

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE LA HEXOCINASA
EN LA RETINA DE LA RATA Y SU PARTICIPACIÓN
EN LA PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL EN UN
MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

GUADALUPE GABRIELA RAMÍREZ PÉREZ



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ROCÍO SALCEDA SACANELLES**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

Ramírez
Pérez
Guadalupe Gabriela
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
309155261

2. Datos del tutor

Dra.
Rocío
Salceda
Sacanelles

3. Datos del Sinodal 1

Dr.
Saúl
Gómez
Manzo

4. Datos del Sinodal 2

Dra.
María de los Angeles
Aguilar
Santamaría

5. Datos del Sinodal 3

Dra.
Patricia
Cano
Sánchez

6. Datos del Sinodal 4

M. en C.
Georgina
Nieto
Castañeda

7. Datos del trabajo escrito

Distribución subcelular de la hexocinasa en la retina de la rata y su participación en la permeabilidad mitocondrial en un modelo experimental de diabetes

40 p.
2018

AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente a la Doctora Rocío Salceda su apoyo, interés, paciencia y consejos para la elaboración de esta tesis.

También agradezco de forma especial al Biólogo Gustavo Sánchez Chávez por su asesoramiento y disponibilidad durante el tiempo que duró este proyecto.

A mis sinodales:

Doctor Saúl Gómez Manzo, Doctora María de los Angeles Aguilar Santamaría, Doctora Patricia Cano Sánchez y Maestra en Ciencias Georgina Nieto Castañeda por sus observaciones y sugerencias siempre tendientes al mejoramiento de este trabajo.

Agradezco al Programa de vinculación con los egresados de la UNAM por el otorgamiento de la beca de titulación.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
Diabetes	3
Retinopatía diabética	4
Actividad mitocondrial	9
Capacidad de las mitocondrias para acumular Ca^{2+}	11
Poros de transición de la permeabilidad mitocondrial	12
Hexocinasas	14
HIPÓTESIS	18
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS PARTICULARES	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Modelo animal	19
Inducción de diabetes tipo I	19
Obtención y aislamiento de la fracción mitocondrial	19
Western Blot	20
Hinchamiento mitocondrial	21
Determinación de la proteína	21
Análisis estadístico	22
RESULTADOS	22
Niveles de expresión de la hexocinasa I en la retina de la rata	22

Niveles de expresión del citocromo c en mitocondrias aislada de retina de rata	24
Efecto del calcio sobre el hinchamiento de las mitocondrias de la retina de ratas	25
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIÓN	32
REFERENCIAS	33

Lista de abreviaturas

ADP: Adenosín difosfato
ANT: Transportador de nucleótidos de adenina
Apaf-1: Factor de activación de proteasas apoptóticas 1
ATP: Adenosín trifosfato
CK: Creatina cinasa
CoA: Coenzina A
COX IV: Citocromo oxidasa IV
CsA: Ciclosporina A
CyPD: Ciclofilina D
Cyt c: Citocromo c
ERG: Electrorretinograma
FADH₂: Dinucleótido de flavina y adenina reducido
GFP: Proteína verde fluorescente
GLUT 1: Transportador de glucosa 1
HK: Hexocinasa
IMM: Membrana mitocondrial interna
NADH₂: Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
NMR: Resonancia magnética nuclear
OMM: Membrana mitocondrial externa
OMS: Organización Mundial de la Salud
PKC: Proteína cinasa C
PT: Transición de la permeabilidad
PTP: Poro de transición de la permeabilidad
RD: Retinopatía diabética
ROS: Especies reactivas de oxígeno
STS: Estaurosporina
STZ: Estreptozotocina
VDAC: Canal anión dependiente de voltaje

RESUMEN

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica caracterizada por el incremento de los niveles de glucosa en sangre que causa diversas complicaciones, tales como: cardiovasculares, renales y neurológicas; siendo más sobresaliente la retinopatía diabética (RD) que es la principal causa de la pérdida visual en pacientes entre los 20 y 64 años.

En la retina ocurren una serie de alteraciones tanto vasculares y neurales producidas por la hiperglucemia, pero los mecanismos no han sido definidos, sin embargo, hay una hipótesis muy aceptada que indica que existe disfunción mitocondrial y un incremento en la producción de estrés oxidativo a consecuencia de la diabetes. Se han reportado disfunciones en la mitocondria que llevan a la salida del citocromo *c*, a tiempos largos (8 meses) de inducida la diabetes, generando apoptosis en las células de la retina en un modelo experimental, esto derivado de un incremento repentino de la permeabilidad no selectiva para iones y solutos con un peso molecular mayor a 1500 Da en las membranas mitocondriales, a lo que se conoce como poro de transición de la permeabilidad (PTP) mitocondrial. Además, se ha visto que dicho PTP mitocondrial también se puede aperturar por un exceso de Ca^{2+} intracelular.

En ese sentido, las isoformas I y II de la enzima llamada hexocinasa (HK) puede interactuar con el canal anión dependiente de voltaje que se encuentra en la membrana mitocondrial externa para regular su permeabilidad de transición y así evitar la apertura del PTP mitocondrial y evitar la salida del citocromo *c* y por

consiguiente la muerte celular por apoptosis, como ya ha sido reportado por diversos grupos de investigación.

En el presente trabajo se estudió la expresión de la HK I y del citocromo c en mitocondrias aisladas de la retina de ratas a tiempos cortos de inducida la diabetes; además se estudió la capacidad de las mitocondrias para acumular Ca^{2+} lo cual es importante pues de ocurrir cambios en dicha capacidad sería muy probable la apertura del PTP mitocondrial.

INTRODUCCIÓN

Diabetes

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica caracterizada por el incremento de los niveles de glucosa en la sangre causados por detrimento en la secreción o acción de la insulina. Dentro de los síntomas de este padecimiento se encuentran la excreción excesiva de orina (poliuria), sed (polidipsia), hambre constante (polifagia), pérdida de peso, trastornos visuales y cansancio (OMS, 2016).

La diabetes se clasifica de manera general en dos tipos: la diabetes mellitus tipo 1, también llamada juvenil, se caracteriza por la deficiencia en la secreción de insulina, usualmente como resultado de la destrucción autoinmune de las células β -pancreáticas; mientras que la tipo 2, la de mayor incidencia a nivel mundial, se caracteriza por la resistencia de los tejidos para responder a la insulina, lo que se acompaña por la disminución progresiva de la secreción de insulina de las células β -pancreáticas (Tisué, 2005).

Esta enfermedad causa diversas complicaciones, las más sobresalientes son las cardiovasculares, renales, y neurológicas (retinopatía y neuropatía), por lo que es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo (Škrha et al. 2011).

De acuerdo al último estudio realizado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2014 el 8.5% de las personas mayores de 18 años tenía diabetes; en el 2015 fallecieron 1.6 millones de personas como consecuencia directa de la enfermedad a nivel mundial. En el 2014, en México el 14% de la población padecía diabetes y fallecieron 84,700 personas a causa de ello (OMS, 2018).

Retinopatía diabética

La retina, localizada en el fondo del globo ocular, forma parte del sistema nervioso central y comprende la conversión del estímulo luminoso en potenciales eléctricos en las célula fotorreceptora, proceso conocido como fototransducción; el estímulo eléctrico generado en las células fotorreceptoras es modulado por las diferentes interneuronas y se dirige hacia el cerebro a través de los axones de las células ganglionares de la retina que forman el nervio óptico, (Purves et al., 2008).

En los vertebrados la retina está formada por varias capas celulares que son: el epitelio pigmentario, capa de fotorreceptores (segmentos externos), capa nuclear externa (núcleos somas de las células fotorreceptoras), capa plexiforme externa (conexión entre las células fotorreceptoras, células bipolares y células horizontales), capa nuclear interna (somas de células de Müller, células amacrinas, células horizontales y células bipolares), capa plexiforme interna (sinapsis entre las células ganglionares, células bipolares y células amacrinas),

capa de células ganglionares y la capa de fibras del nervio óptico (figura 1) (Reynolds y Olitsky, 2011).

