37
6.11.5 Cuantificación de proteínas	38
6.11.6 Ensayo de swelling	39
7. RESULTADOS	42
7.1 Cuantificación de proteínas	42
7.2 Fracciones mitocondriales	43
7.3 Representación correspondiente a la apertura del mPTP frente a distintas concentraciones de calcio	44
7.4 Inhibición de la apertura del mPTP por ciclosporina A	46
7.5 Inhibición de la apertura del mPTP por ciclosporina a frente a diversas concentraciones de calcio	48
7.6 Inhibición de la apertura del mPTP por moléculas híbridas de isoxazol y tetrahydroquinolina	50
8. DISCUSIÓN	54
9. CONCLUSIÓN	61
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1: Estructura de una mitocondria	8
FIGURA 2: Modelo para la estructura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP)	11
FIGURA 3: Estructura de la ATP sintasa de mamíferos	15
FIGURA 4: Estructura química de la ciclosporina A	19
FIGURA 5: Estructura química de Sanglifehrin A	20
FIGURA 6: Estructura química de TRO40303	22
FIGURA 7: Estructura química de N-(3-cloro-2-metilfenil-5-(4-fluoro-3-hidroxifenil)isoxazol-3-carboxamida	23
FIGURA 8: Estructura química de ML 404	24
FIGURA 9: Estructura química de DS44170716	25
FIGURA 10: Ensayo de swelling	26
FIGURA 11: Diagrama de flujo para el aislamiento de mitocondrias	30
FIGURA 12: Estructura química de moléculas híbridas de isoxazol y tetrahydroquinolina	34
TABLA N°1: Curva de calibración	42
FIGURA 13: Curva de calibración para cuantificación de proteínas por el método del ácido bicinconínico (BCA)	43
TABLA N°2: Animales de experimentación	43
FIGURA 14: Western blot de fracciones mitocondriales	44
FIGURA 15: Apertura del mPTP inducida por calcio	45
FIGURA 16: Inhibición del mPTP a través de ciclosporina A	47
FIGURA 17: Actividad de la ciclosporina A frente a distintas concentraciones de CaCl ₂	50
FIGURA 18: Acción de moléculas híbridas de isoxazol y tetrahydroquinolina sobre mPTP inducido por CaCl ₂ 1000 μM	52
FIGURA 19: Acción de moléculas híbridas de isoxazol y tetrahydroquinolina sobre mPTP inducido por CaCl ₂ 600 μM	53

1. RESUMEN

La mitocondria es un orgánulo celular involucrado en una gran cantidad de procesos fisiológicos y patológicos, razón por la que es ampliamente estudiada. Se describe que participaría en procesos de isquemia reperusión en donde una sobrecarga de Ca^{+2} mitocondrial causaría la apertura de un poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP), el cual gatillaría una desregulación de la producción de energía de la célula, pérdida del potencial de membrana y con ello la muerte celular. Si bien actualmente no se conoce a cabalidad las estructuras que conforman este poro, las investigaciones actuales se centran en la búsqueda de posibles inhibidores, para así evitar la muerte celular.

El objetivo de este trabajo se basa en la búsqueda de moléculas híbridas de isoxazol y tetrahydroquinolina que logren inhibir la apertura del mPTP, para lograr disminuir y eventualmente prevenir el grado de afección que se produce en las células frente a la apertura prolongada de este poro. Se utilizaron 12 ratas de la cepa Sprague – Dawley. A partir de ellas se extrajo el hígado y por consiguiente las mitocondrias mediante un proceso de centrifugación diferencial, para posteriormente realizar el estudio de la apertura de mPTP, llevado a cabo a través del ensayo de hinchazón (swelling).

La ciclosporina A (CsA) no inhibe la apertura del mPTP frente a la administración de CaCl_2 en un rango de 200 a 1000 μM . Las moléculas híbridas de isoxazol y tetrahydroquinolina, 1-[2-(5-Metil-isoxazol-3-yl)-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydro-quinolin-4-yl]-pirrolidin-2-ona (molécula 2) y 1-(2-Isoxazol-3-yl-1,2,3,4-tetrahydro-quinolin-4-yl)-pirrolidin-2-ona (molécula 3), logran inhibir la apertura del mPTP frente a una concentración de CaCl_2 600 μM con un valor $p < 0,05$.

Palabras claves: Mitocondria - mPTP - ensayo de swelling - isoxazol – tetrahydroquinolina

2. INTRODUCCIÓN

Las mitocondrias corresponden a un orgánulo celular muy importante, ya que comúnmente participan de forma activa en procesos tanto fisiológicos como patológicos. Se encargan de funciones esenciales para la vida celular, como por ejemplo, la producción de energía y la regulación citoplasmática de los niveles de segundos mensajeros, tales como el Ca^{+2} y las especies reactivas del oxígeno (ROS). Pero a su vez también son capaces de desencadenar procesos patológicos, como por ejemplo cuando ocurre una desregulación significativa de los niveles de Ca^{+2} , evento característico de varias patologías incluida la lesión por isquemia reperfusión, en donde esta sobrecarga de Ca^{+2} gatillaría la muerte celular necrótica o apoptótica. Esto ha llevado a considerar a este orgánulo celular como un punto crucial para describir o predecir el estado de la célula.

Como se mencionó, las mitocondrias participan principalmente en el proceso de producción de energía en la célula, suministran aproximadamente un 90% de la energía (ATP), por lo que deben mantener una regulación estricta de la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna que no le genere una desregulación y por consiguiente daño en su función. Desde hace varios años se ha establecido que cuando la mitocondria se expone a eventos estresantes sufre desregulaciones principalmente a nivel del Ca^{+2} , lo que genera la pérdida de su potencial de membrana producto de la apertura prolongada de un poro conocido como mPTP, el cual es actualmente reconocido como elemento crucial en una amplia variedad de enfermedades en humanos cuya patología común puede estar basada en la disfunción mitocondrial, generando cambios osmóticos, disfunción metabólica y muerte celular.

Actualmente muchos trabajos están enfocados en conocer en profundidad la estructura y funcionamiento de este poro, producto de que esto llevaría a conocer como ocurre la muerte

celular gatillada por este evento, cuál sería la forma más efectiva de poder inhibirlo y con ello lograr evitar la muerte celular.

El objetivo de este trabajo se basa en la búsqueda de moléculas híbridas de isozaxol y tetrahydroquinolina que logren inhibir el mPTP evaluado mediante el ensayo de swelling, para así, disminuir y eventualmente prevenir el grado de afección que se produce en las células frente a la apertura prolongada de este poro.

3. MARCO TEÓRICO

La mitocondria es el orgánulo más estudiado al momento de entender la fisiología y fisiopatología celular. Este orgánulo es de aspecto variable (tubular, ovalado, esférico) cuyo tamaño oscila entre 0,5 – 1,0 μm de diámetro y 1 – 7 μm de longitud. Presentan una estructura con dos compartimentos bien definidos, matriz y espacio intermembrana, delimitados por dos membranas, interna y externa, con características morfológicas y funcionales muy diferentes. En la matriz se localizan varias copias del genoma circular mitocondrial, los ribosomas y numerosos complejos enzimáticos necesarios tanto para las funciones energéticas, como para la expresión y la replicación de genes. En el espacio intermembrana se localizan las enzimas que median el tránsito de sustancias entre la matriz mitocondrial y el citosol, y alguno de estos complejos presenta actividad quinasa. Del mismo modo, sus membranas ofrecen también diferencias significativas. La membrana interna se caracteriza morfológicamente por presentar unas invaginaciones denominadas “crestas”, con multitud de complejos enzimáticos (los componentes de la cadena transportadora de electrones, entre los cuales encontramos a la ATP sintasa) y proteínas que regulan el paso de metabolitos. La membrana mitocondrial interna resulta especialmente impermeable a iones gracias a su alto contenido del fosfolípido cardiolipina, característica esencial que le permite soportar el gradiente electroquímico necesario para el desempeño de la función energética. Por el contrario, la membrana externa carece de crestas mitocondriales y, en condiciones fisiológicas, es permeable al paso de iones y de metabolitos con pesos moleculares inferiores a 6 kDa (1).

Se estima que las mitocondrias proveen el 90% del ATP total a la célula. A través de la fosforilación oxidativa, los complejos mitocondriales I a IV producen un gradiente de protones a través de la membrana interna de las mitocondrias y el complejo V convierte el ADP en ATP utilizando la energía del potencial de membrana (2). Además, desempeñan un papel principal en la regulación de la homeostasis del Ca^{+2} celular, por lo que su correcta función es vital para el mantenimiento y supervivencia de la célula. Para poder sostener esta

producción de ATP, la mitocondria debe mantener una estricta regulación de la permeabilidad de membrana interna la cual a través de muchos estudios se sabe que se pierde producto de la exposición a eventos estresantes como los que se desatan en un proceso isquémico.

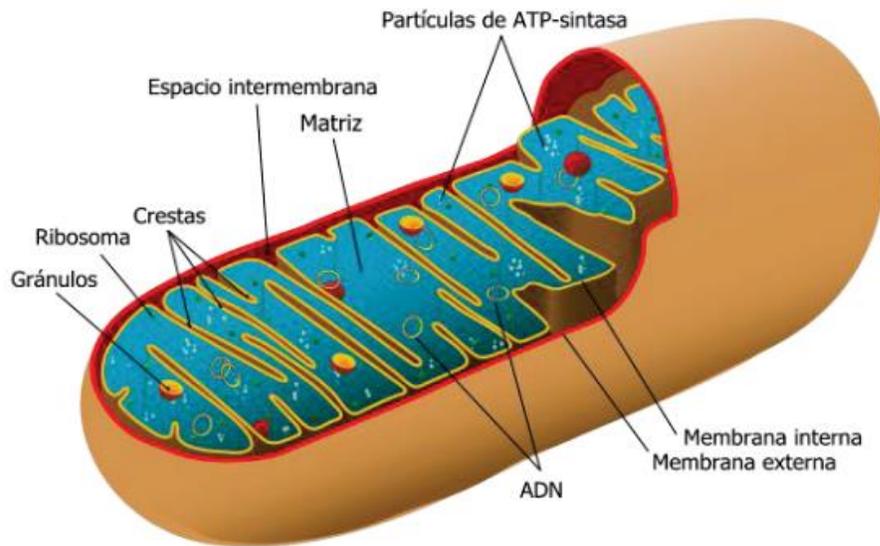


FIGURA 1. Estructura de una mitocondria. Tomado de Perez (2014) (1).

3.1 ISQUEMIA REPERFUSIÓN

El conocimiento de los mecanismos del daño en isquemia reperfusión (IR) es de gran interés, ya que participan en la fisiopatología de varias situaciones clínicas como el infarto miocárdico, hipertensión arterial, aterosclerosis, dislipidemia y diabetes mellitus (3). En el hígado, el daño por IR está asociado al trasplante, cirugía hepática resectiva o de reconstrucción vascular y trauma (4).

En la injuria de reperfusión encontramos involucrados 4 mecanismos: 1) Disminución de fosfatos de alta energía. 2) Producción de radicales libres. 3) Inadecuada reperfusión tisular. 4) Sobrecarga de Ca^{+2} .

La disminución de fosfatos de alta energía esta ocasionada por un desbalance entre la reposición y el consumo de ATP, lo cual se encuentra asociado a disminución del flujo tisular de electrones mitocondriales producto de la disminución del PO_2 tisular. En cuanto a la producción de radicales libres, estos son producidos por neutrófilos y mastocitos activados, y son muy tóxicos, produciendo disfunción de los orgánulos intracelulares, básicamente por 3 mecanismos (peroxidación de las membranas lipídicas, desnaturalización de enzimas y disfunción de orgánulos). La inadecuada reperfusión también denominada síndrome de no re-flujo, causa que el tejido isquémico no logre alcanzar los niveles de flujo existentes antes de someterse a la isquemia. Este fenómeno puede ser ocasionado por trombosis microvascular, daño endotelial o tapones leucocitarios o plaquetarios. Por último, la sobrecarga de Ca^{+2} es secundaria a la recaptación por deterioro en la actividad del retículo sarcoplásmico. Este aumento de calcio activa la fosfolipasa y otras enzimas degradantes, que contribuyen de manera importante al daño tisular (5).

Abundante evidencia ha demostrado que durante la isquemia y posterior reperfusión, eventos moleculares de naturaleza variable pueden determinar la permeabilización de la membrana mitocondrial interna (6). La sobrecarga de Ca^{+2} y la producción excesiva ROS en los primeros minutos de reflujo desencadenan la apertura del mPTP (7-9).

Griffiths y Halestrap encontraron que en el corazón de rata aislado, el mPTP permanece cerrado durante la isquemia pero se abre en el momento de la reperfusión (10). De esta forma, dependiendo del número de mitocondrias afectadas por este fenómeno, la célula puede entrar en proceso de muerte celular tanto apoptótica como necrótica, lo que en suma determinará la pérdida de cardiomiocitos (11). Por ende, la necrosis miocárdica que se produce secundaria a la reperfusión incluye la apoptosis y necrosis tanto de cardiomiocitos como de células

endoteliales en un porcentaje más alto de lo esperado, lo que evidencia la pérdida de beneficios de la reperfusión miocárdica (12).

El estudio de Hansson y col (2011) demostró que tanto el cerebro humano como las mitocondrias del hígado exhiben varias características clásicas del fenómeno mPTP después de la sobrecarga de Ca^{+2} (13).

3.2 PORO DE TRANSICION DE PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL

Se postula que a nivel mitocondrial producto de diversas patologías, entre ellas la isquemia reperfusión, se generaría la apertura del mPTP propuesto gracias a los primeros estudios de Haworth y Hunter, el cual sería responsable de la transición de permeabilidad con un umbral de 1,5 kDa (14), lo cual más tarde fue confirmado por Crompton y Costi en 1988, estableciendo además que en su estado abierto el canal mPTP debe obtener un diámetro de 2-2,6 nm (7).

La asociación que se propone entre los eventos desatados en procesos de isquemia reperfusión con el mPTP, establecen que este último sería el responsable de la inflamación de los orgánulos celulares, el desacoplamiento de la cadena respiratoria, la detención de la síntesis de ATP mitocondrial, la ruptura y consiguiente muerte celular, actuando como un punto clave en la mediación de la disfunción cardíaca y la muerte celular (6).

Se establece que este poro estaría inserto en la mitocondria pasando por la membrana mitocondrial externa, espacio intermembrana y membrana mitocondrial interna. Diversas investigaciones han llevado a proponer que los principales reguladores de este poro serían el canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC), el translocador de nucleótidos de adenina (ANT) y la ciclofilina D (CypD), el primero ubicado en la membrana externa de la

mitocondria y los dos últimos ubicados en la membrana interna (15). A su vez la apertura de este poro se vería favorecida con el Ca^{+2} , ROS y fosfato inorgánico (Pi) y a su vez, se vería inhibido por ADP, una disminución del pH y principalmente por la CsA (16).

Estudios posteriores demostraron que la CypD correspondía a una proteína de la matriz mitocondrial, por ende, ella no sería capaz de generar el poro, sino que más bien participaría en la apertura de este, inducido por un estímulo de Ca^{+2} . También se logró identificar que el poro aún se producía, si se eliminaba a ANT. Por ende, se concluyó que estos participarían en la actividad funcional del mPTP, pero no serían directamente quienes gatillarían su formación (17).

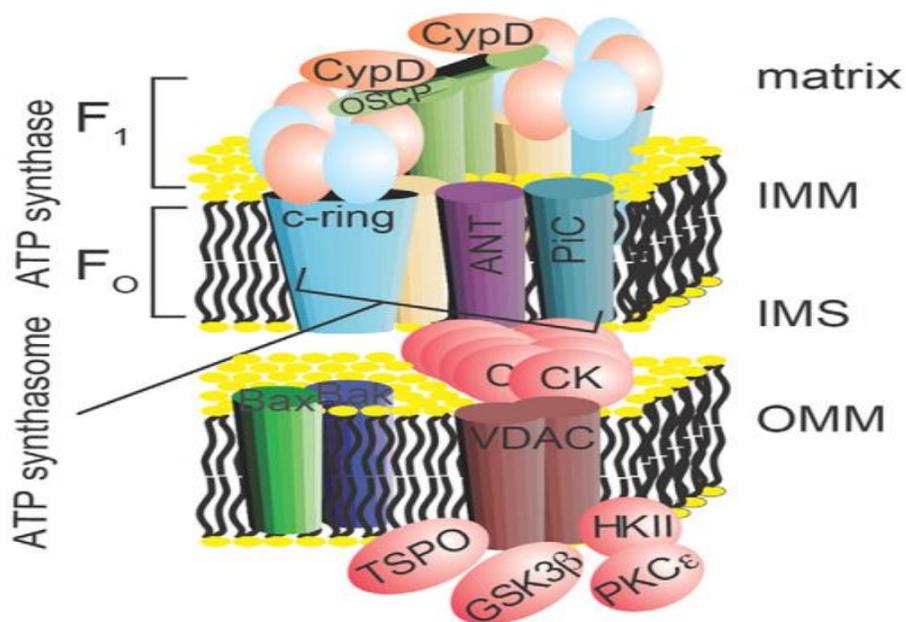


FIGURA 2. Modelo para la estructura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP). Se aprecian los principales componentes del mPTP donde destaca la presencia de ANT y CypD en la membrana interna mitocondrial y VDAC en la membrana externa mitocondrial. (Tomado y modificado de Morciano, 2015) (18).

