

## INDICE DE CONTENIDOS

	<b>Pág.</b>
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 <sub>0</sub> F <sub>1</sub> ATP sintasa	14
3.4 Opciones farmacológicas para la inhibición del mPTP	17
3.4.1 Ciclosporina A	17
3.4.2 Sanglifehrin A	19
3.4.3 TRO40303	21
3.4.4 <i>N</i> -(3-cloro-2-metilfenil)-5-(4-fluoro-3-hidroxi- <i>fenil</i> )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

	<b>Pág.</b>
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 <sub>2</sub>	50
FIGURA 18: Acción de moléculas híbridas de isoxazol y tetrahydroquinolina sobre mPTP inducido por CaCl <sub>2</sub> 1000 μM	52
FIGURA 19: Acción de moléculas híbridas de isoxazol y tetrahydroquinolina sobre mPTP inducido por CaCl <sub>2</sub> 600 μM	53