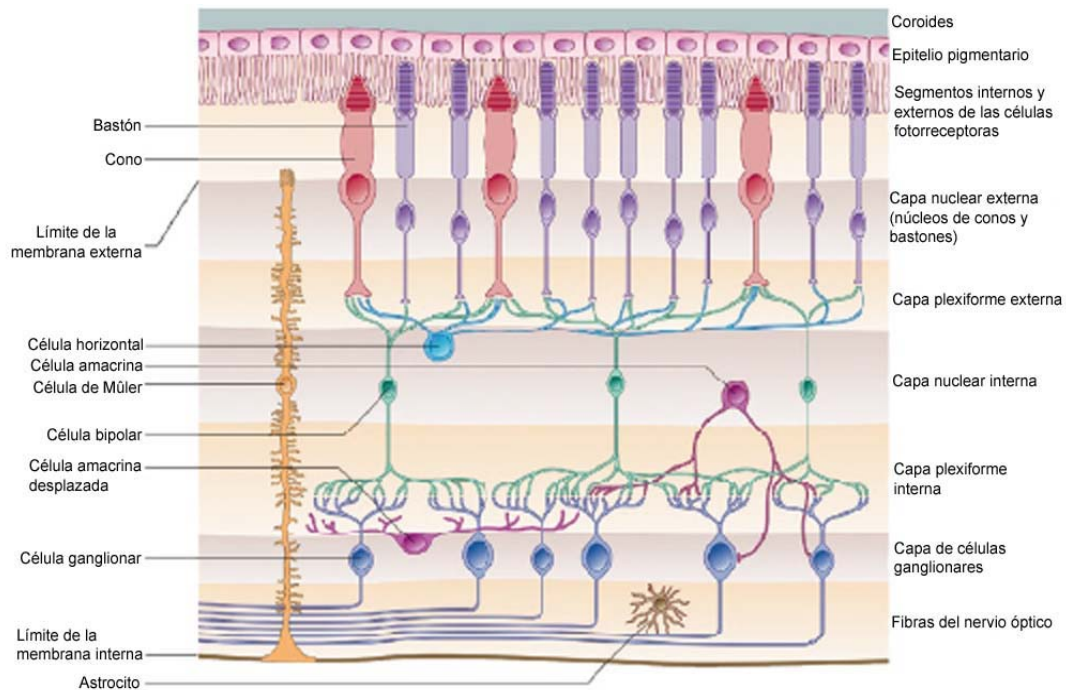


Figura 1. Estructura de la retina en vertebrados, modificada de Reynolds y Olitsky, 2011.

El metabolismo de la glucosa en la retina comienza con el transporte de ésta a través de la barrera hematorretineana. Esto es mediado de manera independiente de insulina por el transportador de glucosa GLUT1, que es expresado tanto en las células endoteliales de los capilares retinianos como en el epitelio pigmentario de la retina. Esta característica da cuenta del rápido equilibrio entre el citosol y la glucosa en suero bajo condiciones normales. Mediciones del transporte y metabolismo de glucosa en la retina *in vivo* por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR), han mostrado que el transporte de glucosa,

normalmente excede la tasa metabólica aproximadamente 16 veces (*Shamul et al., 2006*).

Entre las alteraciones más sobresalientes de la diabetes se encuentra la retinopatía diabética (RD) que es la principal causa de la pérdida visual no recuperable en pacientes entre los 20 y 64 años de edad, representa en éstos un riesgo de ceguera 25 veces mayor al que se presenta en el resto de la población, generando un 10% de nuevos casos de ceguera cada año. Los factores de riesgo para la aparición y progreso de la RD son el tipo de diabetes y el tiempo de padecerla; el 98% de los diabéticos tipo 1 y el 60% de los tipo 2 sufren algún grado de RD después de 20 años (*Aliseda y Berástegui, 2008*).

La retinopatía diabética se clasifica en términos de las alteraciones vasculares en (*Aliseda y Berástegui, 2008*):

- No proliferativa leve: se presentan microaneurismas retinianos, que son dilataciones de la pared de los capilares y aparecen como puntos rojos pequeños de bordes muy nítidos.
- No proliferativa moderada: aparecen hemorragias retinianas en número inferior a 20 en los cuatro cuadrantes, pueden existir exudados duros o lipídicos y blandos o algodonosos, además de dilataciones venosas arrosariadas en un solo cuadrante.
- No proliferativa severa: puede presentar cualquiera de las siguientes alteraciones: hemorragias intrarretinianas en número superior a 20 en cada uno de los cuadrantes, dilataciones venosas arrosariadas en 2 ó más

cuadrantes o bien, anomalías microvasculares intrarretinianas bien definidas en un cuadrante.

- Proliferativa: incluye la neovascularización retiniana y/o hemorragia vítrea con proliferación fibrovascular y desprendimiento de retina.

Sin embargo, en la RD se han reportado alteraciones a nivel neuronal, como son las modificaciones de las ondas A y B del electroretinograma y alteraciones en la sensibilidad al contraste, previos a las alteraciones vasculares (*Shinoda et al., 2007; Sasaki et al., 2010*).

Además de cambios en los mecanismos de transmisión sináptica, específicamente en el mecanismo de recaptura de taurina, aspartato y ácido γ -aminobutírico. También se ha observado una disminución del 50% en la actividad de las formas moleculares de G1 (forma globular 1) y G2 (forma globular 2) de la acetil colinesterasa y butiril colinesterasa, así como un aumento en el contenido de lactato y de glucógeno, alteración en el estado redox y disminución de la captura de ácido ascórbico; todo esto a tiempos cortos de diabetes (*Salceda, 2010*).

La hiperglucemia produce en la retina una serie de alteraciones tanto vasculares y neurales, los mecanismos no han sido definidos, sin embargo existen varias hipótesis: a) alteraciones en vías metabólicas, como son el incremento de la vía de los polioles; b) aumento en los productos finales de la glicación; c) activación de la proteína cinasa C (PKC); d) el incremento en la vía de la hexosamina; e) la disfunción mitocondrial y producción de estrés oxidativo (*Scuderi et al., 2014; Alam et al., 2015*).

La hipótesis más aceptada es la producción de estrés oxidante, el cual consiste en un desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y su neutralización por antioxidantes (*Scuderi et al., 2014*). Existen evidencias que indican que tanto la peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas así como el daño al DNA, pueden llevar a una serie de modificaciones en las células endoteliales de la retina, incluyendo la apoptosis, que se incrementan a tiempos largos tanto en humanos como en modelos animales (*Pan, 2008*). De igual manera, a tiempos largos de inducida la diabetes se reportó apoptosis de las células ganglionares, reducción de las capas plexiforme y nuclear interna, además de la pérdida de la integridad de la barrera hematorretiniana (*Barber et al., 1998 y 2011; Li et al., 2014*).

Por otra parte, se considera que las mitocondrias son las principales productoras de ROS en la célula. En este sentido, en células endoteliales de la retina en cultivo, incubadas en presencia de altas concentraciones de glucosa se han observado disfunciones de la mitocondria, que llevaron a la salida del citocromo c. De igual manera, a tiempos largos de inducida la diabetes (8 meses), se observó un aumento en la salida del citocromo c y translocación de la proteína Bax a la mitocondria, generando apoptosis de las células de la retina (*Kowluru y Abbas, 2003*), lo que sugiere que la vía intrínseca de la apoptosis juega un papel importante en la RD (*Barber et al., 2011*).

Sin embargo los niveles de diferentes indicadores del estrés oxidativo y la actividad mitocondrial no presentaron cambios significativos en la retina de la rata

a tiempos cortos de inducida la diabetes (*Sánchez-Chávez et y al., 2016; Osorio-Paz, 2015*).

Actividad mitocondrial

Estudios realizados en retinas aisladas de la rata han demostrado que convierten la glucosa en ácido láctico a una velocidad asombrosa y consumen oxígeno más rápido que cualquier otro tejido (*Winkler et al., 2003*).

La mitocondria lleva acabo la mayor parte de las oxidaciones celulares y produce la mayor parte del ATP de las células animales. La matriz mitocondrial contiene una gran variedad de enzimas, entre ellas, las que transforman el piruvato y los ácidos grasos en acetil CoA, y su oxidación a CO₂ en el ciclo del ácido cítrico; estas reacciones producen NADH₂ y FADH₂ (*Alberts et al., 2004*). La energía útil derivada de la combinación del oxígeno molecular con los electrones reactivos transportados por el NADH₂ y FADH₂ es extraída por una cadena de transporte de electrones en la membrana mitocondrial interna, la cadena respiratoria o de fosforilación oxidativa (figura 2), ésta bombea H⁺ de la matriz hacia el espacio intermembranal generando un gradiente electroquímico de protones (H⁺) a ambos lados de la membrana interna, al que contribuyen tanto el potencial de membrana como la diferencia del pH. La energía libre es liberada cuando los protones vuelven a la matriz (a través de la membrana mitocondrial interna) la cual impulsa la producción de ATP en la matriz mediante la ATP sintasa (*Alberts et al., 2004*).

El gradiente electroquímico transmembranal también es usado para el transporte activo de metabolitos como el piruvato, Ca^{2+} y fosfato a través de la membrana mitocondrial interna, incluyendo un eficiente intercambio ATP-ADP entre la mitocondria y el citosol que mantiene altamente cargado el acervo del ATP de la célula (Voet y Voet, 2006). La elevada relación entre el ATP y los productos de su hidrólisis hace que la variación de energía libre de la hidrólisis del ATP sea favorable, permitiendo así que impulse una gran cantidad de procesos celulares que requieren energía (Alberts et al., 2004). La membrana mitocondrial interna comparada con la membrana mitocondrial externa es considerablemente más rica en proteínas, ya que adicional a la cadena transportadora de electrones, ésta controla el paso de metabolitos como el piruvato, Ca^{2+} y fosfato, (Voet y Voet, 2006).