3.3 ELEMENTOS CONSTITUYENTES DEL mPTP

La naturaleza del complejo mPTP ha sido debatida durante mucho tiempo y hasta el momento no se ha acordado una configuración molecular definitiva (19).

En primera instancia se consideró a CypD como un regulador del mPTP. Esta corresponde a una ciclofilina de 21 kDa localizada en la matriz mitocondrial, la cual cataliza la isomerización cis-trans de los enlaces peptidil-prolilo en las proteínas dianas (17). Se descubrió a través de la utilización de un inmunosupresor conocido como CsA. Esta es una molécula que reduce la hinchazón mitocondrial, razón por la que se concluyó que inhibía a CypD (20).

Estudios demostraron que las mitocondrias que carecían de CypD tenían sensibilidad reducida al Ca^{+2} y a la apertura de mPTP inducida por estrés oxidativo. Sin embargo, otros estudios establecen que, a altos niveles de Ca^{+2} , la transición de la permeabilidad todavía podía ser provocada lo que propuso que CypD no correspondía a un regulador, sino que más bien su presencia en este poro controlaría la sensibilidad de la apertura relacionada al Ca^{+2} . Aún con este último hallazgo, la evidencia farmacológica y genética reconoce a CypD como el único modificador de proteínas universalmente aceptado y un regulador positivo clave en la apertura del mPTP (17), pero no sería considerada un componente estructural.

A su vez el VDAC se propuso como el componente de la membrana externa del mPTP debido a que sus propiedades electrofisiológicas eran similares a las de mPTP (21), pero a través de estudios genéticos se determinó que las isoformas de VDAC no generaban cambios en relación a la conformación y apertura del poro concluyendo finalmente que VDAC no correspondería ni a un regulador ni a un componente esencial del mPTP (22).

El ANT (32 kDa), forma parte de la membrana interna y su función es importar el ADP en la matriz mitocondrial a cambio de ATP (23). Por su asociación directa con CypD este también había sido propuesto como regulador, pero finalmente a través de un estudio en el cual se bloqueó su presencia en células hepáticas, se determinó que no se comportaba como el elemento formador del poro, ya que aún sin su presencia estas células lograban producir el poro (24).

Además, se encuentra presente la proteína traslocadora (TSPO), que también es conocida como receptor periférico de benzodiazepinas. Esta es una proteína de membrana mitocondrial externa que se sugirió inicialmente para regular la función del mPTP debido a los efectos de los ligandos TSPO sobre la apertura del poro (25). También se descubrió que TSPO se asocia con VDAC y ANT vinculando así a TSPO directamente a los componentes reguladores del mPTP (26). Es así como TSPO ha sido propuesta para desempeñar un papel clave en la formación del mPTP y se ha asociado con la muerte celular a través de su participación en la formación del poro en muchas enfermedades humanas (27).

Existe otra investigación en donde el papel de la TSPO en la función del mPTP se probó críticamente a través de la generación de ratones en los que el gen que codifica la TSPO se había eliminado condicionalmente. Los resultados mostraron que (i) la TSPO no desempeña ningún papel en la regulación o estructura del mPTP, (ii) los ligandos endógenos y sintéticos de la TSPO no regulan la actividad de la mPTP a través de la TSPO, (iii) la regulación de la actividad del poro por parte de la membrana mitocondrial externa se produce mediante un mecanismo que no requiere TSPO y (iv) que los corazones que carecen de TSPO son tan sensibles a la lesión por isquemia reperusión como los corazones de ratones wild type (WT). Estos resultados ponen en tela de juicio una amplia variedad de estudios que implican la TSPO en una serie de procesos patológicos a través de sus acciones en el mPTP y eliminan a la TSPO en la formación o regulación del poro. (28)

3.3.1 F₀ F₁ ATP SINTASA

Lo que ha tomado mayor relevancia en el último tiempo como componente central del poro en la membrana interna es la F₀ F₁ ATP sintasa, la cual corresponde a un complejo enzimático de múltiples subunidades que acopla las traslocaciones de protones a través de la membrana interna a la síntesis de ATP. Está compuesta por dos dominios, el dominio F₀ que se encuentra incrustado en la membrana interna mitocondrial y el F₁ corresponde a el dominio catalítico, ambos se encuentran conectados por tallos centrales y periféricos (29).

Se ha demostrado que la F₀ F₁ ATP sintasa mitocondrial interactúa con ANT y el portador de fosfato mitocondrial para formar complejos multiproteicos que catalizan los pasos finales de la síntesis de ATP, además de CypD quien sería un regulador de la síntesis de ATP mitocondrial, producto de una interacción física con la F₀ F₁ ATP sintasa (30), en un evento favorecido por Pi e inhibido por CsA (31). La subunidad de la proteína que confiere sensibilidad a la oligomicina (OSCP) del complejo F₀ F₁ ATP sintasa se ha propuesto como el sitio de unión a CypD (32).

A su vez el knockout global del uniporter de Ca⁺² mitocondrial aumenta la fosforilación de CypD y su asociación con la F₀ F₁ ATP sintasa, reduce la capacidad de retención de Ca⁺² y contribuye a la falta de cardioprotección observada después de la lesión por isquemia reperfusión (33). En base a esto, también se plantea que la permeabilización de la membrana mitocondrial externa sería el reflejo de la cascada de eventos por los cuales las señales letales que se originan en el microambiente intracelular se traducen en la muerte celular apoptótica. Los hallazgos más recientes establecen que la subunidad c de la F₀ ATP sintasa sería necesaria para la fragmentación mitocondrial impulsada por la permeabilización de la membrana externa producto de la sobrecarga de Ca⁺² citosólico y el estrés oxidativo (30).

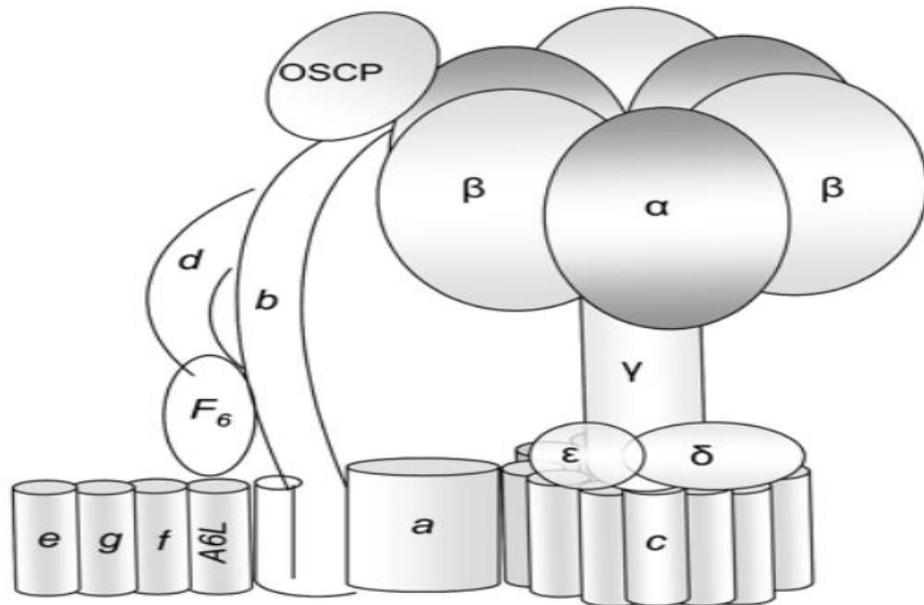


FIGURA 3. Estructura de la ATP sintasa de mamíferos. Parte inferior de la imagen, contempla la subunidad F_0 de la ATP sintasa incrustada en la membrana interna mitocondrial. Parte superior de la imagen contempla la subunidad F_1 , es decir la subunidad catalítica de la ATP sintasa. (Tomado y adaptado de Cano, 2011) (34).

Una investigación realizada por Giorgio y col (2013), plantea que los dímeros de la $F_0 F_1$ ATP sintasa incorporados en bicapas lipídicas formarían canales activados o dependientes de Ca^{+2} que podría ser potencialmente el mPTP (32).

Lo anterior llevo a que posteriormente Alavian y col (2014) realizaran una investigación centrada en la subunidad c de la ATP sintasa presente en la subunidad F_0 , en donde purificaron la subunidad c y la restituyeron *in vitro* con el objetivo de ver como se comportaba frente a la administración de Ca^{+2} , donde proponían que la subunidad c del dominio F_0 constituía un canal dependiente de voltaje y que su apertura persistente llevaba a la despolarización rápida e incontrolada de la membrana interna mitocondrial en las células. Finalmente concluyeron que el poro molecular buscado por tanto tiempo del mPTP sería un canal iónico localizado dentro del anillo de la subunidad c de la ATP sintasa de mamíferos, que estaría expuesto durante la desestabilización de las subunidades de la ATP sintasa. A su

vez, plantean que al agotar la subunidad c se lograría disminuir la toxicidad y la muerte inducida por ROS. Distintas mutaciones en los dominios transmembrana aflojarían el empaquetamiento de la subunidad c aumentando la conductancia de este canal y predisponiendo a las células a la muerte resistente a la CsA, evidenciando que el anillo de la subunidad c estaría situado de tal manera que regularía tanto el metabolismo como la muerte celular (35).

En este contexto, el mPTP representaría un canal iónico dependiente de Ca^{+2} que se origina a partir de la $\text{F}_0 \text{F}_1$ ATP sintasa que es altamente favorecido por la formación de enlaces disulfuro durante el estrés oxidativo (36).

Si bien se han propuesto varias estructuras como formadoras del mPTP, lo que si genera consenso es que este poro es un canal de alta conductancia de la membrana mitocondrial interna sensible a la CsA, que se abre de forma transitoria en condiciones fisiológicas, posiblemente actuando como un canal de liberación de Ca^{+2} mitocondrial, ayudando a mantener la homeostasis celular (37). Sin embargo, en condiciones patológicas, el mPTP se abre persistentemente y produce consecuencias fatales como la despolarización de la membrana mitocondrial interna, la liberación desregulada de Ca^{+2} desde la matriz, la terminación de la fosforilación oxidativa, la hinchazón y eventualmente, la ruptura de la membrana mitocondrial externa con la liberación de proteínas apoptóticas resultando todo esto en la muerte celular (38, 39).

Frente a este escenario se ha vuelto necesario seguir estudiando el anillo de la subunidad c de la F_0 ATP sintasa, ya que hasta el momento es el mayor avance en cuanto al conocimiento de la posible regulación y actividad del mPTP.

3.4 OPCIONES FARMACOLOGICAS PARA LA INHIBICION DEL mPTP

Actualmente el único tratamiento disponible para reducir el tamaño del infarto y para mejorar el resultado clínico después de procesos de isquemia, sigue siendo la restauración lo más rápidamente posible del flujo sanguíneo (reperfusión). Sin embargo, la eficacia de esta estrategia clínica es limitada, debido a que la restauración del flujo sanguíneo genera como ya se expuso anteriormente, lesiones celulares. Estas lesiones están relacionadas principalmente con la afluencia celular masiva de Ca^{+2} y la producción de ROS.

Han transcurrido 30 años desde el descubrimiento de que la CsA inhibe la apertura del mPTP *in vitro* (15), describiendo que el tratamiento con este fármaco confiere notable protección contra la lesión miocárdica aguda inducida por reperfusión post isquémica (38). Esto se logra gracias a la inhibición de CypD.

3.4.1 CICLOSPORINA A

La primera demostración del impacto de la inhibición de CypD en la apertura de los poros se realizó mediante la observación de que la CsA, un agente inmunosupresor que se dirige a todas las ciclofilinas, donde logra proteger a las mitocondrias del daño inducido por la acumulación masiva de Ca^{+2} y estrés oxidativo, lo cual se ve reflejado en la inhibición de la apertura de mPTP. La CsA se une fuertemente a las ciclofilinas e inhibe la actividad peptidil-prolil-cis-trans-isomerasa. En las mitocondrias, la interacción de CsA y CypD da como resultado la inhibición de la actividad peptidil-prolil-cis-trans-isomerasa y la incapacidad de CypD para unirse a proteínas de membrana. Esto resulta en el cierre de los poros. Dada las observaciones realizadas por Crompton y col (1988) (15), se ha demostrado que la CsA es protectora en varios modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, aunque se informaron varios fallos en animales más grandes (9).

El primer estudio piloto pequeño de fase II y el seguimiento limitado de pacientes aleatorizados al tratamiento con CsA en el momento de la intervención coronaria percutánea, identificó una reducción significativa del tamaño del infarto y mejoras en las funciones cardiacas (40). Desde entonces, varios ensayos pequeños también han identificado beneficios en el tratamiento con CsA en la lesión miocárdica posoperatoria (41, 42).

En modelos preclínicos de apertura de mPTP en la lesión por reperfusión isquémica en el corazón, la CsA demuestra un estrecho rango de concentración efectiva, con cardioprotección observada a 0,2 μM mientras que el beneficio se pierde a concentraciones por encima de 0,4 μM en modelos de privación de glucosa anóxica y en corazones perfundidos por Langendorff *ex vivo* (43, 44).

Si bien el mPTP es claramente un objetivo para los medicamentos, los inhibidores más allá del compuesto prototipo CsA, en sí mismo están limitados por los efectos fuera del objetivo y la baja eficacia terapéutica (45).

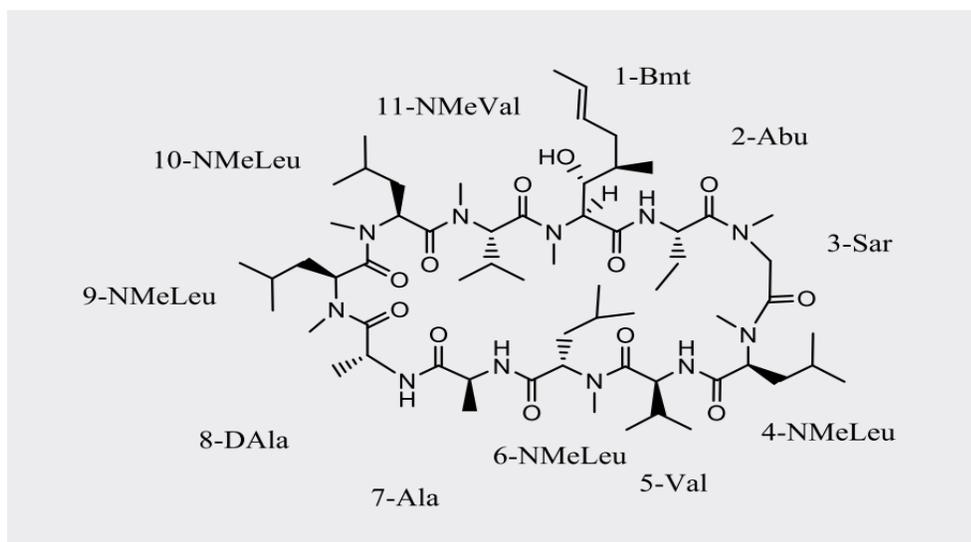


FIGURA 4. Estructura química de la ciclosporina A. Inmunosupresor, inhibe la formación y apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (mPTP). (Tomado y adaptado de Briston, 2019) (45).

3.4.2 SANGLIFEHRIN A

También se ha propuesto como potencial agente farmacológico de inhibición de CypD a Sanglifehrin A (SfA). Este es un producto natural de gran peso molecular aislado de *Streptomyces sp* que se une tanto a CypD como a CypA por ende es considerado un inhibidor no específico de ciclofilinas. Este polipéptido cíclico ejerce actividad inmunosupresora independiente de la interacción de la calcineurina. En comparación con la CsA este se une de forma diferente a CypD y muestra una importante diferencia en su mecanismo de acción. De hecho, SfA inhibe la función peptidil-prolil-cis-trans-isomerasa pero no inhibe la unión de CypD a las membranas mitocondriales y especialmente a ANT (46). De esta forma se establece que SfA inhibe la apertura de mPTP con la misma potencia que la CsA, pero estableciendo que la principal estrategia de inhibición del poro sería la inhibición de la actividad peptidil-prolil-cis-trans-isomerasa.

Tanto SfA como CsA y sus análogos, están limitados por las propiedades fisicoquímicas deficientes (solubilidad acuosa, alto peso molecular), poli farmacología y citotoxicidad (sobre todo nefrotoxicidad) (45).