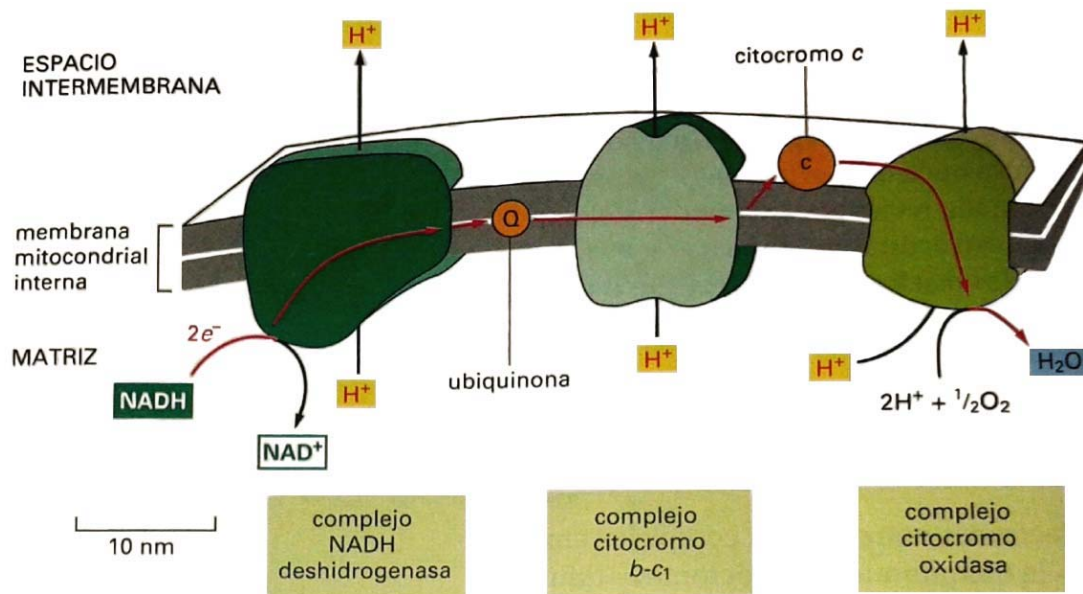


Figura 2. Cadena transportadora de electrones, tomada de *Alberts et al.* 2004.

Por otra parte la membrana mitocondrial externa contiene porinas, proteínas que forman poros no específicos que permiten la libre difusión de moléculas de hasta 10 kDa.

Capacidad de las mitocondrias para acumular Ca^{2+}

La mitocondria es capaz de modular las concentraciones de Ca^{2+} citoplásmicas lo que mantiene la homeostasis de éste, fundamental para el metabolismo, la proliferación y diferenciación celular. El Ca^{2+} acumulado dentro de las mitocondrias regula también sus funciones, incluyendo la producción de ATP, esto debido a que tres deshidrogenasas de la matriz mitocondrial son activadas por Ca^{2+} : la piruvato deshidrogenasa está regulada por una fosfatasa dependiente de Ca^{2+} , α -cetoglutarato e isocitrato deshidrogenasa están reguladas por la unión directa de Ca^{2+} a estas enzimas. La estimulación de las deshidrogenasas sensibles al Ca^{2+} , aumenta la disponibilidad de NADH y por tanto el flujo de electrones por la cadena respiratoria (*Rizzuto et al. 2012; Patergnani et al. 2011*).

El exceso de Ca^{2+} intracelular induce la apertura del poro de transición de la permeabilidad (PTP) mitocondrial, como consecuencia se produce la despolarización de las membranas mitocondriales, el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y el hinchamiento mitocondrial (*Lemasters et al. 2009*).

Además, con la apertura del PTP mitocondrial se libera el citocromo c, el cual una vez que se encuentra en el citosol forma el apoptosoma con Apaf-1 y éste

activa la caspasa-9 que a su vez activa las caspasas efectoras, caspasa-3 y caspasa-7, lo que conduce a la muerte celular apoptótica (Xiong et al., 2014).

Es por ello que la capacidad de las mitocondrias para acumular Ca^{2+} se ha utilizado para identificar si estas presentan alguna alteración.

Poros de transición de la permeabilidad mitocondrial

En 1976 Hunter y colaboradores, descubrieron un fenómeno al que llamaron transición de la permeabilidad (PT) como resultado de la apertura de un canal, el PTP mitocondrial, que resulta de una modificación en las propiedades de permeabilidad de la membrana mitocondrial interna (Brenner y Moulin, 2012).

Actualmente el PTP mitocondrial, se define como un incremento repentino de la permeabilidad no selectiva para iones y solutos con un peso molecular mayor a 1500 Da a través de las membranas mitocondriales, lo que puede llevar a un hinchamiento de la matriz mitocondrial (Brenner y Moulin, 2012; Bernardi, 2013). Se ha propuesto que el PTP abarca ambas membranas mitocondriales y que está formado por la interacción de varias proteínas (canal anión dependiente de voltaje (VDAC), transportador de nucleótidos de adenina (ANT) y ciclofilina D (CypD)), tal como se observa en la figura 3 (Pastorino y Hoek, 2008).

El VDAC es la proteína más abundante de la membrana mitocondrial externa, intercambia iones y metabolitos de un peso molecular de hasta 10 kDa, por lo que regula la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa; el ANT

intercambia ATP-ADP y al interactuar con el VDAC promueve la apertura del PTP; CypD al interactuar con el ANT favorece su unión a VDAC y promueve la apertura del PTP (*Pastorino y Hoek, 2008*); la ciclosporina A (CsA) es una proteína de la matriz mitocondrial que al interactuar con CypD la inhibe y evita la apertura del poro. La CypD puede regularse negativamente por la proteína CsA de la matriz mitocondrial, lo que mantiene cerrado el poro de PTP (*Pastorino y Hoek, 2008*). Por su parte la creatina cinasa (CK) se asocia con el complejo VDAC-ANT para facilitar la difusión del fosfato acoplado a creatina-creatina como un medio de transporte de energía en el citosol (*Crompton, 2000*). El VDAC puede modularse también por la hexocinasa.

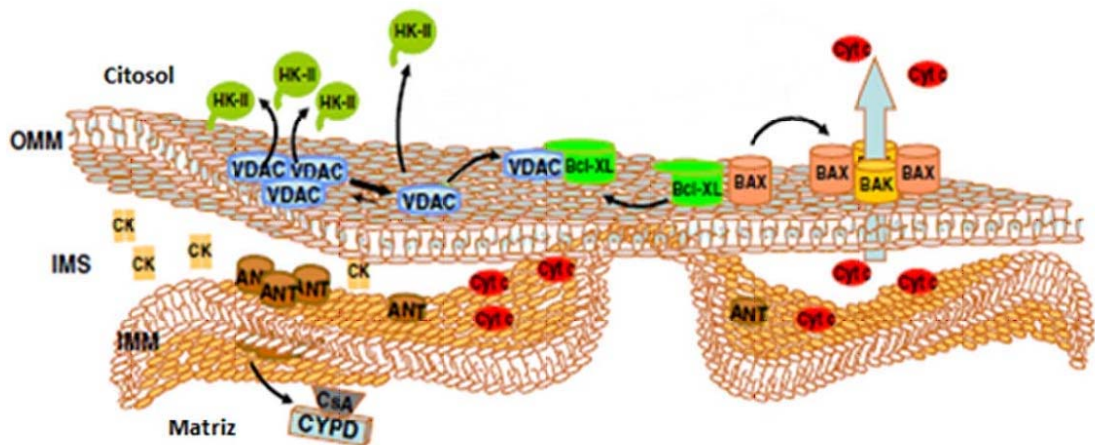


Figura 3. Poro de transición de la permeabilidad mitocondrial, modificada de *Pastorino y Hoek, 2008*. El canal anión dependiente de voltaje (VDAC) que se encuentra en la membrana mitocondrial externa (OMM), la hexocinasa (HK) presente en el citosol, el translocador de nucleótidos de adenina (ANT) localizado en la membrana mitocondrial interna (IMM), la creatina cinasa (CK) localizada en el espacio intermembranal, así como la ciclofilina D (CypD) en la matriz mitocondrial.

Hexocinasas

Las hexocinasas (HK) son enzimas encargadas de catalizar la fosforilación de hexosas que incluyen, además de la glucosa, a la fructosa, galactosa y manosa para producir hexosa 6-fosfato, lo que constituye el primer paso de la glucólisis (*Printz et al., 1997; Pacheco, 2004*).

Se conocen cuatro isoformas de la HK en mamíferos que se designan como I, II, III y IV, las cuales tienen altamente conservada su secuencia de aminoácidos y difieren en su masa molecular, su distribución en los tejidos, regulación y propiedades catalíticas (*Printz et al., 1997*).

Las isoformas I-III tienen un peso molecular aproximado a 100 kDa y su K_m para la glucosa está en el nivel micromolar, mientras que el peso molecular de la isoforma IV es de 50 kDa y su K_m para la glucosa es del orden milimolar. Las isoformas I-III son inhibidas por la glucosa-6 fosfato (*Wilson, 1997*).

En cuanto a su distribución, la isoforma I se encuentra principalmente en el cerebro, la retina y los riñones, la isoforma II en el músculo esquelético y en la retina; la distribución de la isoforma III es poco conocida y la isoforma IV o glucocinasa se expresa únicamente en el hígado y el páncreas (*Chylack, 1975; Pacheco, 2004; Rajala et al., 2013; Reidel et al., 2011*).

Ahora bien, en lo referente a la distribución subcelular, se ha visto que las cuatro isoformas se encuentran en el citosol; sin embargo las isoformas I y II contienen un residuo hidrofóbico en la región N-terminal que les permite

interactuar con el VDAC de la membrana mitocondrial externa para regular su PT (figura 4) (Wilson, 1997; Hinerasky et al., 2017).

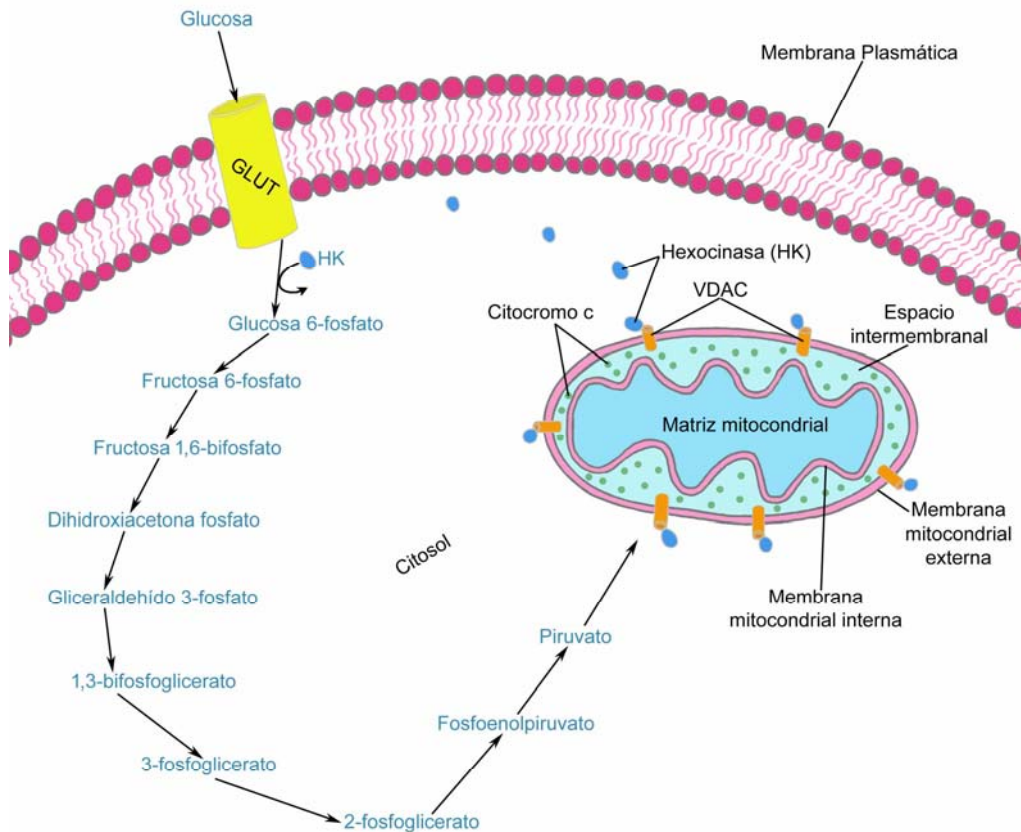


Figura 4. Participación de la hexocinasa en la glucólisis y su interacción con la mitocondria.

En este sentido, diversos grupos de investigación han demostrado que la HKI regula el VDAC y evita la muerte celular por apoptosis (Abu-Hamad et al., 2008; Seixas et al., 2004; Rajala et al., 2013; Sasaki et al., 2012 y Zaid et al., 2005). En células monocíticas humanas marcadas con la proteína verde fluorescente (GFP) se observó que la expresión de la HKI protegía de la muerte

apoptótica; de manera similar, cuando se mutó la región del VDAC (mVDAC1-GFP) a la que se une la HK se incrementó la muerte celular, (figura 5) (*Abu-Hamad et al., 2008*). Como se muestra en la figura 6, la HKI evitó la salida del citocromo c de la mitocondria aún en condiciones de apoptosis inducida por cisplatino o estaurosporina (STS) (*Abu-Hamad et al., 2008*).

Asimismo, estudios realizados con la técnica de *patch clamp* en una bicapa reconstituida de células hepáticas, demostraron que la adición de HKI inducía el cierre del VDAC; la adición de glucosa 6-fosfato (inhibidor de la HKI) causó la reapertura normal del canal (figura 7) (*Zaid et al., 2005*).

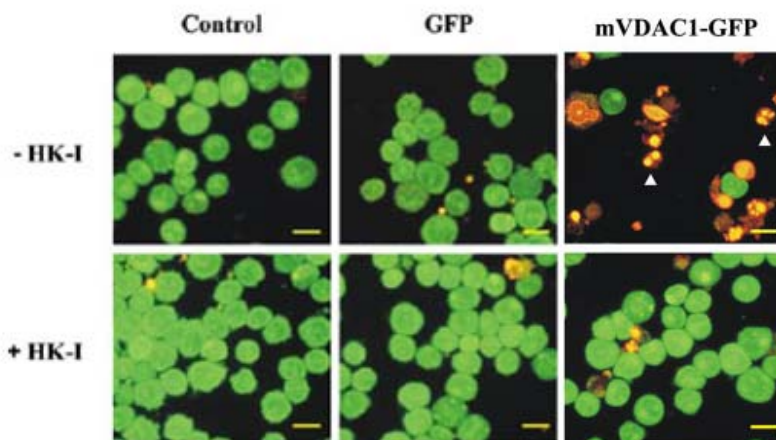


Figura 5. Microscopía de fluorescencia que muestra que la HKI protege contra la muerte celular apoptótica. La eliminación HKI o mutaciones del VDAC en la región de unión a la HKI (mVDAC1-GFP) causó la muerte de las células (marcadas con bromuro de etidio en color naranja), en células monocíticas humanas. Modificada de *Abu-Hamad et al., 2008*.

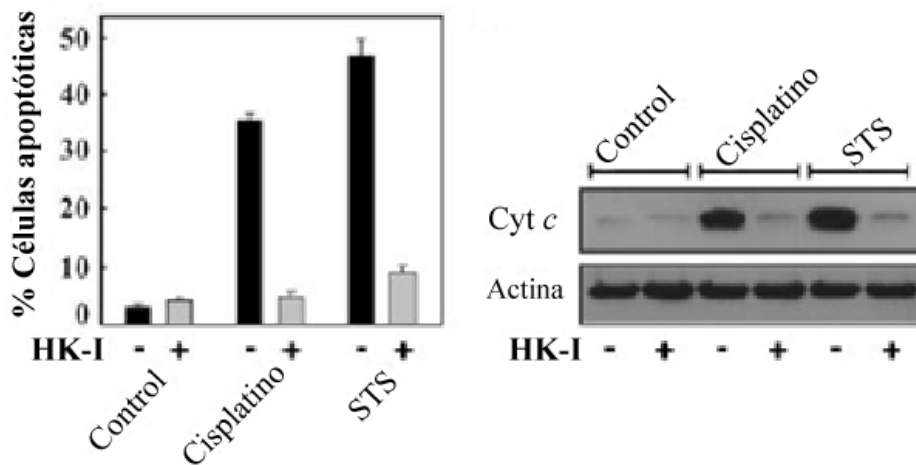


Figura 6. Se muestra que la expresión de la HKI inhibe la salida del citocromo *c* y la apoptosis inducida por cisplatino o estaurosporina (STS) en una línea celular de cáncer de mama (MCF7). Modificada de *Abu-Hamad et al.*, 2008.

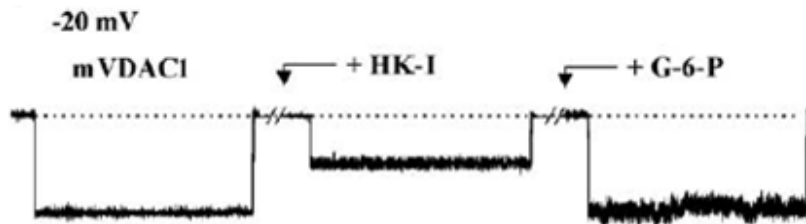


Figura 7. Registro de *patch clamp* que muestra la regulación del VDAC por la HKI en una bicapa reconstituida de células del hígado de la rata. Modificada de *Zaid et al.*, 2005.