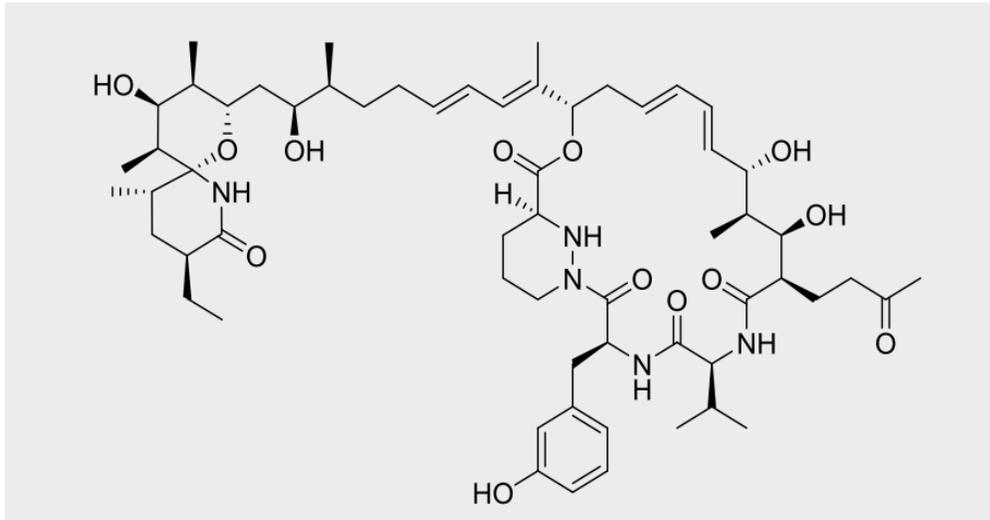


FIGURA 5. Estructura química de Sanglifehrin A. Equipotente a ciclosporina A. Inhibe la actividad peptidil-prolil-cis-trans-isomerasa. (Tomado y adaptado de Briston, 2019) (45).

Los inhibidores de CypD cambian el umbral para la apertura de mPTP a una mayor carga de Ca^{+2} , pero no suprimen completamente la apertura de mPTP (17). Es así como se ha determinado que, si bien la búsqueda de fármacos que inhiban a CypD pueden presentar un cierto grado de inhibición del poro, luego presentan efectos secundarios producto de que en condiciones fisiológicas se requiere de la actividad de CypD. Por lo tanto, el desarrollo de inhibidores de mPTP con un mecanismo distinto de la inhibición de CypD es atractivo.

En los últimos 5 años, varios grupos han identificado inhibidores de moléculas pequeñas del mPTP, químicamente distintas, que abren vías para el descubrimiento y desarrollo de fármacos que tendrán un amplio potencial terapéutico (45).

3.4.3 TRO40303

Se ha propuesto otro fármaco que tiene una diana diferente a los anteriores en el mPTP, el cual corresponde a TRO40303, el cual tiene como blanco a la proteína traslocadora de 18 kDa (TSPO) ubicada en la membrana mitocondrial externa (47).

TRO40303 se utilizó inicialmente en un ensayo que tenía como objetivo identificar pequeñas moléculas que lograran mantener la supervivencia de las neuronas (48). TRO40303 se liga específicamente al sitio de colesterol de TSPO y exhibe propiedades citoprotectoras en diversos tipos de células. TRO40303 ha demostrado inhibir la apertura de mPTP inducida por el estrés oxidativo *in vitro* y después de una lesión de reperfusión *in vivo* en cardiomiocitos aislados (47). A de tenerse en cuenta que TRO40303 no disminuye la sensibilidad a calcio mitocondrial, lo que indica que podría inhibir la abertura de mPTP por un mecanismo indirecto de acción. Sin embargo, en experimentos donde utilizaron ratones condicionales para TSPO knock out, Šileikytė y col (2014), concluyeron que la TSPO no tenía ningún papel en la formación, regulación o muerte celular mediada por mPTP (28).

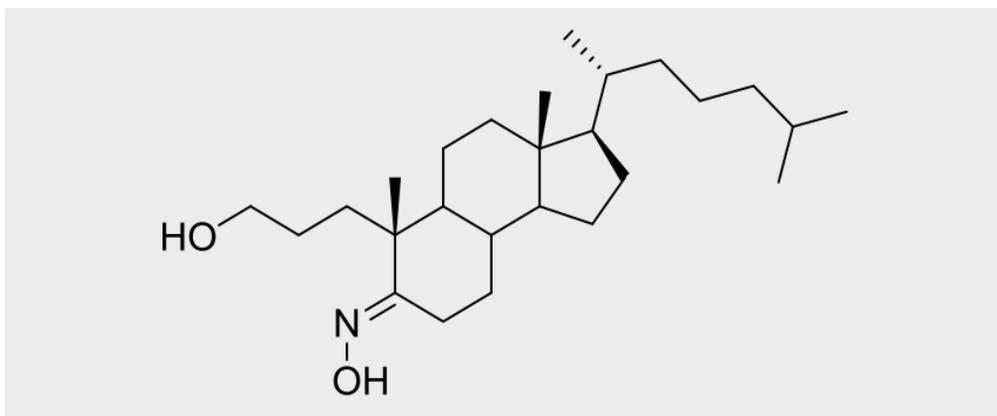


FIGURA 6. Estructura química de TRO40303. Inhibidor de la proteína traslocadora (TSPO) a través de su interacción con el sitio de unión a colesterol de dicha proteína. (Tomado y adaptado de Briston, 2019) (45).

3.4.4 *N*-(3-CLORO-2-METILFENIL)-5-(4-FLUORO-3-HIDROXIFENIL) ISOXAZOL-3-CARBOXAMIDA

El análisis de 363.827 moléculas del Repositorio de Moléculas Pequeñas de Bibliotecas Moleculares del Instituto Nacional de la Salud (NIH) en un ensayo de *swelling* mitocondrial inducido por Ca^{+2} identificó el quimiotipo de isoxazol como un posible "éxito". La relación estructura-actividad (SAR), identificó a *N*-(3-cloro-2-metilfenil)-5-(4-fluoro-3-hidroxifenil) isoxazol-3-carboxamida con inhibición equipotente a la de CsA en la apertura de mPTP inducida por Ca^{+2} . Este compuesto demostró una unión a proteínas plasmáticas humanas aceptable y una unión muy alta a proteínas plasmáticas de ratón. La evaluación del metabolismo *in vitro* reveló una muy buena vida media en plasma humano, mientras que se observó una vida media pobre en plasma de ratón. De manera similar se observó una mayor estabilidad del compuesto en los microsomas hepáticos humanos, en relación con la estabilidad observada en los microsomas hepáticos de ratón (49).

Se confirmó que el *N*-(3-cloro-2-metilfenil)-5-(4-fluoro-3-hidroxifenil)isoxazol-3-carboxamida no interfiere con el potencial de membrana mitocondrial interna, no afecta la función inherente de la F₀F₁ ATP sintasa ni afecta la viabilidad celular a concentraciones efectiva, además de mejoras en la función y estructura en la distrofia muscular congénita asociada con una mutación del colágeno VI en un modelo de pez cebra (49).

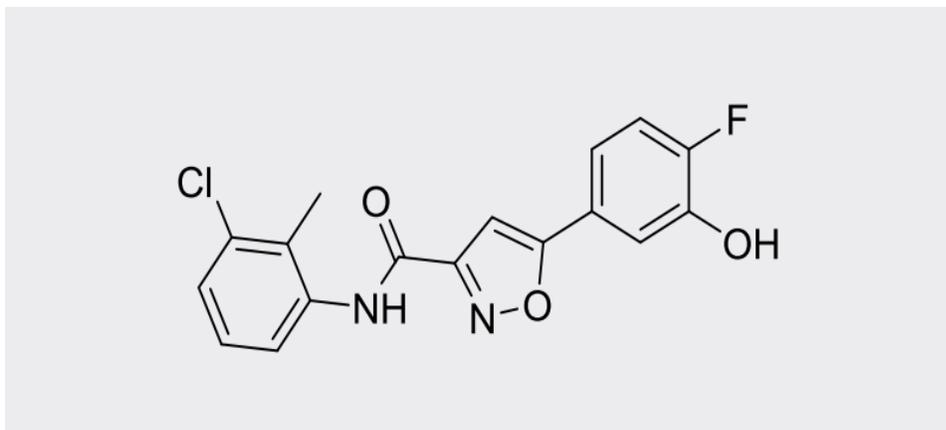


FIGURA 7. Estructura química de *N*-(3-cloro-2-metilfenil)-5-(4-fluoro-3-hidroxifenil)isoxazol-3-carboxamida. Contiene un anillo fenilo en la posición 5 de la unidad de isoxazol y una funcionalidad de anilida fuera de la posición 3. (Tomado y adaptado de Briston, 2019) (45).

3.4.5 ML 404

El isoxazol ML 404 también se identificó a través del Programa de Bibliotecas Moleculares de los NIH como un inhibidor muy potente de la apertura de mPTP inducida por Ca⁺².

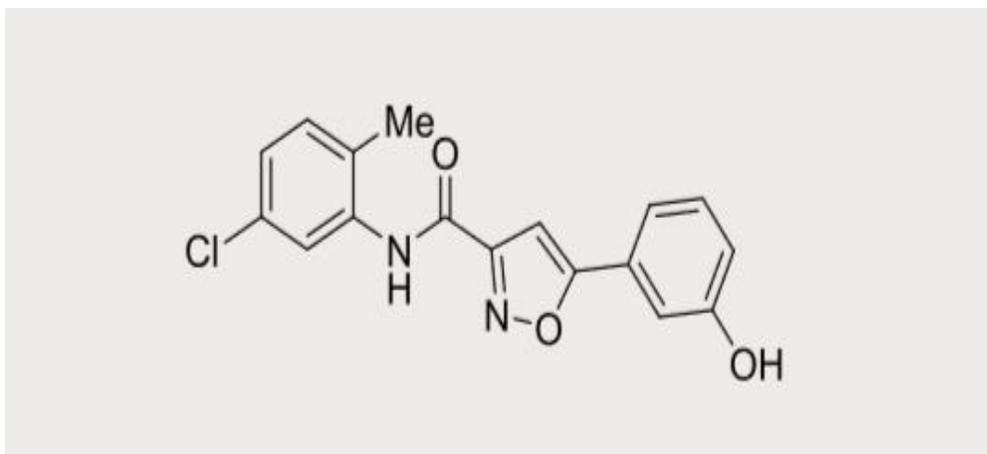


FIGURA 8. Estructura química de ML 404. Inhibidor del poro de transición de permeabilidad mitocondrial. (Tomado y adaptado de Briston, 2019) (45).

3.4.6 DS4417716

También se ha reportado evidencia de que el compuesto DS4417716 es capaz de inhibir la apertura mPTP inducida por Ca^{+2} en mitocondrias aisladas de ratón. Este corresponde a una molécula pequeña que protege las células hepáticas HepG2 humanas de la muerte inducida por Ca^{2+} con un nivel de protección similar a la CsA. El mecanismo inhibitorio de DS44170716 contra mPTP es independiente de peptidil-prolil cis-trans isomerasa F (PPIF), un objetivo de CsA, por ende, su efecto lo ejerce a través de un mecanismo diferente de este último. DS44170716 bloquea el flujo de Ca^{2+} en las mitocondrias al disminuir el potencial de membrana mitocondrial, mientras que inhibe potentemente las actividades del complejo III mitocondrial e inhibe débilmente las actividades de los complejos IV y V (2).

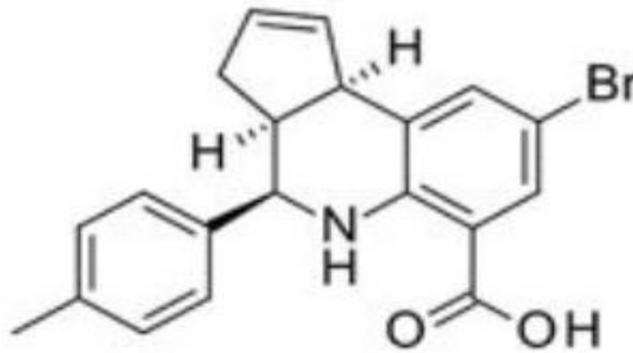


FIGURA 9. Estructura química de DS44170716. Tetrahidroquinolina, la cual posee un mecanismo inhibitorio del mPTP diferente a la CsA. (Tomado y adaptado de Kon, 2017) (2).

Si bien los esfuerzos iniciales dirigidos a la identificación de inhibidores potentes del mPTP han sido infructuosos, los cribados de alto rendimiento han dado como resultado la identificación de una serie de inhibidores del poro eficaces de alta potencia y selectividad. La acción sinérgica con CsA en cada caso argumenta fuertemente que el objetivo de cada clase de inhibidor no es CypD (50). Es por esto que los esfuerzos actuales deben seguir dirigidos a la búsqueda de moléculas pequeñas que tengan un efecto inhibitorio significativo sobre el mPTP.

3.5 ENSAYO DE HINCHAZÓN (*SWELLING*)

El ensayo de *swelling* se considera una técnica que permite medir la apertura del mPTP siguiendo la inflamación mitocondrial. En el estudio original de Haworth y Hunter (1979), encontraron que la apertura de mPTP dio lugar a un cambio conformacional en las mitocondrias aisladas, que fue acompañada por un edema, que puede ser seguido por la medición de los cambios en la dispersión de la luz. Por lo tanto, un ensayo común y conveniente para el mPTP es medir los cambios en la dispersión de la luz luego de la adición de Ca^{+2} a las mitocondrias (51).

La mayor permeabilidad de los solutos hacia el espacio de la matriz provoca un influjo de agua impulsada osmóticamente. La extensión concomitante de la membrana interna mitocondrial ("hinchazón") conduce a una transición de la matriz del estado agregado al ortodoxo, que culmina con la permeabilización y ruptura de la membrana mitocondrial externa (52).

Los estudios experimentales del proceso de inflamación mitocondrial a menudo utilizan poblaciones de mitocondrias aisladas, en las que el proceso de swelling se inicia mediante la adición de sustancias inductoras, naturalmente Ca^{2+} (53). Como ejemplo, el Ca^{2+} se transfiere a través de un uniporter a las mitocondrias, e induce el edema mitocondrial (54).

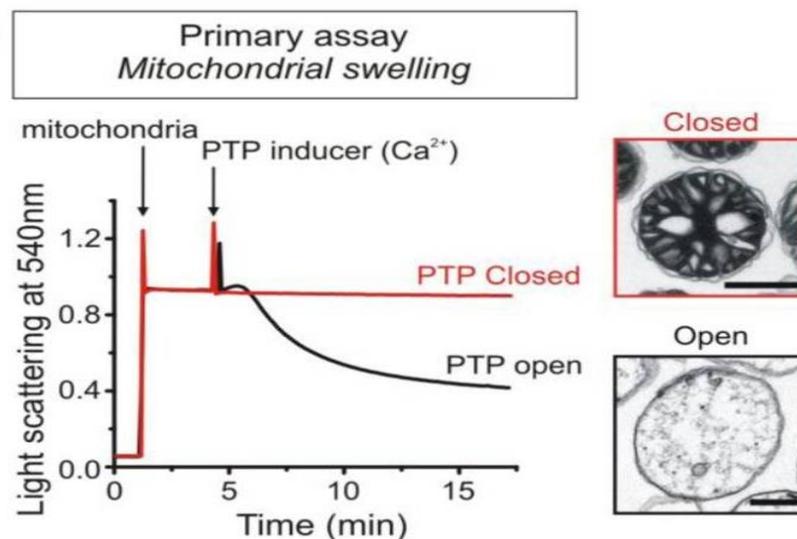


FIGURA 10. Ensayo de swelling. Panel izquierdo, los cambios en el volumen mitocondrial debido a la apertura de mPTP se miden como una disminución de la dispersión de la luz a 540 nm. Al agregarse la turbidez de la suspensión de mitocondrias, aumenta la dispersión de la luz. El Ca^{+2} induce la apertura del mPTP, lo que resulta en una disminución de la señal. Panel derecho, micrografías electrónicas de transmisión de mitocondrias aisladas de hígado de ratón que reflejan su forma antes y después de la aparición del mPTP. (Tomado y adaptado de Šileikytė y Forte) (50).

4. HIPÓTESIS

Moléculas híbridas de isoxazol y tetrahydroquinolina, inhiben el poro de transición de permeabilidad mitocondrial.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL:

Determinar la capacidad de las moléculas híbridas de isoxazol y tetrahydroquinolina para inhibir la formación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial.

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1° Establecer una metodología para medir la actividad del mPTP.

2° Evaluar la acción de cada molécula en estudio sobre el mPTP.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MODELO ANIMAL

Se trabajó con mitocondrias de hígado obtenidas de 12 ratas (9 hembras y 3 machos) del bioterio de la Universidad de Talca, destinadas a descarte. Estas ratas corresponden a la cepa Sprague Dawley. Todos estos ejemplares se mantuvieron bajo las condiciones estándares de bioética y bioseguridad que establece la normativa correspondiente al comité de bioética de dicha universidad.