Diversos estudios indican que las altas concentraciones de glucosa llevan a la apertura del PTP por el que se libera citocromo *c* y se inicia la apoptosis (*Barber et al.*, 1998 y 2011; *Li et al.*, 2014), asimismo que la apertura del PTP mitocondrial puede ser evitado por la HK, lo que nos sugiere que las altas concentraciones de glucosa pueden llevar a la deslocalización de ésta enzima favoreciendo a la apertura del VDAC.

HIPÓTESIS

Los altos niveles de glucosa pueden ocasionar la disociación de la hexocinasa de la membrana mitocondrial externa, lo que favorecería la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial y la liberación del citocromo c.

OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles de HK asociados a las mitocondrias de la retina de ratas normales y diabéticas y su efecto en la liberación del citocromo c.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer los niveles de expresión de la HK y su asociación a las mitocondrias en la retina de ratas normales y diabéticas.
- Determinar los niveles de citocromo c mitocondrial en la retina de ratas normales y diabéticas.
- Analizar el hinchamiento de las mitocondrias de retinas de ratas normales y diabéticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo animal

Se utilizaron ratas hembras adultas de la cepa Long-Evans con un peso entre 180 - 200 gramos, las cuales se mantuvieron bajo condiciones normales de iluminación (12 horas luz /12 horas oscuridad) con alimento y agua *ad libitum*.

Inducción de diabetes tipo I

Las ratas fueron inyectadas intraperitonealmente con estreptozotocina (STZ), 98 mg/kg, en amortiguador de citratos (ácido cítrico 90 mM y NaCl 10 mM, pH 4.8). Los niveles de glucosa en plasma fueron determinados con un glucómetro de la marca Accu-Check active Roche, dos días después de la inyección y al momento del sacrificio; se consideraron diabéticas si los niveles eran igual o mayores a 250 mg/dl. Los animales se utilizaron después de 7, 20, 45 y 60 días de inducida la diabetes, al mismo tiempo se sacrificaron ratas controles (inyectadas sólo con el buffer citratos).

Obtención y aislamiento de la fracción mitocondrial

Se homogenizaron de 4 a 10 retinas o aproximadamente 40 mg de hígado en 1 mL de buffer de extracción (HEPES 2 mM, manitol 220 mM, sacarosa 10 mM, EDTA 1 mM, taurina 10 mM y albúmina IV deslipidada 0.05% para retinas o 1%

para hígado, pH 7.4). El homogenado se sometió a una centrifugación diferencial: se centrifugó a 650 g durante 10 minutos, se recuperó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 mL del buffer de extracción y se volvió a centrifugar a 650 g; los sobrenadantes se centrifugaron a 8200 g por 15 minutos, y el pellet resultante se consideró la fracción mitocondrial. Todo el proceso se realizó a 4°C (Osorio-Paz, 2015).

Western Blot

La fracción mitocondrial se homogenizó en 100 µL de buffer de lisis (RIPA-Tris buffer EGTA 2 mM, NaCl 316 mM, Na₂MoO₄ 20 mM, NaF 50 mM, Tris-HCl 20 mM), PMSF 100 mM, EDTA 100 mM, leupeptina 0.1%, aprotinina 0.1%, SDS 0.2% y tritón-X100 2%); el homogenado total (100 µL) se adicionó con 9 µL del buffer de lisis (sin RIPA-tris). Las muestras se agitaron durante 1 hora a 4°C, y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Las proteínas se separaron siguiendo el método de *Laemmli* (1970) en un gel SDS/PAGE al 12% y se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF); la membrana se bloqueó durante 2 horas con leche deslipidada al 5% (P/V) en buffer TBS-Tween (Trizma 20 mM, NaCl 136 mM, Tween-20 0.1%, pH 7.6). La membrana se incubó toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios: anti HKI (abcam), anti citocromo c (BD Bioscience) y anti COX IV (Cell Signaling) (dilución 1:1000). Se detectó la inmuno-reactividad por incubación con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (anti-conejo 1:10,000 y anti-ratón 1: 20,000).

Mediante quimioluminiscencia se visualizaron las bandas de proteína y la intensidad de su señal fue revelada en Hyperfilm ECL (GE Healthcare Ltd.); posteriormente se digitalizó con el software DigiDocRt Alfa de Alpha INNOTECH. Los datos numéricos se obtuvieron a partir de la densidad óptica relativa mediante el programa AlphaEase FC Stand Alone. La carga de proteína se normalizó con los valores de la COX IV (dilución 1:1000, Cell Signaling) y actina (dilución 1:500, Chemicon).

Hinchamiento mitocondrial

La fracción mitocondrial de retina (88 µg proteína /mL) o de hígado (82 µg proteína /mL) fue resuspendida en 1mL buffer de hinchamiento (BH) (KCl 125 mM, EDTA 1 µM, Tris 10 mM, malato y glutamato 5 mM, pH 7.4) y se registró cada minuto la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro (LKB Biochrom ultraspec II) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Muestras paralelas se incubaron para analizar la absorbancia en ausencia de la adición de calcio (CaCl₂, 100 µM) o el efecto de la adición de éste (modificado de *Kobayashi et al., 2003*).

Determinación de la proteína

La cantidad de proteínas en las muestras se determinó por el método de Lowry (1951), con un kit comercial DC Protein Assay (Bio-Rad) y se utilizó albúmina de suero bovino como estándar.

Análisis estadístico

El análisis de los resultados se realizó con la prueba de ANOVA seguida de Tukey, mediante el programa GraphPad prism 7. Los valores fueron considerados estadísticamente significativos si $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

Niveles de expresión de la hexocinasa I en la retina de la rata

Los niveles de expresión total de HK I se determinaron con la técnica de western blot y fueron similares en la retina de ratas normales y diabéticas. La proporción de HK I asociada a las mitocondrias se calculó por la relación de la densidad óptica observada en la fracción mitocondrial respecto a aquella en el homogenado total. En la retina de ratas normales, el $52 \pm 10\%$ de la HK I se localizó en la fracción mitocondrial, y el $51 \pm 6\%$, $58 \pm 8\%$ y $55 \pm 8\%$ se observó en las retinas de ratas diabéticas de 7, 20 y 45 días, respectivamente (Figura 8 E). Así, la HK I observada tanto en la fracción mitocondrial como en el homogenado total no presentó diferencias significativas entre las retinas de ratas normales y con hiperglucemia (Figura 8 A-D).