6.2 SACRIFICIO DE LOS ANIMALES

Para el proceso de sacrificio de las ratas, estas se colocaron en un sistema cerrado en el cual previamente se depositó un algodón empapado con isofluorano (Baxter Healthcare Ltda, Puerto Rico). El isofluorano permite que el animal inhale el sedante y se adormezca, efecto que se refleja por un enlentecimiento en sus movimientos y pérdida del conocimiento, es vital observar que exista movimiento de la caja torácica como chequeo de signo vital. Este proceso duró aproximadamente tres minutos y medio, pero este depende del tamaño y edad del animal. Finalizado el proceso de sedación, se retiró la rata del sistema cerrado y se colocó sobre una bandeja para procedimientos quirúrgicos en donde se le inyectó intraperitonealmente 1 ml/kg de tiopental sódico (anestésico) y 0,3 ml/kg de heparina (anticoagulante), respetando todos los procesos de asepsia en la zona a puncionar, luego se evaluó el estado de conciencia mediante el reflejo otopodal del animal. Una vez que se corroboró que fue efectiva la acción del sedante y el anestésico, se procedió a pesar al animal para luego realizar una incisión a nivel del tórax y abdomen para realizar la extracción del hígado. El deceso del animal se indujo a través de la incisión a nivel del tórax (neumotórax), además de la hipovolemia producto de la extracción del hígado.

6.3 EXTRACCIÓN DE HÍGADO

Se preparó un vaso precipitado con 100 ml de suero fisiológico en donde se depositó el hígado recién extraído. Este proceso se realizó en hielo.

6.4 HOMOGENEIZADO

Una vez extraído el hígado, se colocó en una placa Petri y se realizó cortes de trozos pequeños. Previamente se preparó tres tubos khan con 3 ml de buffer de enfriamiento (300 mM sacarosa; 0,5 mM EGTA; 10 mM HEPES y 0,2 (p/v) albumina de suero de bovino [BSA]; pH 7,4) cada uno. Una vez obtenidos los trozos de hígado, se traspasó de forma equitativa a los tres tubos khan, para luego ser homogeneizados en el Ultra Turrax T25, IKA Labortechnik, todo el proceso de homogeneización se realizó en frío.

6.5 AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS

Posteriormente se realizó un proceso de centrifugación diferencial con el objetivo de aislar las mitocondrias. Para ello se traspasó el contenido de cada tubo khan a tubos eppendorf de 1.5 ml (6 tubos eppendorf). Luego se realizó la primera centrifugación a 800 rpm por 7 minutos a 4°C, en donde el sobrenadante se traspasó a tubos eppendorf para luego ser nuevamente centrifugados a 12000 rpm durante 7 minutos a 4°C, en cuanto al pellet este se almacenó en hielo. Finalizada esta centrifugación se obtuvo un segundo sobrenadante que se descartó en tubos eppendorf, en cuanto a este segundo pellet, este fue resuspendido en 1 ml de buffer N°2 (300 mM sacarosa; 10 μM EGTA y 10 mM HEPES; pH 7,4) para luego ser centrifugado a 12000 rpm por 7 minutos a 4°C. De esta última centrifugación se obtuvo un

tercer sobrenadante que fue colocado en tubos eppendorf, y el tercer pellet fue resuspendido en el buffer N°3 (300 mM sacarosa; 20 μ M EGTA y 10 mM HEPES; pH 7.4). Luego cada pellet tres resuspendido en buffer N°3 se trasvasijó a un tubo Falcon de 25 ml. Todo este proceso se realizó en frío.

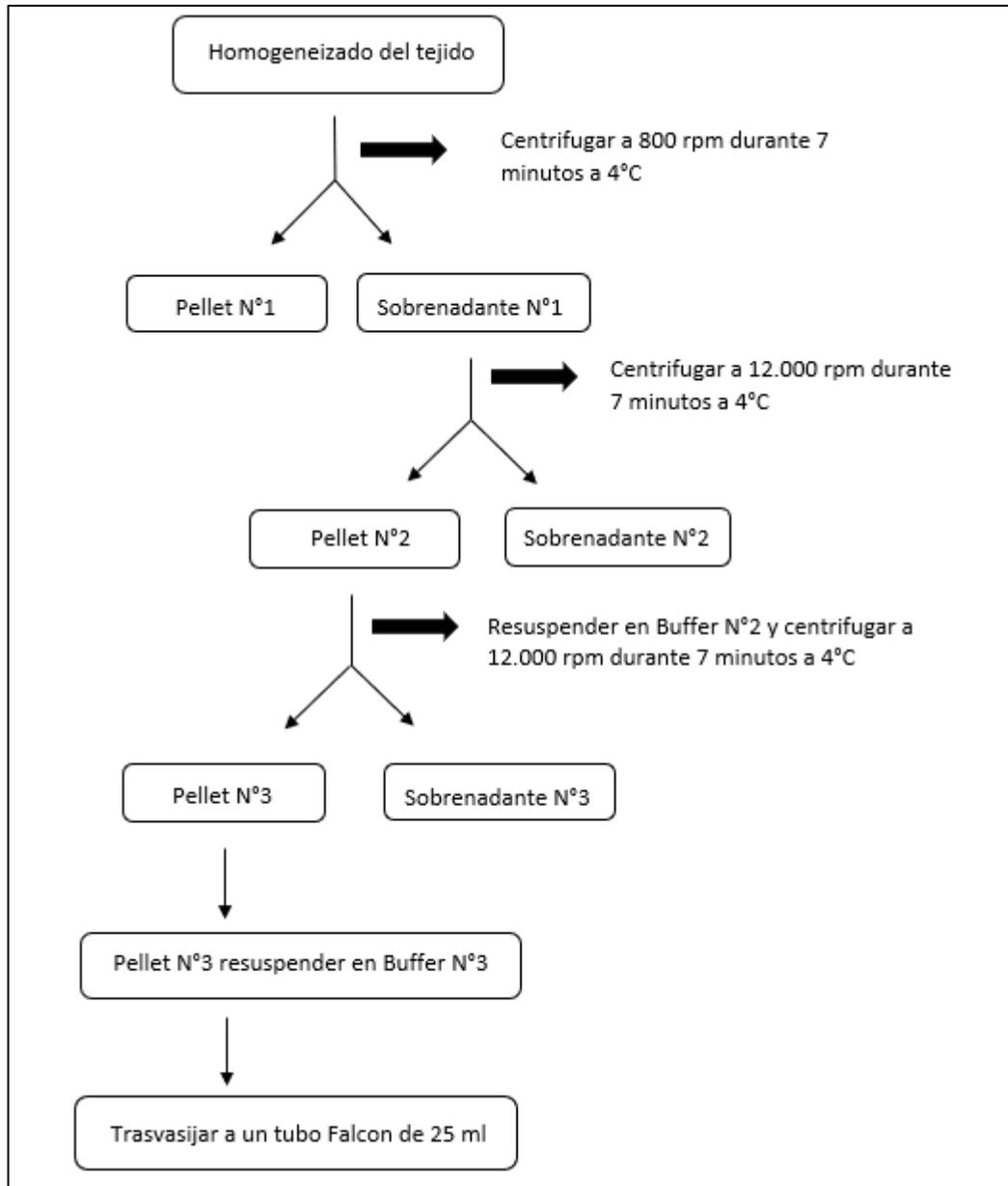


FIGURA 11. Diagrama de flujo para el aislamiento de mitocondrias.

6.6 CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS TOTALES

Se realizó la cuantificación de las proteínas presentes en el tubo Falcon de 25 ml incubado en hielo. Para la lectura de la muestra se preparó una dilución 1/10. Se realizó la cuantificación mediante el método de ácido bicinonínico BCA (*Protein Thermo Scientific Assay Kit*), en donde para la confección de la curva se utilizó un estándar de BSA a una concentración de 2 mg/ml. Los puntos utilizados y la absorbancia de cada uno se muestran en la tabla N°1. Cada punto de la curva al igual que las muestras con las fracciones mitocondriales se realizaron por duplicado. Se utilizó un volumen de muestra de 25 µL con 200 µL de reactivo de trabajo, una vez cargada la placa se agitó por 30 segundos y se incubó 30 minutos a 37°C, posteriormente se enfrió a temperatura ambiente. Se utilizó un equipo lector de placas *Multiskan GO Thermo Scientific*, el cual se programó a una temperatura de 37°C. Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 562 nm.

6.7 ENSAYO DE HINCHAZÓN MITOCONDRIAL (*SWELLING ASSAY*)

A partir de la muestra que contenían las fracciones mitocondriales (tubo Falcon de 25 ml), se realizó el ensayo de *swelling* mitocondrial. Previamente la muestra fue llevada a una concentración de 0,1 mg/ml y fue incubada 15 minutos a 37°C con el buffer de swelling (150 mM sacarosa; 50 mM KCl; 2 mM KH_2PO_4 ; 5 mM succinato de sodio y 20 mM Tris-HCl; pH 7,4) por duplicado, debido a que, por condiciones del equipo, la cubeta debía tener 2 ml de volumen final para que el haz de luz atravesara de forma efectiva la muestra. Posteriormente se llevó a cabo el ensayo utilizando un espectrofotómetro, el cual se programó a 37°C, con mediciones cinéticas cada 10 segundos durante 10 minutos a una longitud de onda de 520 nm. Una vez programado el equipo, se tomó un determinado volumen de muestra (mitocondrias) incubada con buffer de swelling (completando a un volumen final de 2 ml dependiendo de la concentración de CaCl_2 que se quiso estudiar) y al minuto 3 se le agregó la concentración de CaCl_2 deseada a partir de una solución previamente preparada de CaCl_2 40 mM, donde se probaron distintas concentraciones de CaCl_2 que fueron desde los 200 a los

1000 μM . Esta adición de CaCl_2 permite la inducción de la apertura del poro, por ende, aumenta la permeabilidad mitocondrial generando un incremento en la entrada de solutos a la matriz, lo que se refleja con una disminución de la absorbancia. Posteriormente se repite el mismo procedimiento de medición, pero con la diferencia de que previa a la adición de CaCl_2 , se le agregó las moléculas a estudiar. Se realizaron ensayos sin calcio (control negativo), con CsA (EMD Millipore Corporation) como control positivo, con 1-[2-(5-fenil-isoxazol-3-y1)-1,2,3,4-tetrahidro-quinolina-4-y1]-pirrolidin-2-ona ($\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2$; masa molar 359,16), con 1-[2-(5-Metil-isoxazol-3-y1)-6-nitro-1,2,3,4-tetrahidro-quinolina-4-y1]-pirrolidin-2-ona ($\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4$; masa molar 342.1) y con 1-(2-Isoxazol-3-y1-1,2,3,4-tetrahidro-quinolina-4-y1)-pirrolidin-2-ona ($\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2$; masa molar 283.13), siendo estas tres últimas las moléculas híbridas de isoxazol y tetrahidroquinolina a estudiar. Estos híbridos de isoxazoles y tetrahidroquinolina fueron proporcionados desde el Instituto de Química de Recursos Naturales a través de la Dra. Margarita Isabel Gutiérrez Cabrera.

6.8 FRACCIONES MITOCONDRIALES

De las muestras obtenidas a través del proceso de centrifugación diferencial, se tomó dos pellet y dos sobrenadantes de hígado. Estas muestras fueron analizadas mediante un Western blot, técnica que fue gentilmente facilitada por los estudiantes Carlos Manríquez Montecinos y Andrea Rojas Mendoza, alumnos memoristas de la escuela de Tecnología Médica perteneciente a la Universidad de Talca.

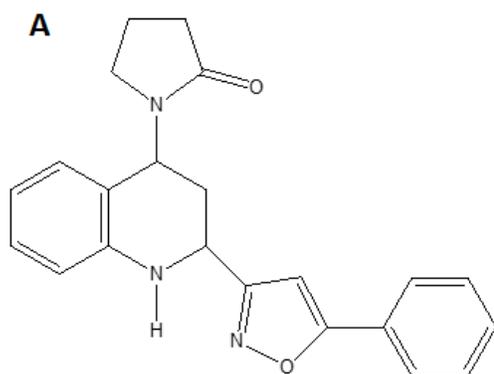
6.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores se expresaron como promedio \pm error estándar de la media. Se cuantificaron los deltas de absorbancia para cada registro (entre la lectura al minuto 3 y la lectura al minuto 10). Cada condición se evaluó por triplicado (de una misma preparación se evaluó 3 veces cada condición, determinando un promedio por día). Las comparaciones entre distintos

tratamientos se analizaron por test ANOVA de una o dos vías (comparaciones múltiples). Después de las comparaciones múltiples se realizaron pruebas post hoc a través del test Dunnett's y el test Tukey's. Valor $p < 0,05$. Los gráficos y análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software GraphPad Prism.

6.10 ESTRUCTURA QUÍMICA DE MOLÉCULAS HÍBRIDAS DE ISOXAZOL Y TETRAHIDROQUINOLINA

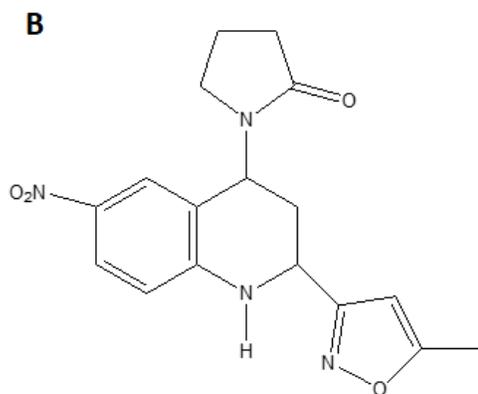
Se muestran las estructuras químicas de las moléculas híbridas de isoxazol y tetrahidroquinolina que se estudiaron en esta investigación como posibles inhibidores del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (Figura 12)



Molécula 1: 1-[2-(5-fenil-isoxazol-3-yl)-1,2,3,4-tetrahidro-quinolin-4-yl]-pirrolidin-2-ona

$C_{22}H_{21}N_3O_2$

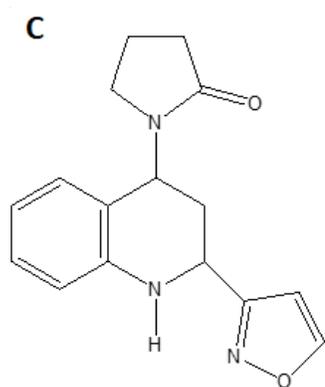
Masa molar: 359,16



1-[2-(5-Metil-isoxazol-3-yl)-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydro-quinolin-4-yl]-pirrolidin-2-ona

$C_{17}H_{18}N_4O_4$

Masa Molar: 342,13



1-(2-Isioxazol-3-yl-1,2,3,4-tetrahydro-quinolin-4-yl)-pirrolidin-2-ona

$C_{16}H_{17}N_3O_2$

Masa molar: 283,13

FIGURA 12. Estructura química de moléculas híbridas de isoxazol y tetrahydroquinolina. (A) Molécula 1. (B) Molécula 2. (C) Molécula 3.

6.11 PROTOCOLO

6.11.1 SACRIFICIO DEL ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

1. Para iniciar el proceso de sacrificio, la rata se debe colocar en un sistema cerrado (caja de plástico grande con tapa) el cual contenga en su interior un algodón empapado con isofluorano. Es vital observar que exista movimiento de la caja torácica para chequear que aún la rata sigue con vida. El proceso de sedación dura aproximadamente 3 minutos y medio, pero esto dependerá del tamaño y edad del animal.
2. Una vez sedado el animal, este se debe retirar del sistema cerrado y se debe colocar sobre una bandeja para procedimientos quirúrgicos.
3. De forma previa preparar dos jeringas, una con 1 ml/kg de tiopental sódico (anestésico) y otra con 0,3 ml/kg de heparina (anticoagulante). Se debe disponer de un algodón empapado con alcohol para realizar la desinfección en la zona donde se inyectará el anestésico y el anticoagulante. Además, se debe tener a disposición el material quirúrgico para realizar las incisiones en el animal (tijera y pinzas).
4. Una vez desinfectada la zona de inyección, con las pinzas levantar la piel del animal y colocar ambas inyecciones de forma intraperitoneal.
5. Evaluar el estado de conciencia del animal, esto se realiza mediante el reflejo otopodal (tomar una pinza y apretar desde la parte donde nace la cola del animal hasta el final de esta), el animal no debe presentar ningún reflejo frente a este estímulo, de presentarlo, se debe ingresar nuevamente al sistema cerrado (caja con isofluorano) por unos minutos más, posterior a esto evaluar nuevamente el estado de conciencia hasta que no haya respuesta al estímulo inducido con la pinza.
6. Corroborada la ausencia de reflejo otopodal, desinfectar el tórax y abdomen del animal con un algodón empapado en alcohol, para luego tomar las pinzas y levantar la piel del animal, luego con las tijeras realizar los cortes para quitar el pelaje, y una vez despejada el área de incisión, tomar la piel y comenzar a realizar los cortes, se debe retirar la zona esternal y en la zona abdominal para ubicar el hígado.

6.11.2 EXTRACCIÓN DEL HÍGADO

1. Disponer de un vaso precipitado de 100 ml con 60 ml de suero fisiológico para realizar un lavado del hígado. Este se debe mantener en hielo.
2. Ubicado el hígado, se debe tomar con la pinza y realizar la extracción ayudándose con las tijeras. Una vez que se ha retirado todo el órgano, incorporarlo en el vaso precipitado con suero fisiológico para lavarlo.