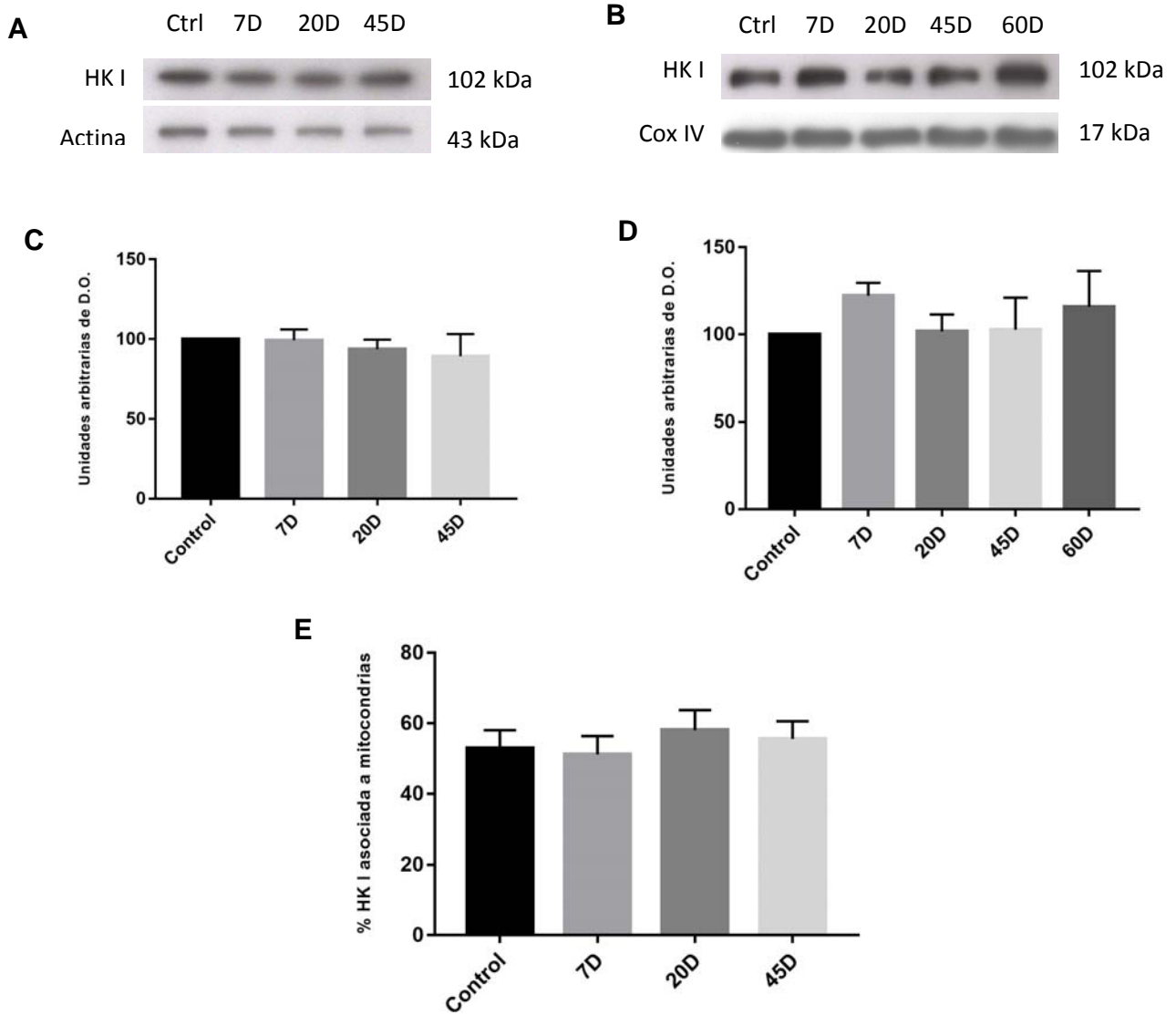


Figura 8. Niveles de HK I en la retina de ratas normales y después de 7, 20, 45 y 60 D (días) de inducida la diabetes. En **A** se observa la imagen representativa del western blot del homogenado total donde se utilizó como control de carga la actina. En **B** se observa la imagen representativa del western blot de la fracción mitocondrial utilizándose como control de carga la Cox IV. En **C** y **D** el análisis densitométrico de **A** y **B**, respectivamente. En **E** se muestra el porcentaje de HK I asociada a las mitocondrias, éste se obtuvo por la relación de la densidad óptica obtenida en la fracción mitocondrial respecto al homogenado total. Los valores son el promedio \pm SEM de tres a cinco experimentos por duplicado. Los resultados en **E** son el promedio \pm SEM de un experimento realizado por triplicado en ratas normales y después 7, 20 y 45 D de inducida la diabetes.

Niveles de expresión del citocromo c en mitocondrias aislada de retina de rata

La expresión de citocromo c se determinó en las mitocondrias aisladas de la retina de ratas normales y diabéticas. Como se muestra en la figura 9, los niveles de citocromo c en las mitocondrias de las retinas de ratas diabéticas, no presentaron cambios estadísticamente significativos con respecto a las retinas de ratas normales.

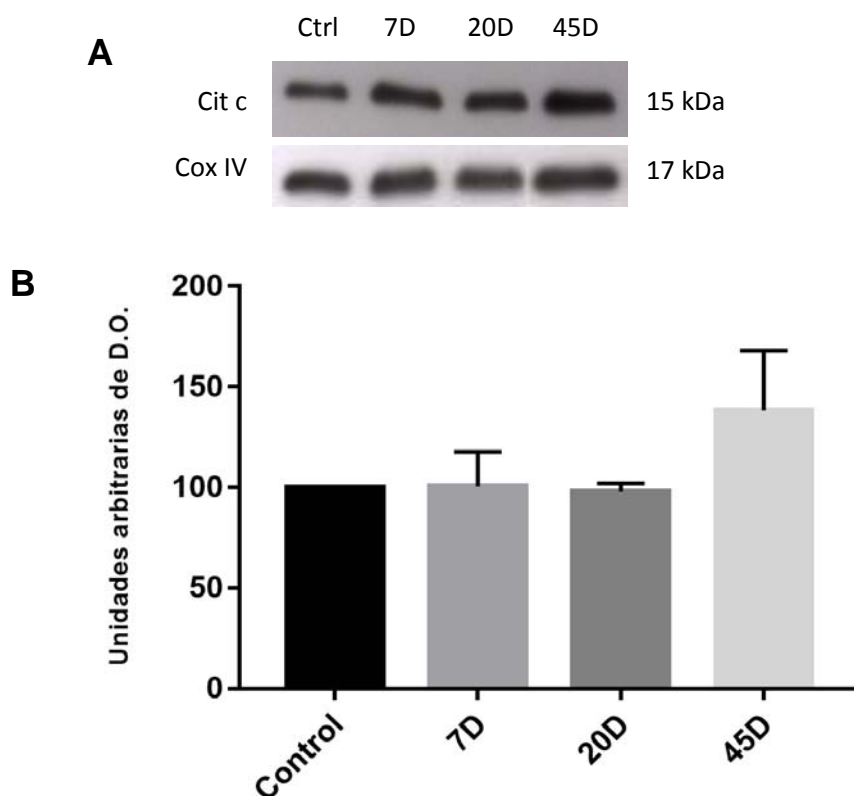


Figura 9. Niveles de expresión del citocromo c (Cit c) en mitocondrias aisladas de la retina de ratas normales y después de 7, 20 y 45 D (días) de inducida la diabetes. En **A** se observa una imagen representativa del western blot y en **B** los resultados del promedio \pm SEM de la densitometría de tres a cinco experimentos independientes realizados por duplicado. Como control de carga se utilizó la Cox IV.

Efecto del calcio sobre el hinchamiento de las mitocondrias de la retina de ratas

El hinchamiento mitocondrial se analizó como un parámetro de la capacidad de las mitocondrias para amortiguar el calcio; por ello utilizamos como control las mitocondrias aisladas del hígado de ratas normales. Como se ve en la figura 10, la adición de calcio al medio de incubación (100 μ M) causó un inmediato hinchamiento de las mitocondrias, como se ha reportado previamente (Kobayashi, 2003). Asimismo, se determinó el hinchamiento de las mitocondrias de la retina de ratas normales y diabéticas (20 y 45 días). En condiciones basales, las mitocondrias de retinas control, presentaron una pequeña y continua disminución en la absorbancia; las mitocondrias de retina de ratas de 20 y 45 días de inducida la diabetes, presentaron el mismo comportamiento que las control (Figura 11). La adición de calcio causó una leve disminución en la absorbancia, tanto en las mitocondrias de retina de ratas normales como en las diabéticas (2.7- 4.1%), la cual no fue estadísticamente significativa (Figura 12).

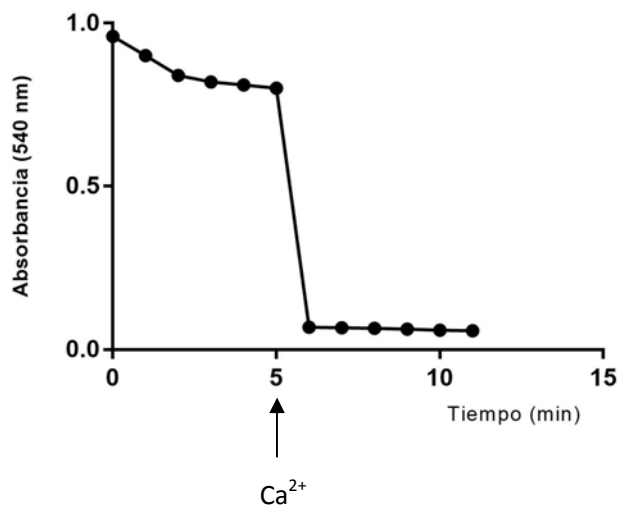


Figura 10. Hinchamiento de las mitocondrias aisladas de hígado de ratas normales, determinado por los cambios en la absorbancia a 540 nm. La flecha indica la adición de 100 μ M de calcio.

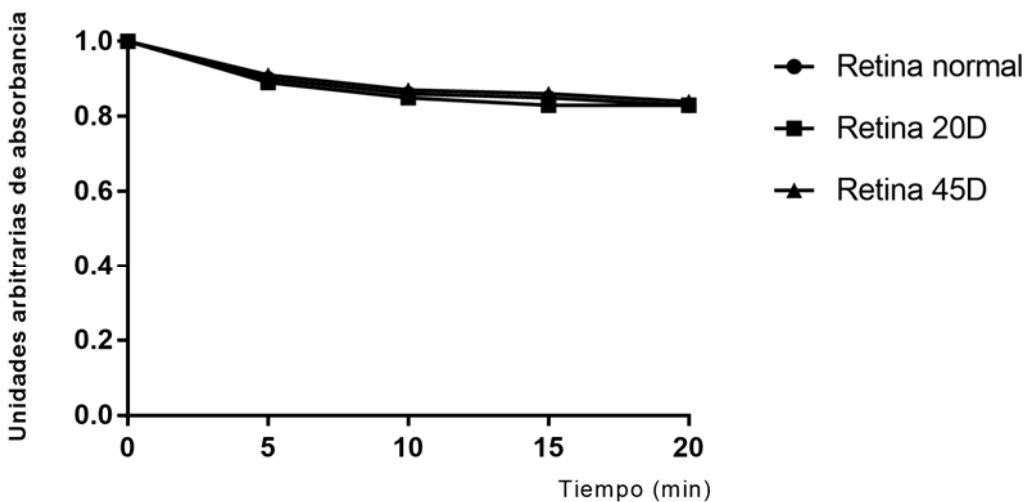


Figura 11. Hinchamiento de las mitocondrias aisladas de retina de ratas normales y diabéticas de 20 y 45 días (D) en condiciones basales (buffer de hinchamiento pH 7.4) El hinchamiento se determinó por los cambios en la absorbancia a 540 nm en función del tiempo de incubación. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado.

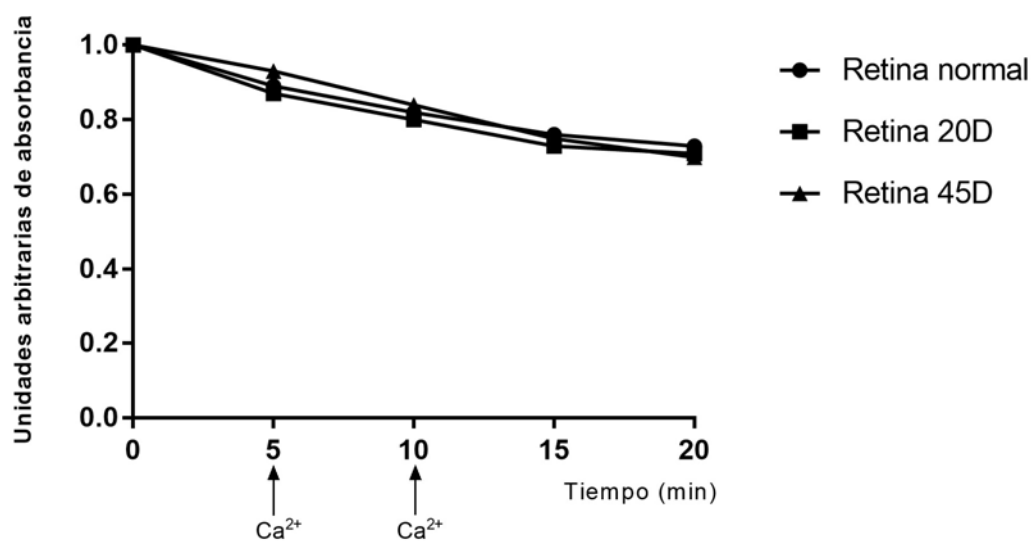


Figura 12. Efecto del calcio en el hinchamiento mitocondrial. Las mitocondrias aisladas de retina de ratas normales y diabéticas de 20 y 45 días (D), se incubaron durante 5 minutos en condiciones basales y posteriormente se adicionó calcio (100 μM) al medio de incubación (como lo indica la flecha). El cambio en la absorbancia se determinó a 540 nm. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado.

DISCUSIÓN

Una de las complicaciones causadas por la diabetes mellitus es la retinopatía que generalmente se caracteriza por alteraciones vasculares, sin embargo en distintos pacientes diabéticos se han reportado alteraciones en la respuesta a la visión de contraste y al color, así como alteraciones del ERG (*Shinoda et al., 2007; Sasaki et al., 2010*). De igual forma en modelos animales se han reportado alteraciones en los mecanismos de transmisión sináptica, así como en la expresión y actividad de las colinesterasas (*Salceda, 2010 y Sánchez-Chávez et al., 2001*). Por lo que se considera que el tejido neural puede alterarse, aún antes de que ocurran los daños vasculares.

A pesar de estas observaciones no se conocen los mecanismos por los que la hiperglucemia genera la retinopatía, en este sentido la hipótesis más aceptada es que la hiperglucemia genera alteraciones en la actividad mitocondrial que causa estrés oxidativo el que a su vez genera daño y/o muerte celular (*Scuderi et al., 2014; Alam et al., 2015*).

Diversos grupos han reportado en modelos animales, evidencia de estrés oxidativo en células endoteliales y en la retina de ratas a tiempos largos de inducida la diabetes (2-12 meses), así como alteraciones en la actividad mitocondrial (*Kowluru et al., 2003*). Asimismo, a tiempos largos de diabetes (8 meses) se demostró en células endoteliales de la retina la salida del citocromo *c* de la mitocondria, estrés oxidante y apoptosis (*Barber et al., 2011; Kowluru et al., 2003*). Estos resultados han llevado a proponer que el estrés oxidativo produce

alteraciones en la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa, llevando a la apertura del poro de transición de permeabilidad (PTP) mitocondrial, provocando con ello la salida del citocromo *c*, el cual se conoce que activa la vía de la apoptosis (*Sasaki et al., 2012*). Sin embargo estos estudios efectuados a tiempos largos de establecida la hiperglucemia, podrían indicar alteraciones causadas por la enfermedad y no la causa de ésta. Es por ello que la identificación de la apertura del PTP en las mitocondrias de la retina a tiempos cortos de la hiperglucemia puede proporcionar herramientas de suma importancia para poder establecer alternativas que eviten la generación y/o desarrollo de la RD (*Alam et al., 2015*).

Se conoce que el PTP puede regularse por distintos factores, en distintos trabajos se ha reportado un efecto protector de la HKI (*Abu-Hamad et al., 2008; Zaid et al., 2005*) resultando interesante que la asociación de la HKI a la mitocondria regula este poro y evita su apertura. De igual manera, una disminución de la HK II en células endoteliales coronarias de ratones de 4-6 semanas de diabetes, correlacionó con alteraciones en la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa, la apertura del PTP, y la salida del citocromo *c* (*Sasaki et al., 2012*).

Basados en estos estudios, en el presente trabajo se analizó la unión de HK I a las mitocondrias de la retina de ratas normales y diabéticas.

Nuestros resultados indicaron una cantidad relativamente alta (52%) de HK unida a las mitocondrias de la retina de ratas normales, sugiriendo que la enzima

protege a la mitocondria de la apertura del PTP, como se ha reportado en otros tejidos (*Abu-Hamad et al., 2008; Zaid et al., 2005; Sasaki et al., 2012*). De manera interesante, a los tiempos de diabetes estudiados (7-60 días), los niveles de HKI asociados a las mitocondrias no variaron, lo que sugiere que ésta protege a las mitocondrias. De acuerdo con estos resultados los niveles de citocromo *c* se mantuvieron constantes en las mitocondrias de retinas de ratas normales y diabéticas, lo que nos indica que la hiperglucemia no alteró la asociación de la HKI al VDAC de las mitocondrias y como consecuencia evitó la apertura del PTP mitocondrial, por lo que la permeabilidad mitocondrial no se afectó.

Estos resultados difieren con los estudios realizados por *Kowluru et al.* (2003), quien observó liberación del citocromo *c* de la mitocondria a tiempos largos de diabetes (8 meses), lo que podría indicar que el VDAC se altera sólo a tiempos largos de hiperglucemia, sugiriendo que dicha alteración es resultado de otros mecanismos previamente afectados.

Por otra parte uno de los parámetros que se emplean para determinar la permeabilidad mitocondrial es la capacidad de acumular calcio, lo que representa un mecanismo de regulación de sus concentraciones citoplásmicas. Elevadas concentraciones de Ca^{2+} y el estrés oxidativo inducen la apertura del PTP, que como consecuencia produce la despolarización de las membranas mitocondriales, el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y el hinchamiento mitocondrial (*Lemasters et al. 2009*).

En este sentido se ha observado que la capacidad de acumular calcio puede determinarse por la absorción de luz, lo cual se conoce como el hinchamiento mitocondrial, éste puede variar dependiendo de las condiciones y del tejido. Las mitocondrias aisladas del hígado de ratas presentan un rápido hinchamiento cuando se adiciona calcio (100 μM) al medio de incubación. A diferencia de lo ocurrido en las del hígado, las mitocondrias aisladas del cerebro de ratas presentan un hinchamiento mucho menor, lo que se considera como una mayor capacidad en las mitocondrias del cerebro para amortiguar el calcio, esto sugiere que las aisladas del cerebro cuentan con mejores mecanismo de protección (*Kobayashi et al., 2003*).

Semejante a lo que ocurre en las mitocondrias del cerebro, en este trabajo observamos que el calcio no causó el hinchamiento de las mitocondrias de la retina de ratas normales o diabéticas. Estos resultados sugieren que las mitocondrias de la retina presentan una gran capacidad para amortiguar el calcio y esta capacidad no se altera en tiempos cortos de hiperglucemia estudiados.

En conjunto los resultados indican que a tiempos cortos de hiperglucemia la actividad de las mitocondrias no se ve afectada; nuestros resultados están de acuerdo con aquellos de *Osorio-Paz, 2015*, en los que se demostraron cambios en la actividad mitocondrial que representaron un mecanismo de protección contra el estrés oxidativo para mantener la capacidad energética del tejido.

CONCLUSIÓN

Nuestros resultados indican que la hiperglucemia no alteró la unión de HK I a la mitocondria, los niveles de citocromo c mitocondrial ni la capacidad de las mitocondrias para amortiguar el calcio, sugiriendo una fuerte unión de la HK I a la mitocondria, lo que puede favorecer su estabilidad, y que a su vez está de acuerdo con su alta capacidad para regular el calcio y mantener el PTP cerrado evitando así la salida de citocromo c.