6.11.3 HOMOGENEIZACIÓN DEL TEJIDO

1. Realizar cortes de trozos pequeños de hígado. Este proceso se debe realizar en una placa Petri incubada en hielo.
2. Preparar 3 tubos khan de vidrio, cada uno con 3 ml de buffer de enfriamiento (300mM sacarosa; 0,5 mM EGTA; 10 mM HEPES y 0,2 (p/v) albumina de suero de bovino-BSA; pH 7,4).
3. Una vez trozado el órgano, traspasar el contenido de hígado a los tubos khan, se deben agregar aproximadamente 8 trozos pequeños de hígado a cada tubo.
4. Realizar la homogenización del tejido dispuesto en cada tubo khan. Para ello se debe tomar el tubo e introducirlo en un vaso precipitado de 100 ml que contenga la mitad de su capacidad con hielo. Luego se debe ir al Ultra Turrax T25, IKA Labortechnik (homogeneizador), colocar el seguro y colocar la potencia en el número 1, el tejido debe quedar completamente homogeneizado.

6.10.4 AISLAMIENTO MITOCONDRIAL (CENTRIFUGACIÓN DIFERENCIAL)

1. Preparar 6 tubos eppendorf y marcarlos como pellet N°1. Se deben traspasar 1.5 ml a cada tubo eppendorf a partir de los homogenizados que se encuentran en los tubos khan.
2. Colocar los 6 tubos eppendorf en la centrifuga, esta se debe programar a 800 rpm por 7 minutos a una temperatura de 4°C. Para alcanzar esta temperatura en la centrifuga se recomienda de forma previa hacer funcionar la centrifuga (sin las muestras) durante 7 minutos a 800 rpm.
3. Preparar 6 tubos eppendorf para recibir el sobrenadante que resultara de la centrifugación de los homogeneizados. Estos nuevos 6 tubos deben ser marcados como “sobrenadante N°1”
4. Los eppendorf que están marcados como sobrenadante N°1, se deben centrifugar a 12.000 rpm durante 7 minutos a una temperatura de 4°C.
5. Preparar 6 tubos eppendorf para recibir el sobrenadante que se obtendrá de la centrifugación anterior (sobrenadante 2).
6. Una vez extraído el sobrenadante del eppendorf marcado como “pellet N°1”, se debe resuspender el pellet que ahora será llamado pellet N°2 con 1 ml de buffer N° 2.
7. Una vez resuspendido, se debe centrifugar a 12.000 rpm durante 7 minutos a 4°C.
8. Preparar 6 tubos eppendorf para recibir el sobrenadante de la centrifugación anterior (sobrenadante 3).
9. Una vez extraído el sobrenadante 3, se debe resuspender el pellet obtenido (actualmente pellet N°3) en 1 ml de buffer N°3.
10. Traspasar el pellet N°3 resuspendido en buffer N°3 a un tubo Falcon de 25 ml en hielo.
11. Esquema del proceso de centrifugación diferencial se puede consultar en la figura 11.

6.10.5 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

1. Realizar la cuantificación de proteínas presentes en el tubo Falcon de 25 ml. Se debe preparar una dilución 1/10 de la muestra (180 μ l de agua destilada y 20 μ l de muestra).
2. Disponer de una placa de ELISA para la cuantificación.
3. Realizar la cuantificación mediante el método de ácido bicinconínico BCA (*Thermo Scientific Protein Assay Kit*), en donde para la confección de la curva se utiliza un estándar de albumina de suero bovino a una concentración de 2 mg/ml. Se recomienda realizar cada punto de la curva por duplicado.
4. Se debe utilizar un volumen de muestra de 25 μ l más 200 μ l de reactivo de trabajo para la cuantificación de proteínas (el reactivo de trabajo consta del reactivo A y el reactivo B, los cuales deben estar en una proporción de 50:1 respectivamente, para más detalle leer el inserto).
5. Una vez cargada la placa se debe agitar por 30 segundos y luego incubar a 37°C por 30 minutos. Posteriormente enfriar a temperatura ambiente por un minuto.
6. Previamente se debe programar el equipo para la lectura de las absorbancias.
7. Se debe utilizar el equipo lector de placas *Thermo Scientific Multiskan GO*. Para encender se debe presionar el botón que dice “ON”, se deben esperar unos minutos mientras se autoanaliza el equipo.
8. Encender el computador.
9. Una vez autoanalizado el equipo, este mostrará una pantalla blanca en donde se visualizan diferentes comandos para modificar como absorbancia, número de lecturas, etc, en este momento el equipo está listo para conectarlo al computador a través de su cable USB.
10. Conectar el USB al computador, en este momento la pantalla del equipo debe ponerse azul e indicar que el control se pasó al computador.
11. En el computador seleccionar el icono del programa del equipo (Skant Software 4.1).
12. Seleccionar “NUEVA SESIÓN”
13. Ir a “DISEÑO DE PLACA”, seleccionar los pocillos que se utilizaran para la medición. Además, en el tipo de muestra seleccionar “DESCONOCIDO”.

14. En protocolo, colocar la temperatura a 37°C que es la temperatura a la que se leerán las muestras, dirigirse a la parte superior izquierda de la pantalla y seleccionar “ABSORBANCIA” en donde se debe ingresar la longitud de onda (520 nm) a la cual se realizará la lectura.
15. En la parte inferior izquierda de la pantalla ajustar la temperatura del equipo a 37°C.
16. En la parte superior seleccionar extraer placa, para luego ingresar la placa cargada.
17. Seleccionar en la parte superior introducir placa.
18. Apretar “INICIO”.
19. El programa a continuación dará la opción de poner un nombre de registro de lo que se está midiendo.
20. Seleccionar continuar y en la pantalla aparecerá analizando.
21. Una vez finalizada la lectura por parte del equipo, dirigirse a informe y se obtendrá el registro de las absorbancias.
22. Extraer la placa del equipo.
23. Cerrar el programa.
24. Desconectar el USB del computador. El equipo se autoanalizará durante unos minutos, posteriormente debe aparecer la pantalla blanca con los mismos comandos que se presentaron al encender el equipo.
25. Interpolar la absorbancia en la curva para determinar la concentración.
26. Una vez determinada la concentración se debe pasar de µg/ml a mg/ml.

6.10.6 ENSAYO DE *SWELLING*

1. A partir de la muestra que contiene las fracciones mitocondriales (tubo Falcon de 25 ml), se debe realizar el ensayo de *swelling* mitocondrial.
2. Llevar la muestra a una concentración de 0,1 mg/ml (calcular los µl necesarios para alcanzar esta concentración) para luego incubarse 15 minutos a 37°C con un ml buffer de *swelling* (150 mM sacarosa; 50 mM KCl; 2 mM KH₂PO₄; 5 mM succinato de sodio y 20 mM Tris-HCl; pH 7,4) por duplicado, debido a que, por condiciones del

equipo, la cubeta debe tener 2 ml de volumen final para que el haz de luz atraviese de forma efectiva la muestra.

3. Transcurridos los 15 minutos de incubación a 37°C, realizar el ensayo de *swelling*.
4. Previamente programar el equipo a 37°C a una longitud de onda de 520 nm, en donde debe realizar lecturas cada 10 segundos por un periodo de 10 minutos (en total se deben registrar 62 lecturas).
5. Tomar una cubeta e incorporar los μl de muestra necesarios para el ensayo. Por ejemplo, si se quiere evaluar la apertura del mPTP con una concentración de CaCl_2 1000 μM a partir de una solución de CaCl_2 40 mM, se deben incorporar a la cubeta 1950 μl de muestra (mitocondrias con buffer se *swelling* ya incubadas durante 15 minutos).
6. Poner a cero el equipo, para luego incorporar la cubeta y dar inicio a las lecturas.
7. En la lectura 18 se debe agregar los μl de CaCl_2 necesarios para completar el volumen final de la cubeta que debe ser de 2 ml. Por lo tanto, como se mencionó anteriormente si se desea estudiar la apertura del poro inducida por una concentración de CaCl_2 1000 μM , se deben incorporar 50 μl de la solución 40 mM a la cubeta presente en el equipo, para ello se debe levantar la tapa y con una micropipeta incorporar de forma rápida los microlitros de CaCl_2 que se requieren para el ensayo.
8. Finalizada las 62 lecturas el equipo entregará una gráfica de las lecturas. Los datos de esta grafica pueden ser extraídos con un pendrive que se inserta en la parte lateral derecha del equipo, en donde al introducirlo en la pantalla del equipo aparecerá la imagen de un USB y dará la opción de “exportar datos” la cual se debe seleccionar para traspasar los datos de forma efectiva al pendrive.
9. Una vez exportados los datos, se recomienda introducir el pendrive a un computador para poner nombre a los archivos de lectura de los ensayos, para llevar un control y registro de las condiciones en las que se ha realizado cada medición, es decir si esta corresponde a un control, o a una molécula que se está probando en función de una concentración de Ca^{+2} específica, etc).
10. Si se requiere estudiar una molécula como posible inhibidor del mPTP, al momento de adicionar la muestra de mitocondria a una concentración de 0,1 mg de proteína/ml con 1 ml de buffer de *swelling*, se debe agregar los μl que lleven la concentración a la que se requiere probar la molécula. Ya adicionada al ml de buffer de *swelling* las

mitocondrias y la molécula a estudiar, estas se deben incubar a 37°C y se sigue el procedimiento de la misma forma que se describió anteriormente para llevar a cabo el ensayo de *swelling*.

11. Finalmente, cuando se terminen los ensayos de *swelling* del día, se debe apagar el equipo a través del botón “OFF” que se debe presionar por unos segundos para hacer efectiva esta última acción.

7. RESULTADOS

7.1 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Se determinó la concentración de proteínas de las fracciones mitocondriales a través de la curva de calibración de la tabla N°1.

TABLA 1. Curva de calibración. Datos correspondientes a la curva de calibración de proteínas, mediante el método BCA.

CONCENTRACIÓN DE ALBUMINA (µg/ml)	ABSORBANCIA
320	0.831
480	0,957
640	1,139
880	1,408
1120	1,695
1440	2,047
1680	2,303

CURVA DE CALIBRACIÓN DE PROTEÍNAS

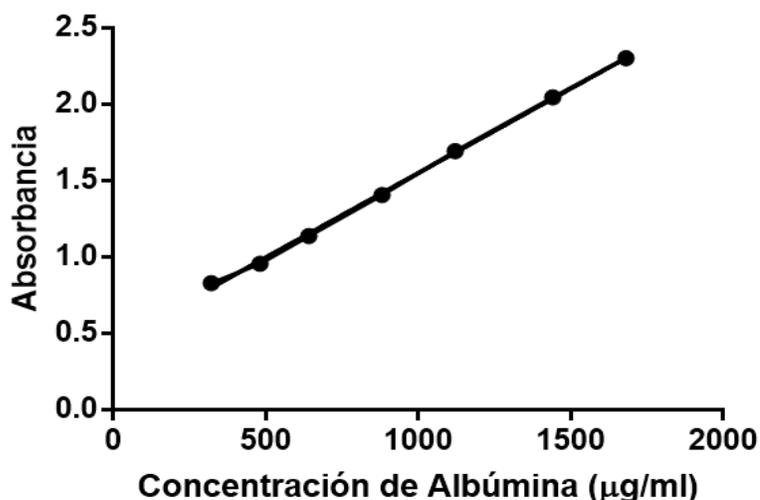


FIGURA 13. Curva de calibración para cuantificación de proteínas por el método del ácido bicinónico BCA. Se utilizó un estándar de albumina de suero bovino a una concentración de 2 mg/ml. Las absorbancias corresponden al promedio del duplicado. Coeficiente de correlación $r^2=0,999$. Ecuación $Y=0,001106X + 0,4462$. La lectura se realizó a 562 nm a una temperatura de 37°C.

TABLA 2. Animales de experimentación. Se muestra el número total de ratas utilizadas para la experimentación. Se determinó el peso promedio y desviación estándar.

Nº TOTAL DE RATAS	PESO (g)
12	424,25 ± 144,83

7.2 FRACCIONES MITOCONDRIALES

A las muestras de fracciones mitocondriales y sus respectivos sobrenadantes, obtenidos desde el proceso de centrifugación diferencial, se les realizó un Western blot. De este trabajo de investigación, se analizaron 2 fracciones mitocondriales y 2 sobrenadantes de hígado

mediante este método, se cargaron 20 μl de cada muestra (Figura 14). En los pellets se obtuvieron bandas que representan componentes presentes en las mitocondrias.

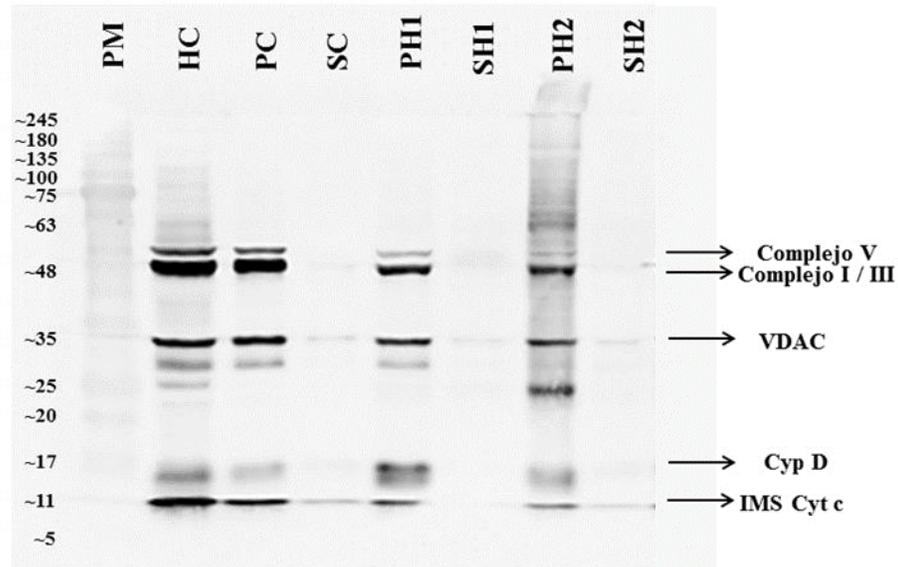


FIGURA 14. Western blot de fracciones mitocondriales. Patrón de peso molecular (PM), homogenizado de corazón (HC) (80,43 μg de proteínas), pellet de corazón (PC) (8,2 μg proteínas), sobrenadante de corazón (SC) (11 μg proteínas), pellet de hígado 1 (PH1) (84 μg de proteínas), sobrenadante de hígado 1 (SH1) (9,7 μg de proteínas), pellet hígado 2 (PH2) (77 μg de proteínas), sobrenadante hígado 2 (SH2) (6,7 μg de proteínas).

7.3 REPRESENTACIÓN CORRESPONDIENTE A LA APERTURA DEL mPTP FRENTE A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE CALCIO.

Se analizó la actividad *swelling* a diferentes concentraciones de CaCl_2 , correspondiente a 0, 200, 400, 600 y 1000 (μM) (Figura 15). La adición de CaCl_2 genera una disminución de la lectura de absorbancia (Figura 15A). Se muestra el delta de absorbancia entre el minuto 3 (equivalente a la adición de CaCl_2) y la lectura final (Figura 15B). Se encontró que la apertura

del poro de transición de permeabilidad mitocondrial es proporcional a la concentración de CaCl_2 que se adicione. El mayor aumento se registra al adicionar CaCl_2 600 y 1000 μM

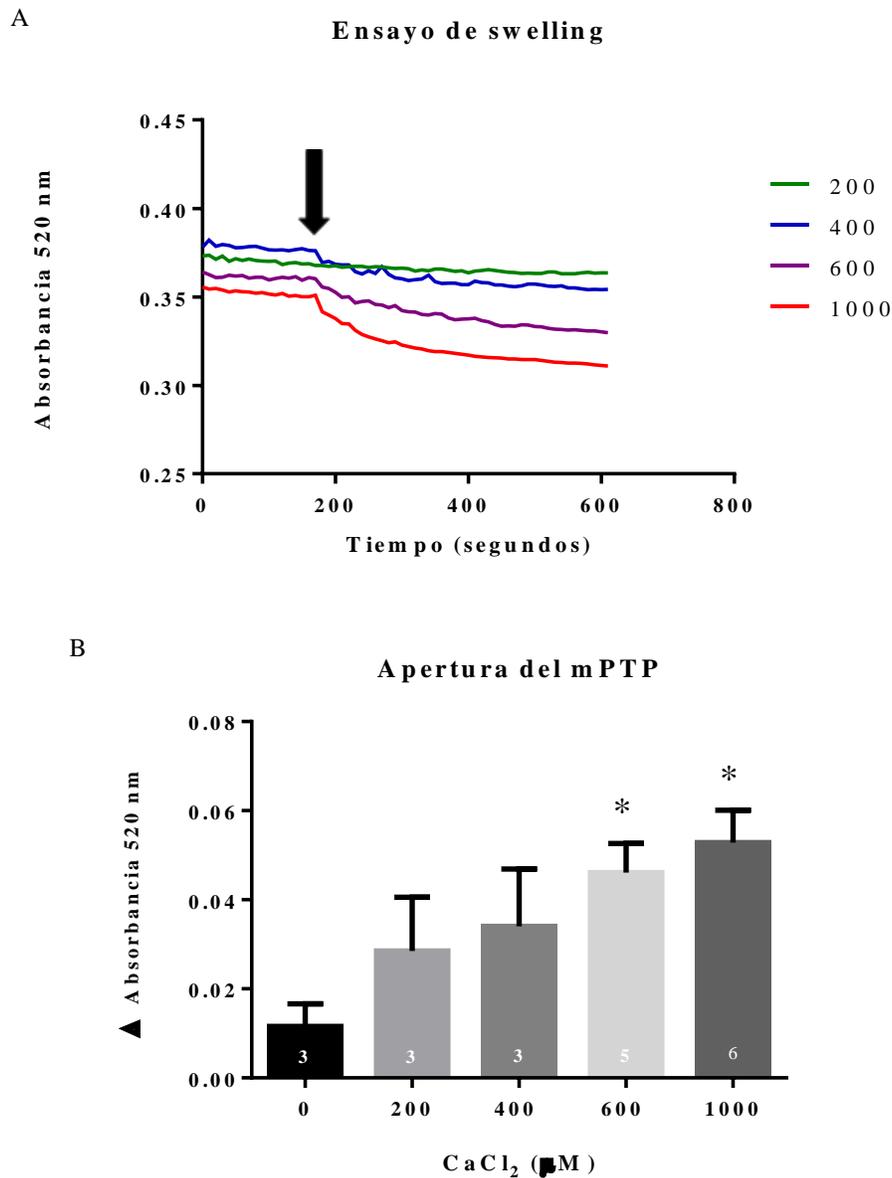


FIGURA 15. Apertura del mPTP inducida por calcio. (A) Se muestra las curvas de *swelling* mitocondrial a las distintas concentraciones de CaCl_2 estudiadas 200, 400, 600 y 1000 (μM). La flecha indica el momento de la adición de CaCl_2 . (B) Se graficaron los deltas promedios \pm error estándar de la media de las lecturas obtenidas a través del ensayo de *swelling* provenientes de las distintas concentraciones de CaCl_2 estudiadas. El número en cada barra indica el N para cada condición, en experimentos independientes. * indica ($p < 0.05$) 0 vs 600 μM de CaCl_2 y 0 vs 1000 μM de CaCl_2 .

7.4 INHIBICIÓN DE LA APERTURA DE mPTP POR CICLOSPORINA A.

CsA corresponde a un inhibidor conocido del poro transición de permeabilidad mitocondrial, por lo que a través del ensayo de *swelling* se estudió su efecto a concentraciones 1 y 5 μM frente a la adición de CaCl_2 1000 μM . Se muestra el ensayo de *swelling* con CsA (Figura 16A). Se estableció el delta de absorbancia entre el minuto 3 (equivalente a la adición de CaCl_2) y la lectura final (Figura 16B). No se observó inhibición de la apertura del poro por parte de la CsA frente a CaCl_2 1000 μM .

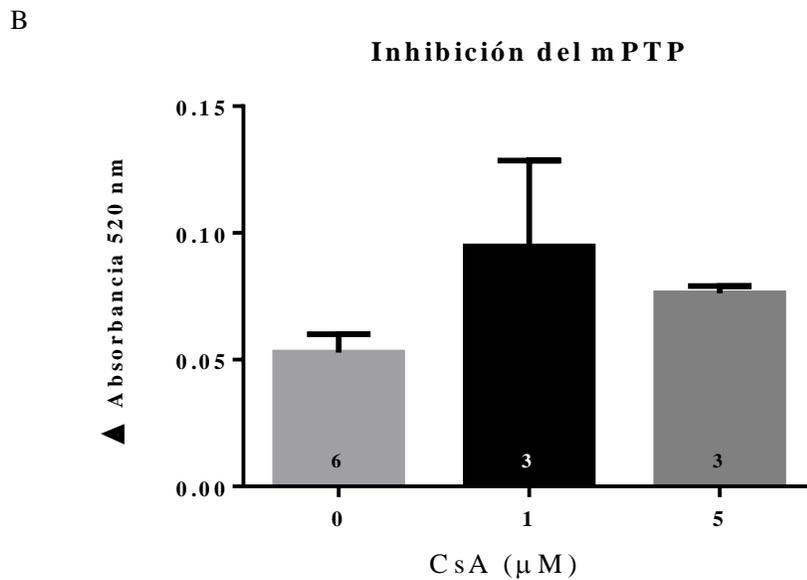
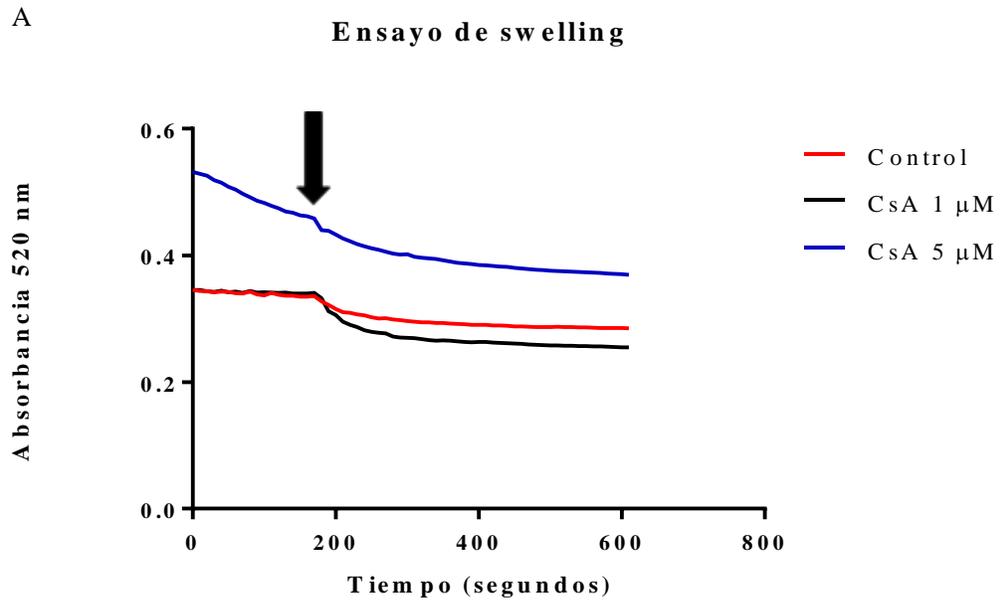


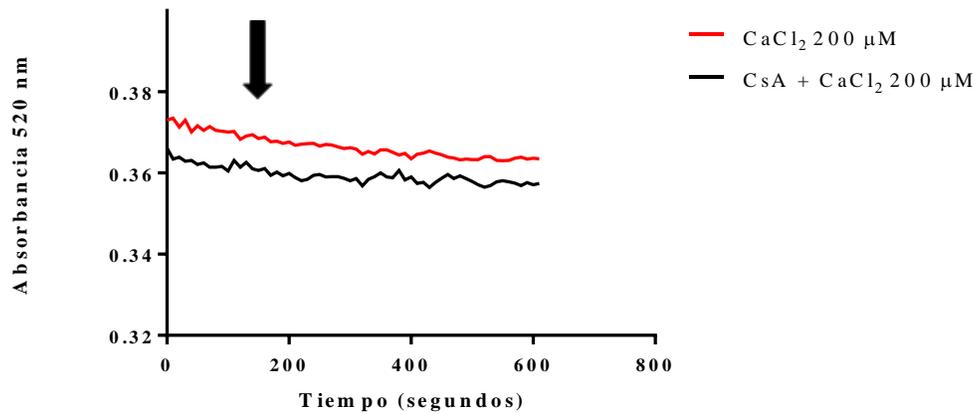
FIGURA 16. Inhibición del mPTP a través de ciclosporina A. (A) Se muestran las curvas de hinchazón mitocondrial con 0, 1 y 5 (μM) de ciclosporina A. La apertura del mPTP se indujo con CaCl_2 1000 μM al minuto 3 indicada por la flecha. (B) Se determinaron los deltas promedio \pm el error estándar de la media de las lecturas obtenidas a través del ensayo de *swelling* con las distintas concentraciones de ciclosporina A. El número en cada barra indica el N para cada condición, experimentos independientes.

7.5 INHIBICION DE LA APERTURA DEL mPTP POR CICLOSPORINA A FRENTE A DIVERSAS CONCENTRACIONES DE CALCIO.

Se estudió los 5 μM de CsA frente a las distintas concentraciones de CaCl_2 para determinar en qué punto su acción es más eficiente como inhibidor del mPTP. Las concentraciones de CaCl_2 analizadas fueron 200, 400, 600 y 1000 (μM) (Figura 17). No se obtuvo inhibición del poro frente a las distintas concentraciones de CaCl_2 . Se encontró una disminución de la absorbancia entre CsA + CaCl_2 1000 μM y CsA + CaCl_2 600 μM .

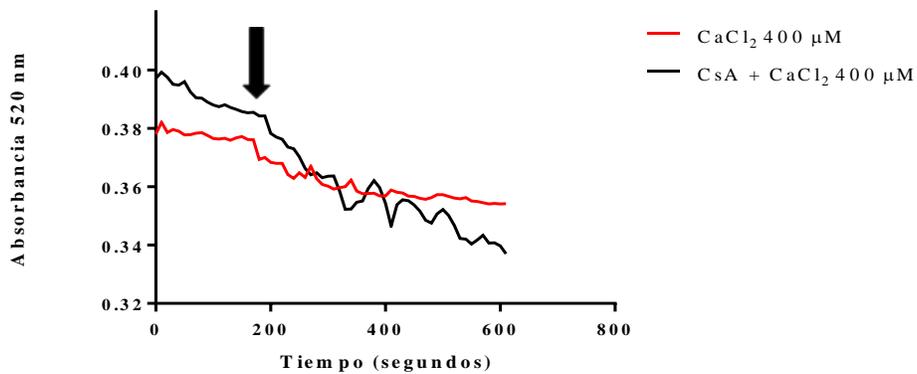
A

Ensayo de swelling

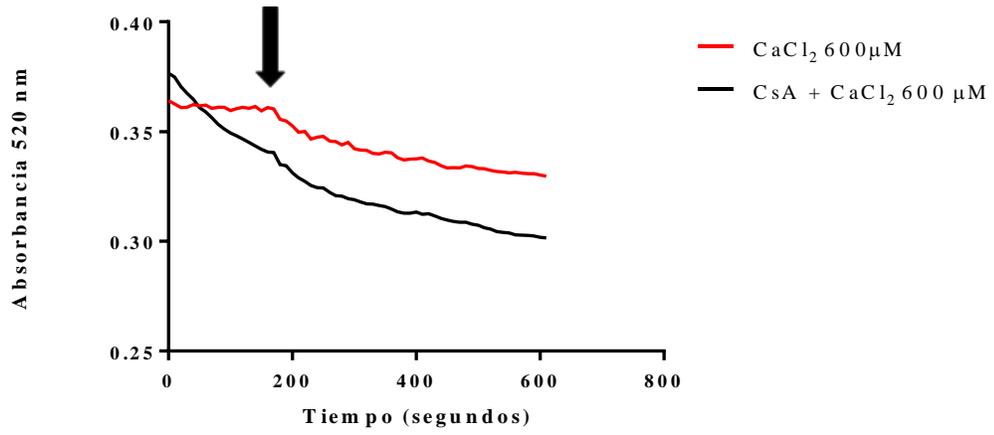


B

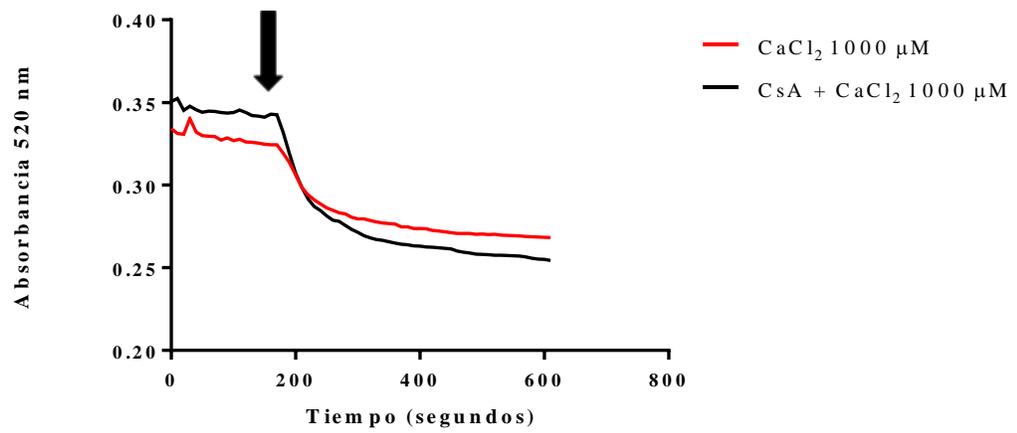
Ensayo de swelling



C **Ensayo de swelling**



D **Ensayo de swelling**



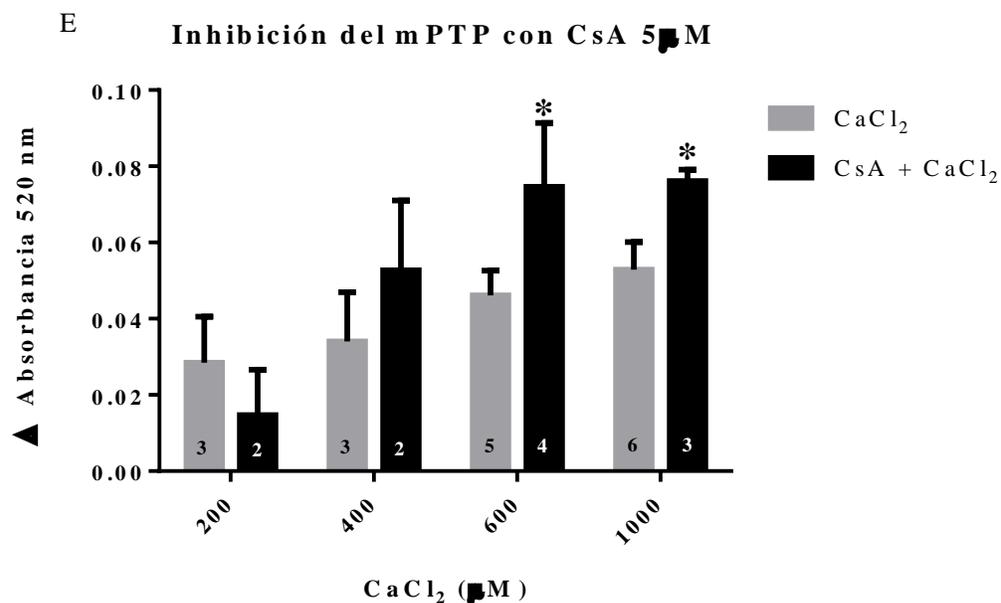


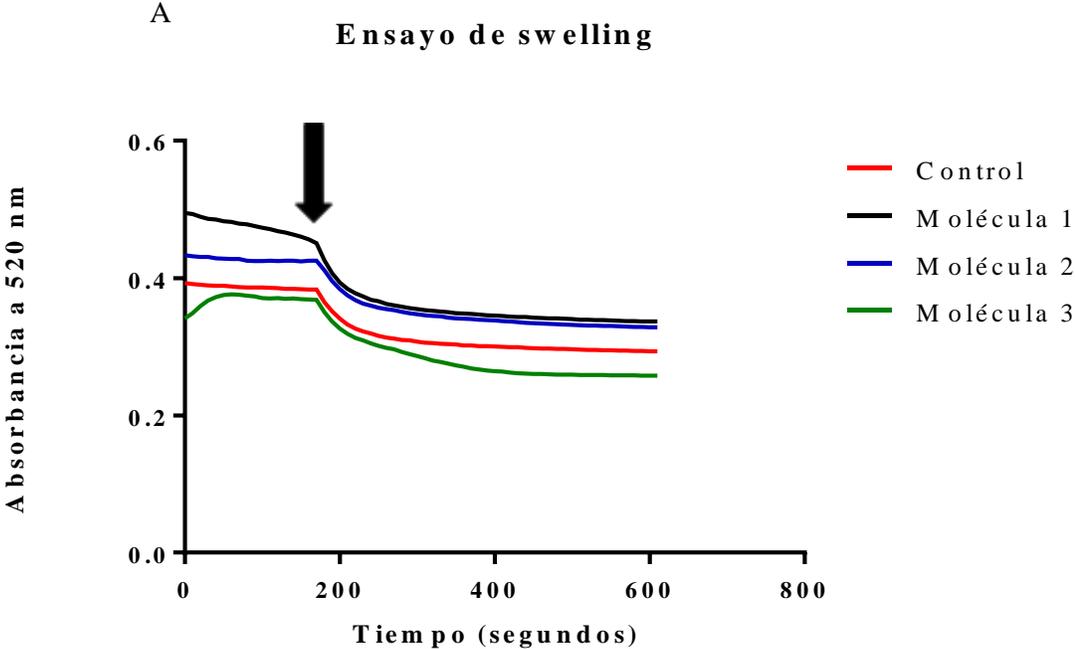
FIGURA 17. Actividad de la ciclosporina A frente a distintas concentraciones de CaCl₂.