Sin embargo sería interesante realizar estos experimentos a tiempos largos de diabetes, así como estudios *in vitro* en los que se pueda analizar la regulación del poro de permeabilidad de transición mitocondrial por la asociación de la HK I en mitocondrias de la retina.

REFERENCIAS

- Abu-Hamad, S., Zaid, H., Israelson, A., Nahon, E., & Shoshan, B. (2008). Hexokinase-I protection against apoptotic cell death is mediated via Interaction with the voltage-dependent anion channel-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 13482-13490.
- Alam, N. M., Mills IV, W. C., Wong, A. A., Douglas, R. M., Szeto, H. H., & Prusky, G. T.(2015). A mitochondrial therapeutic reverses visual decline in mouse models of diabetes. *The Company of Biologists*, 8, 701-710.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter P. (2004). *Biología Molecular de la célula*. Barcelona. Omega.
- Aliseda D. & Berástegui L. (2008). Retinopatía diabética. , 31, 23-34.
- Barber, A. J., Gardner, T. W., & Abcouwer, S. F. (2011). The significance of vascular and neural apoptosis to the pathology of diabetic retinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52, 1156-1163.
- Barber, A. J., Lieth, E., Khin, S. A., Antonetti, D. A., Buchanan, A. G., Gardner, T. W., & The penn state retina research group. (1998). Neural Apoptosis in the Retina during Experimental and Human Diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 102, 783-791
- Bernardi, P. (2013). The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved?. *Frontiers in Physiology*, 4, 1-12.
- Brenner, C., & Moulin, M. (2012). Physiological roles of the permeability transition pore. *Circulation Research*, 111, 1237-1247.

- Chylack, L. T. Jr. (1975). The characterization of the hexokinases in several tissues of the calf eye. *Investigative Ophthalmology*, 14, 854-862.
- Crompton, M. (2000). Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. *Journal of Physiology*, 529, 11-21.
- Hinerasky da Silva, M., Martins, P. F. L., Machado de Oliveira, A. & da-Silva, S. (2017). 4-Phenyl butyric acid increases particulate hexokinase activity and protects against ROS injury in L6 myotubes. *Life Sciences*, 179, 98-102.
- Kobayashi, T., Kuroda, S., Tada, M., Houkin, K., Iwasaki, Y., & Abe, H. (2003). Calcium-induced mitochondrial swelling and cytochrome c release in the brain: its biochemical characteristics and implication in ischemic neuronal injury. *Brain Research*, 960, 62-70.
- Kowluru, R. A., & Abbas, S.N. (2003). Diabetes-induced mitochondrial dysfunction in the retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science Journal*, 44, 5327-5334.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lemasters, J. J., Theruvath, T. P., Zhong, Z., Nieminen, A. L. (2009). Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1787, 1395–1401.
- Li, X., Zhang, M., & Zhou, H. (2014). The morphological features and mitochondrial oxidative stress mechanism of the retinal neurons apoptosis in early diabetic rats. *Journal of Diabetes Research*, 2014, 1-8.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 19, 265-275.

Organización Mundial de la Salud (OMS). Temas de salud. Diabetes. www.who.int/topics/diabetes_mellitus/es/index.html. Consultada el 23 de marzo de 2018.

Osorio-Paz, I., Uribe-Carvajal, S., & Salceda, R. (2015). In the early stage of diabetes, rat retinal mitochondria undergo mild uncoupling due to UCP2 activity. *Plos One*, 10, 1-15.

Pacheco, L. D. (2004). *Bioquímica médica*. México. Limusa.

Pan, H. Z., Zhang, H., Chang, D., Li, H., & Sui, H. (2008). The change of oxidative stress products in diabetes mellitus and diabetic retinopathy. *British Journal of Ophthalmology*, 92, 548-551.

Pastorino, J. G., & Hoek, J. B. (2008). Regulation of hexokinase binding to VDAC. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 40, 171-182.

Patergnani, S., Suski, J. M., Agnoletto, C., Bononi, A., Bonora, M., De Marchi, E., Giorgi, C., Marchi, S., Missiroli, S., Poletti, F., Rimessi, A., Duszynski, J., Wieckowski, M. R., & Pinton, P. (2011). Calcium signaling around mitochondria associated membranes (MAMs). *Cell Communication and Signaling*, 9, 1-10.

Printz, R.L., Osawa, H., Ardehali, H., Koch, S., & Granner, D.K. (1997). Hexokinase II gene: structure, regulation and promoter organization. *Biochemical Society Transactions*, 25, 107-112.

Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., Lamantia, A. S., Mcnamara, J. O. & Williams, S. M. (2008). *Neurociencia*. España. Médica Panamericana.

Rajala, A., Gupta, V. K., Anderson, R. E. & Rajala, R. V.S. (2013). Light activation of the insulin receptor regulates mitochondrial hexokinase. A possible mechanism of retinal neuroprotection. *Mitochondrion*, 13, 566-576.

Reidel, B., Thompson, J. W., Farsiu, S., Moseley, M. A., Skiba, N. P. & Arshavsky, V. Y. (2011). Proteomic profiling of a layered tissue reveals unique glycolytic specializations of photoreceptor cells. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 10, 1-14.

Reynolds, J. D. y Olitsky, S. E. (2011). *Pediatric Retina*. Alemania. Springer.

Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., & Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signaling. *Nature*, 13, 566-578.

Salceda, S. R. (2010). Cap. 8 *Diabetic retinopathy: neurochemical alterations*. (pp. 121-128). México. Manual Moderno.

Sánchez-Chávez, G., Hernández-Ramírez, E., Osorio-Paz, I., Hernández-Espinosa, C., & Salceda, R. (2016). Potential role of endoplasmic reticulum stress in pathogenesis of diabetic retinopathy. *Neurochemical Research*, 41, 1098-1106.

Sasaki, K., Donthamsetty, R., Heldak, M., Cho, Y. E., Scott, B. T., & Makino, A. (2012). VDAC: old protein with new roles in diabetes. *American Journal of Physiology and Cell Physiology*, 303, 1055-1060.

- Sasaki, M., Ozawa, Y., Kurihara, T., Kubota, S., Yuki, K., Noda, K., Kobayashi, S., Ishida, S. & Tsubota, K. (2010). Neurodegenerative influence of oxidative stress in the retina of a murine model of diabetes. *Diabetologia*, 53, 971-979.
- Scuderi, S., D'Amico, A. G., Castorina, A., Concetta, F., Marrazzo, G., Drago, F., Bucolo, C., & D'Agata, V. (2014). Davunetide (NAP) protects the retina against early diabetic injury by reducing apoptotic death. *Journal Molecular Neurosci*, 54, 395-404.
- Seixas, da-Silva W., Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., Moreno-Sanchez, R., De Felice, F. G., de Meis, L., Oliveira, M. F., & Galina, A. (2004). Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant defense. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 39846-39855.
- Shamul, O. M., Berkich, D. A., Xu, Y., King, M. T., Gardner, T. W., Simpson, I., & LaNoue, K. F. (2005). Analysis of glucose metabolism in diabetic rat retinas. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism*, 290, 1057-1067.
- Shinoda, K., Rejdak, R., Schuettauf, F., Blatsios, G., Völker, M., Tanimoto, N., Olcay, T., Gekeler, F., Lehaci, C., Naskar, R., Zagorsk, Z., & Zrenner, E. (2007). Early electroretinographic features of streptozotocin-induced diabetic retinopathy. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, 35: 847-854.
- Škrha J. Jr., Gáll, J., Buchal, R., Sedláčková, E., Pláteník, J. (2001). Glucose and its metabolites have distinct effects on the calcium-induced mitochondrial permeability transition. *Folia Biologica*, 57, 96-103.
- Tusié, L. M. T. (2005). Genes and type 2 diabetes mellitus. *Archives of Medical Research*, 36, 210-222.

Voet, D., & Voet, J. G., (2006). *Bioquímica*. Argentina. Médica Panamericana.

Wilson, J.E. (1997). Hexokinases: an introduction to the isoenzymes of mammalian hexokinase types I-III. *Biochemical Society Transactions*, 25, 103-107.

Winkler, B. S., Pourcho, R. G., Starnes, C., Slocum, J., & Slocum, N. (2003). Metabolic mapping in mammalian retina: a biochemical and H-2-deoxyglucose autoradiographic study. *Experimental Eye Research*, 77, 327-337.

Xiong, S., Mu, T., Wang, G., & Jiang, X. (2014). Mitochondria-mediated apoptosis in mammals. *Protein & Cell*, 5, 737-749.

Zaid, H., Abu- Hamad, S., Israelson, A., Nathan, I., & Shoshan-Barmatz, V. (2005). The voltage-dependent anion channel-1 modulates apoptotic cell death. *Nature*, 12, 751-760.