(A-D) Se muestran las curvas de *swelling* mitocondrial. Se estudió CsA 5 μ M frente a CaCl₂ 200, 400, 600 y 1000 (μ M) incorporado al minuto 3, el momento de adición de este último está indicado por la flecha. (E) Se determinaron los deltas promedio \pm el error estándar de la media de las lecturas obtenidas a través del ensayo de *swelling* con CsA frente a distintas concentraciones de CaCl₂. El número en cada barra indica el N para cada condición, en experimentos independientes. * indica ($p < 0.05$) 200 vs 600 μ M de CaCl₂ + CsA y 200 vs 1000 μ M de CaCl₂ + CsA.

7.6 INHIBICIÓN DE LA APERTURA DEL mPTP POR MOLÉCULAS HÍBRIDAS DE ISOXAZOL Y TETRAHIDROQUINOLINA.

Se ha reportado que tanto los isoxazoles como las tetrahydroquinolinas podrían ser candidatos para la inhibición de la apertura del mPTP. A través del ensayo de *swelling* se evaluó la apertura del mPTP inducido por CaCl₂ 1000 μ M, en mitocondrias incubadas con moléculas híbridas de isoxazol y tetrahydroquinolina (Figura 18). Posteriormente fue evaluada la apertura del mPTP probando las mismas moléculas mencionadas anteriormente, pero ahora utilizando una concentración de CaCl₂ de 600 μ M (Figura 19). Se encontró que

las moléculas híbridas en estudio presentan inhibición del mPTP frente a una concentración de CaCl_2 600 μM . La molécula 1 registró un 9,7% de inhibición, la molécula 2 un 31% y molécula 3 un 20%.



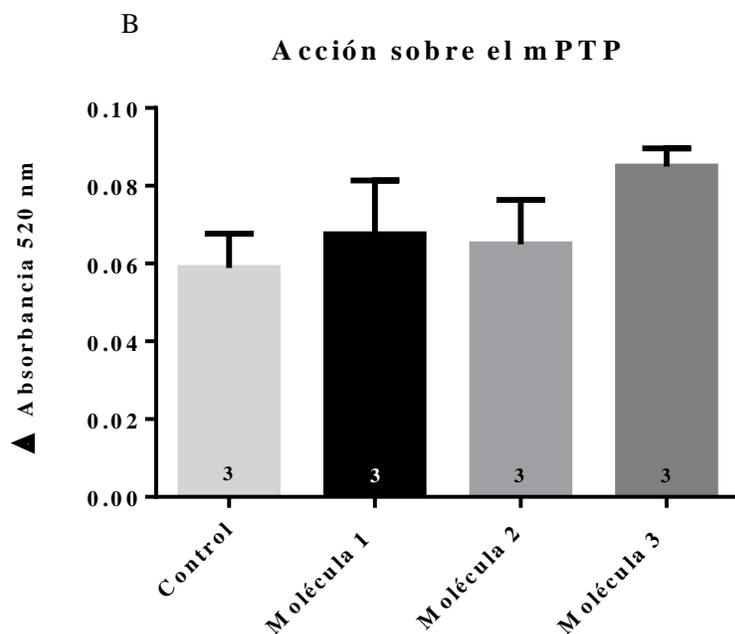
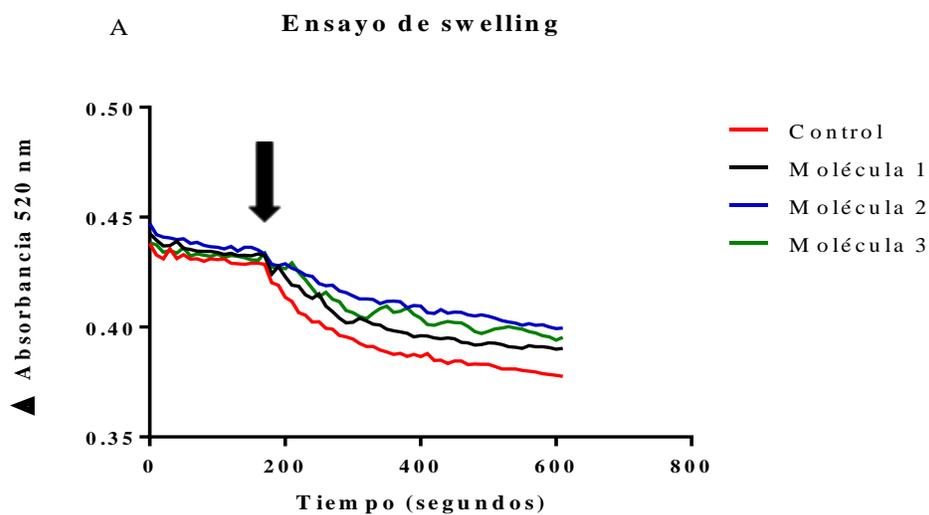


FIGURA 18. Acción de moléculas híbridas de isoxazol y tetrahydroquinolina sobre mPTP inducido por CaCl_2 1000 μM . (A) Se muestran las curvas de *swelling* mitocondrial de las moléculas híbridas de isoxazol y tetrahydroquinolina en estudio frente a la adición CaCl_2 1000 μM , esto último indicado con la flecha. Molécula 1 (2 μM), molécula 2 (1 μM), molécula 3 (5 μM) y control CaCl_2 (1000 μM). (B) Se determinaron los deltas promedio \pm el error estándar de la media de las lecturas obtenidas desde el ensayo de *swelling* con las moléculas híbridas de isoxazol y tetrahydroquinolina. El número en cada barra indica el N para cada condición, en experimentos independientes.



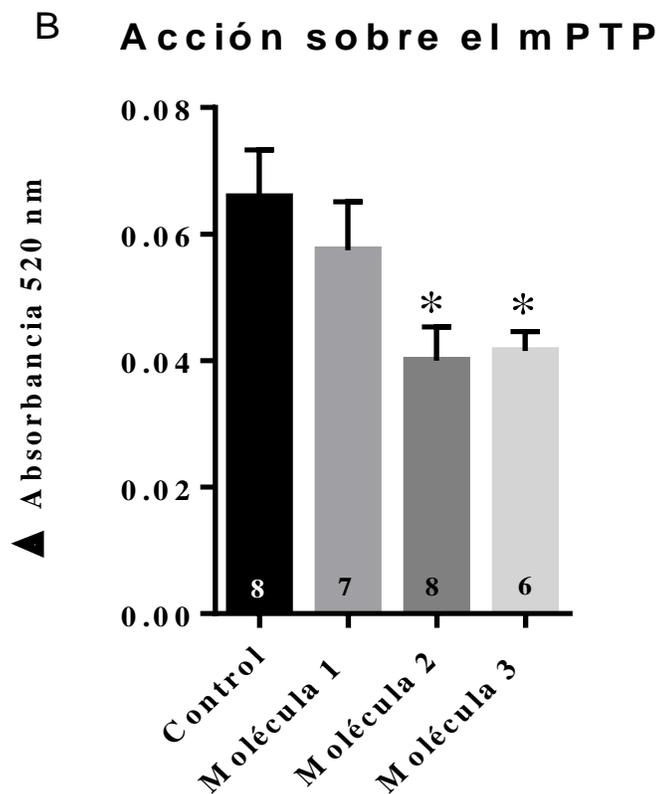


FIGURA 19. Acción de moléculas híbridas de isoxazol y tetrahydroquinolina sobre Mptp inducido por CaCl_2 600 μM . (A) Se muestran las curvas de *swelling* mitocondrial de las moléculas híbridas de isoxazol y tetrahydroquinolina en estudio, frente a la adición de CaCl_2 600 μM , esto último indicado con la flecha. Molécula 1 (2 μM), molécula 2 (1 μM), molécula 3 (5 μM) y control (CaCl_2 600 μM). (B) Se determinaron los deltas promedio \pm el error estándar de la media de las lecturas obtenidas desde el ensayo de *swelling* con las moléculas híbridas de isoxazol y tetrahydroquinolina. El número en cada barra indica el N para cada condición, experimentos independientes. * indica ($p < 0,05$) control vs molécula 2 y control vs molécula 3.

8. DISCUSIÓN

La activación del mPTP se considera una de las principales causas de muerte celular en una variedad de afecciones fisiopatológicas, incluida la lesión por isquemia / reperfusión, enfermedad neurodegenerativa, lesión cerebral traumática, distrofia muscular y toxicidad de medicamentos (37).

Es por esto que el mPTP se describe como un aumento repentino en la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna (hinchazón) inducida por una sobrecarga de Ca^{+2} y potenciada por el estrés oxidativo, que causa la pérdida de la homeostasis iónica y la fuerza motriz protónica requerida para la síntesis de ATP, lo que permite considerar a las mitocondrias como reguladores críticos de la muerte celular apoptótica y necrótica (55).

En este trabajo se utilizó un proceso de centrifugación diferencial que permite obtener las fracciones mitocondriales de hígado de rata necesarias para realizar el ensayo de *swelling*. La centrifugación diferencial permite que luego de variadas centrifugaciones a revoluciones cerca de 12.000 rpm, se logre concentrar las fracciones mitocondriales en un pellet. Por ejemplo, en la investigación de Güiza y col (2019), refieren el aislamiento mitocondrial de hígado de rata a través de una centrifugación diferencial, siguiendo el protocolo descrito por Voss y col (1961) (56), en donde el medio de extracción utilizado consistió en D-manitol 250 mM, HEPES 10 mM, EGTA 1 mM, y BSA 0,1% p/v, pH 7,4 a una temperatura de 4°C, estas condiciones son muy similares a las que realizamos en este estudio. Elustondo y col (2016) para estudiar el mPTP, utilizaron mitocondrias aisladas de hígado de rata, refiriendo que el uso de mitocondrias aisladas en lugar de células cultivadas fue ventajoso, ya que les permitió controlar cuidadosamente la carga de Ca^{+2} además de proporcionar una cantidad suficiente de material para los ensayos bioquímicos (57). A su vez el estudio de Roy y col (2015) refirieron la utilización de mitocondrias aisladas de hígado de ratón como material de prueba debido a su fácil preparación y resultados consistentes y reproducibles (49). Además se indica

que estas mitocondrias responden a los agonistas e inhibidores del poro, de la misma forma que las mitocondrias humanas (58).

Se evidenció mediante un Western blot de pellets y sobrenadantes de hígado, que el proceso de centrifugación diferencial para el aislamiento de mitocondrias fue efectivo, ya que se concentró la mayor cantidad de proteínas en el pellet a través de la presencia e intensidad de las bandas que señalan los distintos componentes presentes en las mitocondrias. Si bien esta técnica nos entregó información sobre la presencia de mitocondrias en las muestras, una de las limitantes es que no se conoce el grado de pureza o actividad de las fracciones mitocondriales allí presentes.

En relación al ensayo de *swelling*, la inflamación mitocondrial es un cambio ultraestructural distintivo que se produce después de la isquemia y es uno de los indicadores más importantes de la apertura del mPTP (59). Es así como las mitocondrias de hígado (60), riñón (61), corazón (62) y otros tejidos pueden sufrir una transición de permeabilidad, en que la membrana interna se vuelve permeable a iones y moléculas de bajo a moderado peso molecular. Además el estudio realizado por Šileikytė y Forte (2016) establece que el ensayo de *swelling* mitocondrial es un medio altamente efectivo para identificar moléculas pequeñas inhibitoras del mPTP (50).

Para inducir la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, se utiliza Ca^{+2} . Actualmente se sabe que, si se agrega suficiente Ca^{+2} , con el objetivo de elevar su concentración en la matriz superando su rango fisiológico, conduce a un gran aumento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna, lo que genera la pérdida de solutos con un peso molecular inferior a 1,5 kD (51). Es por esto que se probó la apertura del mPTP frente a distintas concentraciones de Ca^{+2} , las cuales fluctúan entre los 200 y 1000 μM de CaCl_2 . Tal como Karch y col (2013), quienes en su búsqueda de dilucidar componentes del mPTP, realizaron ensayos de *swelling* induciendo la apertura del poro con concentraciones de CaCl_2 de 400 y 800 μM (63).

Al calcular los deltas de absorbancia obtenidos desde el minuto de adición de CaCl_2 (minuto 3) y la última lectura (minuto 10), se observó que la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial es proporcional a la concentración de CaCl_2 que se adiciona, es decir, el mayor delta de absorbancia se registró cuando se utilizó una concentración de CaCl_2 de $1000 \mu\text{M}$. A su vez se registró una significancia estadística tanto con CaCl_2 $1000 \mu\text{M}$ como con CaCl_2 $600 \mu\text{M}$ vs control (CaCl_2 0) lo que evidencia que la sobrecarga de Ca^{+2} logra producir un proceso de *swelling* en las mitocondrias que hace descender los registros de absorbancia.

En nuestros ensayos de *swelling* la concentración de mitocondrias utilizada fue de $0,1 \text{ mg}$ de proteína/ ml, la que corresponde a la misma concentración de proteínas utilizada por Sánchez y col (2011) (64).

Se considera que la CsA es un potente inhibidor de la apertura del mPTP en comparación con ADP y Mg^{+2} , quienes se consideran como los siguientes agentes protectores más efectivos (20, 65). Se decidió estudiar la acción de la CsA $1 \mu\text{M}$ y $5 \mu\text{M}$, frente a la inducción de la apertura del poro con una concentración de CaCl_2 $1000 \mu\text{M}$. Se obtuvo que en ambos casos la CsA no logró tener un efecto inhibitorio sobre el mPTP.

La acumulación de Ca^{+2} intramitocondrial se ha postulado para antagonizar la repolarización de CsA de las mitocondrias hepáticas directamente (66). Por lo tanto, aumentar la carga de Ca^{+2} resultaría en una mayor despolarización y menos inhibición de CsA, como se observa en el estudio de Brustovetsky y col (2000), quienes estudiaron las limitaciones de la inhibición de la CsA en la transición de la permeabilidad en las mitocondrias del SNC en donde la CsA no logró evitar la despolarización inducida por Ca^{+2} ($100 \mu\text{M}$) ni repolarizar las mitocondrias de cerebro de rata, cuando las mitocondrias se

despolarizaron excesivamente, pero si lo logró cuando la despolarización fue inducida con Ca^{+2} 50 μM (67).

En base a esto, se decidió evaluar la CsA 5 μM frente a concentraciones de CaCl_2 más bajas (200 μM , 400 μM , 600 μM y 1000 μM), para ver si se lograba inhibir de forma efectiva el mPTP. Se obtuvo que la CsA + CaCl_2 , no fue capaz de inhibir de forma significativa la apertura del mPTP al compararla con concentraciones de CaCl_2 más bajas, solo se mostró una leve inhibición al comparar la CsA + CaCl_2 , con la apertura del poro inducida con CaCl_2 200 μM , pero esta no alcanzó significancia estadística.

Este fenómeno se describió en el estudio realizado por Hansson y col (2011), donde se enfrentó las mitocondrias del cerebro humano a la presencia de CsA 1 μM y ADP 100 μM . Estos dos moduladores del mPTP lograron retrasar y prevenir parcialmente la respuesta de *swelling* luego de una adición de un total de 200 μM de Ca^{+2} , además en esta misma investigación los autores lograron establecer que las mitocondrias hepáticas exhiben varias características clásicas del fenómeno del mPTP, como la pérdida del potencial de membrana inducida por Ca^{+2} y el acoplamiento respiratorio, así como la liberación de la proteína proapoptótica citocromo c, con lo cual en conjunto determinaron que el cerebro humano adulto y las mitocondrias hepáticas poseen un mPTP activo sensible a CypD que como se acepta actualmente, es un componente regulador del poro y que se ha comprobado que es el sitio que logra inhibir la CsA (13).

Por otro lado, la investigación de Broekemeier y col (1995) postula que la acumulación de ácidos grasos libres es un factor que limita la inhibición del mPTP por la CsA, por ende, para evitar esta inactivación de la acción que ejerce la CsA, se recomienda usar en conjunto con trifluoperazina que es un inhibidor conocido de la fosfolipasa A2 mitocondrial (responsable de la generación de ácidos grasos libres), mejorando así la inhibición del mPTP mediado por CsA (68).

Se logró observar una significancia estadística entre CsA + CaCl₂ 1000 μM y CsA + CaCl₂ 600 μM, lo que en conjunto con lo obtenido anteriormente llevó a la determinación de estudiar las moléculas híbridas de isoxazol y tetrahydroquinolina frente a la adición de CaCl₂ 600 μM y 1000 μM.

Se observó que las tres moléculas híbridas estudiadas no tuvieron efecto inhibitorio de la apertura del mPTP frente a una adición de CaCl₂ 1000 μM, comportamiento muy similar a lo que ocurrió con la CsA frente a la misma concentración de CaCl₂, lo cual podría ser explicado por lo mismo que se expuso anteriormente, en donde la sobrecarga excesiva de Ca⁺² intramitocondrial podría antagonizar la repolarización y con ello revertir la actividad inhibitoria de estas moléculas.

Al enfrentar las moléculas híbridas de isoxazol y tetrahydroquinolina a una concentración de CaCl₂ 600 μM, se observó una inhibición significativa al tratar las mitocondrias con la molécula 2 y la molécula 3, en cambio la molécula 1 si bien logró disminuir el delta de absorbancia en comparación con el control, esta no reflejó una inhibición del mPTP significativa. Estos datos sugieren que moléculas 2 y 3 son capaces de inhibir la apertura del mPTP.

Existen reportes de la efectividad de estos compuestos, por separado, que se han probado a concentraciones de Ca⁺² inferiores a 1000 μM. Tal como lo establece Kon y col (2017) quienes determinaron que el compuesto DS44170716 que en su estructura contiene tetrahydroquinolina, correspondería a un nuevo inhibidor de la mPTP en las mitocondrias del hígado de rata, ya que este lograba inhibir de manera dependiente de la dosis la disminución de la absorbancia en un rango de 1 μM a 100 μM (compuesto) frente a una concentración de CaCl₂ de 100 μM, además en este mismo estudio establecieron que el mecanismo inhibitorio de DS44170716 contra mPTP se basaría en la reducción del potencial de la membrana mitocondrial en conjunto con la inhibición de las actividades enzimáticas del complejo III, IV y V. Por ende la inhibición sería independiente de peptidil-prolil cis-trans isomerasa F, el

cual se sabe es un blanco de CsA (2), lo que explicaría porque sí hubo inhibición con las moléculas híbridas utilizando CaCl_2 600 μM y no cuando se utilizó CsA frente a esta misma concentración de CaCl_2 como control.

El estudio de Roy y col (2015) confirmó que los compuestos inhibidores a base de isoxazol no interfieren con el potencial de membrana mitocondrial interna y protegen contra activadores químicos conocidos del mPTP que inducen estrés oxidativo y desencadenan la apertura de poros, además de plantear a N- (3-cloro-2-metilfenil) -5- (4-fluoro-3-hidroxifenil) isoxazol-3-carboxamida como un inhibidor del mPTP mediante el aumento de retención de calcio mitocondrial, lo que fue validado a través de su mejoras en la función y estructura en la distrofia muscular congénita asociada con una mutación del colágeno VI en un modelo de pez cebra (49).

Además la investigación de Sileikyte y col (2015) que tenía como objetivo identificar moléculas pequeñas que se dirigieran al poro de transición de la permeabilidad mitocondrial, postuló a ML404 (isoxazol), como un compuesto que inhibe de manera potente y selectiva la inflamación mitocondrial y que cumple con los atributos para una sonda como se define en el Plan de Desarrollo de Sonda Química, con el objetivo de que a largo plazo se utilice esta sonda y otros análogos para iluminar el funcionamiento del mPTP, para así finalmente, traducir este conocimiento en una alternativa terapéutica.

Existe un reporte de la utilización de híbridos de isoxazol y tetrahydroquinolina por Álvares y col (2019) con un enfoque distinto al mencionado anteriormente, en que los investigadores decidieron explorar su bioactividad en las células de cáncer de hígado. Se encontró que estos híbridos poseían actividad citotóxica (anti proliferativa) sobre las células HepG2 asociadas con efectos inhibidores sobre la cadena de transporte de electrones y la respiración celular en estado no acoplado. Estos investigadores mencionan que compuestos que contengan tanto isoxazol como tetrahydroquinolina se considerarían privilegiados en la

química médica debido a su afinidad con diferentes objetivos moleculares y su amplio espectro de actividad biológica (69).

Es importante mencionar que los compuestos probados en esta investigación tienen diferencias estructurales con las moléculas de isoxazol (*N*-(3-cloro-2-metilfenil-5-(4-fluoro-3-hidroxifenil) isoxazol-3-carboxamida y ML 404) y tetrahydroquinolina (DS44170716) que se han reportado como inhibidores del mPTP anteriormente, debido a que no están unidos a una anilida como si lo están estos últimos, lo que establece a estas moléculas híbridas como una nueva alternativa para la inhibición del mPTP.

9. CONCLUSIÓN

El ensayo de *swelling* corresponde a una técnica sencilla y eficiente para evaluar la apertura del mPTP. A través de esta técnica se determina que la apertura del mPTP es proporcional a la concentración de CaCl_2 que se use como inductor, mostrando su mayor apertura frente a CaCl_2 1000 μM (en un rango de estudio de CaCl_2 200 a 1000 μM).

La CsA si bien se ha registrado como un potente inhibidor del mPTP, en este estudio a concentraciones de CaCl_2 por sobre los 200 μM no registra inhibición. Por su parte las moléculas híbridas de isoxazol y tetrahydroquinolina 1-[2-(5-Metil-isoxazol-3-y1)-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydro-quinolina-4-y1]-pirrolidin-2-ona (molécula 2) y 1-(2-Isoxazol-3-y1-1,2,3,4-tetrahydro-quinolina-4-y1)-pirrolidin-2-ona (molécula 3), muestran inhibición de la apertura del mPTP frente a una concentración de CaCl_2 600 μM . Por ende, es necesario seguir realizando estudios, principalmente de dosis respuesta y nivel de citotoxicidad celular, que permitan determinar cuáles serían las concentraciones en las que estas moléculas pudiesen ser fuertes candidatas para desarrollar fármacos, con el objetivo de disminuir y en lo posible inhibir la muerte celular producto de la apertura prolongada de este poro en procesos patológicos.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Perez I, Mosca S, Ennis I. Participación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial en respuesta a la isquemia y reperfusión miocárdica de ratas hipertensas espontánea (SHR). Universidad de la Plata 2014.
2. Kon N, Satoh A, Miyoshi N. A small-molecule DS44170716 inhibits Ca. *Sci Rep*. 2017;7(1):3864.
3. Ferdinandy P, Schulz R. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischaemia-reperfusion injury and preconditioning. *Br J Pharmacol*. 2003;138(4):532-43.
4. Ramírez P, Marín J, Piñero A, Chávez R, Parrilla P. Investigación experimental aplicada a la clínica: isquemia-reperfusión hepática. Murcia 2000.
5. Raffan F, Kling J. Síndrome de reperfusión: Fisiopatología, prevención y manejo. Colombia 2000.
6. Halestrap AP. What is the mitochondrial permeability transition pore? *J Mol Cell Cardiol*. 2009;46(6):821-31.
7. Crompton M, Costi A. A heart mitochondrial Ca²⁺(+)-dependent pore of possible relevance to re-perfusion-induced injury. Evidence that ADP facilitates pore interconversion between the closed and open states. *Biochem J*. 1990;266(1):33-9.
8. Hunter DR, Haworth RA. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch Biochem Biophys*. 1979;195(2):453-9.
9. Javadov S, Jang S, Parodi-Rullán R, Khuchua Z, Kuznetsov AV. Mitochondrial permeability transition in cardiac ischemia-reperfusion: whether cyclophilin D is a viable target for cardioprotection? *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(15):2795-813.
10. Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J*. 1995;307 (Pt 1):93-8.
11. Murphy E, Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev*. 2008;88(2):581-609.
12. Yetgin T, Manintveld OC, Duncker DJ, van der Giessen WJ. Postconditioning against ischaemia-reperfusion injury: ready for wide application in patients? *Neth Heart J*. 2010;18(7-8):389-92.

13. Hansson MJ, Morota S, Chen L, Matsuyama N, Suzuki Y, Nakajima S, et al. Cyclophilin D-sensitive mitochondrial permeability transition in adult human brain and liver mitochondria. *J Neurotrauma*. 2011;28(1):143-53.
14. Haworth RA, Hunter DR. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site. *Arch Biochem Biophys*. 1979;195(2):460-7.
15. Crompton M, Ellinger H, Costi A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem J*. 1988;255(1):357-60.
16. Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res*. 2004;61(3):372-85.
17. Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, et al. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*. 2005;434(7033):658-62.
18. Morciano G, Giorgi C, Bonora M, Punzetti S, Pavasini R, Wieckowski MR, et al. Molecular identity of the mitochondrial permeability transition pore and its role in ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;78:142-53.
19. Baines CP, Gutiérrez-Aguilar M. The still uncertain identity of the channel-forming unit(s) of the mitochondrial permeability transition pore. *Cell Calcium*. 2018;73:121-30.
20. Fournier N, Ducet G, Crevat A. Action of cyclosporine on mitochondrial calcium fluxes. *J Bioenerg Biomembr*. 1987;19(3):297-303.
21. Szabó I, De Pinto V, Zoratti M. The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. II. The electrophysiological properties of VDAC are compatible with those of the mitochondrial megachannel. *FEBS Lett*. 1993;330(2):206-10.
22. Baines CP, Kaiser RA, Sheiko T, Craigen WJ, Molkentin JD. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol*. 2007;9(5):550-5.
23. Klingenberg M. The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1778(10):1978-2021.
24. Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, Sligh JE, Cai J, Jones DP, et al. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature*. 2004;427(6973):461-5.

25. Chelli B, Falleni A, Salvetti F, Gremigni V, Lucacchini A, Martini C. Peripheral-type benzodiazepine receptor ligands: mitochondrial permeability transition induction in rat cardiac tissue. *Biochem Pharmacol.* 2001;61(6):695-705.
26. Starkov AA. The molecular identity of the mitochondrial Ca²⁺ sequestration system. *FEBS J.* 2010;277(18):3652-63.
27. Chen MK, Guilarte TR. Translocator protein 18 kDa (TSPO): molecular sensor of brain injury and repair. *Pharmacol Ther.* 2008;118(1):1-17.
28. Šileikytė J, Blachly-Dyson E, Sewell R, Carpi A, Menabò R, Di Lisa F, et al. Regulation of the mitochondrial permeability transition pore by the outer membrane does not involve the peripheral benzodiazepine receptor (Translocator Protein of 18 kDa (TSPO)). *J Biol Chem.* 2014;289(20):13769-81.
29. Jonckheere AI, Smeitink JA, Rodenburg RJ. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J Inherit Metab Dis.* 2012;35(2):211-25.
30. Bonora M, Bononi A, De Marchi E, Giorgi C, Lebiezinska M, Marchi S, et al. Role of the c subunit of the FO ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Cell Cycle.* 2013;12(4):674-83.
31. Giorgio V, Bisetto E, Soriano ME, Dabbeni-Sala F, Basso E, Petronilli V, et al. Cyclophilin D modulates mitochondrial F₀F₁-ATP synthase by interacting with the lateral stalk of the complex. *J Biol Chem.* 2009;284(49):33982-8.
32. Giorgio V, von Stockum S, Antoniel M, Fabbro A, Fogolari F, Forte M, et al. Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(15):5887-92.
33. Parks RJ, Menazza S, Holmström KM, Amanakis G, Fergusson M, Ma H, et al. Cyclophilin D-mediated regulation of the permeability transition pore is altered in mice lacking the mitochondrial calcium uniporter. *Cardiovasc Res.* 2019;115(2):385-94.
34. Cano-Estrada A, González-Halphen D. F₁ F₀-ATP Sintasa y sus Diferencias Estructurales. México2011. p. 98-108.
35. Alavian KN, Beutner G, Lazrove E, Sacchetti S, Park HA, Licznerski P, et al. An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F₁F₀ ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(29):10580-5.
36. Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? *Front Physiol.* 2013;4:95.

37. Bernardi P, Krauskopf A, Basso E, Petronilli V, Blachly-Dyson E, Blalchy-Dyson E, et al. The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *FEBS J*. 2006;273(10):2077-99.
38. Barsukova A, Komarov A, Hajnóczky G, Bernardi P, Bourdette D, Forte M. Activation of the mitochondrial permeability transition pore modulates Ca²⁺ responses to physiological stimuli in adult neurons. *Eur J Neurosci*. 2011;33(5):831-42.
39. Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Di Lisa F. Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem*. 1999;264(3):687-701.
40. Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, et al. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2008;359(5):473-81.
41. Chiari P, Angoulvant D, Mewton N, Desebbe O, Obadia JF, Robin J, et al. Cyclosporine protects the heart during aortic valve surgery. *Anesthesiology*. 2014;121(2):232-8.
42. Hausenloy D, Kunst G, Boston-Griffiths E, Kolvekar S, Chaubey S, John L, et al. The effect of cyclosporin-A on peri-operative myocardial injury in adult patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled clinical trial. *Heart*. 2014;100(7):544-9.
43. Griffiths EJ, Halestrap AP. Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 1993;25(12):1461-9.
44. Nazareth W, Yafei N, Crompton M. Inhibition of anoxia-induced injury in heart myocytes by cyclosporin A. *J Mol Cell Cardiol*. 1991;23(12):1351-4.
45. Briston T, Selwood DL, Szabadkai G, Duchon MR. Mitochondrial Permeability Transition: A Molecular Lesion with Multiple Drug Targets. *Trends Pharmacol Sci*. 2019;40(1):50-70.
46. Clarke SJ, McStay GP, Halestrap AP. Sangliferin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A. *J Biol Chem*. 2002;277(38):34793-9.
47. Schaller S, Paradis S, Ngho GA, Assaly R, Buisson B, Drouot C, et al. TRO40303, a new cardioprotective compound, inhibits mitochondrial permeability transition. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;333(3):696-706.

48. Bordet T, Buisson B, Michaud M, Drouot C, Galéa P, Delaage P, et al. Identification and characterization of cholest-4-en-3-one, oxime (TRO19622), a novel drug candidate for amyotrophic lateral sclerosis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;322(2):709-20.
49. Roy S, Šileikytė J, Schiavone M, Neuenswander B, Argenton F, Aubé J, et al. Discovery, Synthesis, and Optimization of Diarylisoxazole-3-carboxamides as Potent Inhibitors of the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *ChemMedChem.* 2015;10(10):1655-71.
50. Šileikytė J, Forte M. Shutting down the pore: The search for small molecule inhibitors of the mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1857(8):1197-202.
51. Wong R, Steenbergen C, Murphy E. Mitochondrial permeability transition pore and calcium handling. *Methods Mol Biol.* 2012;810:235-42.
52. Hunter DR, Haworth RA, Southard JH. Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *J Biol Chem.* 1976;251(16):5069-77.
53. Eisenhofer S, Toókos F, Hense BA, Schulz S, Filbir F, Zischka H. A mathematical model of mitochondrial swelling. *BMC Res Notes.* 2010;3:67.
54. Saris NE, Carafoli E. A historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria. *Biochemistry (Mosc).* 2005;70(2):187-94.
55. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(9):621-32.
56. VOSS DO, CAMPELLO AP, BACILA M. The respiratory chain and the oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* 1961;4:48-51.
57. Elustondo PA, Nichols M, Negoda A, Thirumaran A, Zakharian E, Robertson GS, et al. Mitochondrial permeability transition pore induction is linked to formation of the complex of ATPase C-subunit, polyhydroxybutyrate and inorganic polyphosphate. *Cell Death Discov.* 2016;2:16070.
58. Barsukova AG, Bourdette D, Forte M. Mitochondrial calcium and its regulation in neurodegeneration induced by oxidative stress. *Eur J Neurosci.* 2011;34(3):437-47.
59. Gerencser AA, Doczi J, Töröcsik B, Bossy-Wetzel E, Adam-Vizi V. Mitochondrial swelling measurement in situ by optimized spatial filtering: astrocyte-neuron differences. *Biophys J.* 2008;95(5):2583-98.

60. Pfeiffer DR, Kauffman RF, Lardy HA. Effects of N-ethylmaleimide on the limited uptake of Ca²⁺, Mn²⁺, and Sr²⁺ by rat liver mitochondria. *J Biol Chem.* 1978;253(12):4165-71.
61. Harris EJ, Booth R, Cooper MB. The effect of superoxide generation on the ability of mitochondria to take up and retain Ca²⁺. *FEBS Lett.* 1982;146(2):267-72.
62. Halestrap AP, Pasdois P. The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1787(11):1402-15.
63. Karch J, Kwong JQ, Burr AR, Sargent MA, Elrod JW, Peixoto PM, et al. Bax and Bak function as the outer membrane component of the mitochondrial permeability pore in regulating necrotic cell death in mice. *Elife.* 2013;2:e00772.
64. Sánchez G, Fernández C, Montecinos L, Domenech RJ, Donoso P. Preconditioning tachycardia decreases the activity of the mitochondrial permeability transition pore in the dog heart. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;410(4):916-21.
65. Zoratti M, Szabò I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1241(2):139-76.
66. Crompton M, Andreeva L. On the interactions of Ca²⁺ and cyclosporin A with a mitochondrial inner membrane pore: a study using cobaltamine complex inhibitors of the Ca²⁺ uniporter. *Biochem J.* 1994;302 (Pt 1):181-5.
67. Brustovetsky N, Dubinsky JM. Limitations of cyclosporin A inhibition of the permeability transition in CNS mitochondria. *J Neurosci.* 2000;20(22):8229-37.
68. Broekemeier KM, Pfeiffer DR. Inhibition of the mitochondrial permeability transition by cyclosporin A during long time frame experiments: relationship between pore opening and the activity of mitochondrial phospholipases. *Biochemistry.* 1995;34(50):16440-9.
69. Álvarez Santos MR, Bueno Duarte Y, Güiza FM, Romero Bohórquez AR, Mendez-Sanchez SC. Effects of new tetrahydroquinoline-isoxazole hybrids on bioenergetics of hepatocarcinoma Hep-G2 cells and rat liver mitochondria. *Chem Biol Interact.* 2019;302:164-71.