



Efectos del ácido abscísico en la corteza prefrontal de ratón en un modelo de diabetes tipo I

Quezada, K; Baliño, P; Muriach, M.

Área de Fisiología, Universitat Jaume I, Castellón, España

Resumen

La diabetes tipo I es un trastorno autoinmune que destruye las células β de los islotes de Langerhans del páncreas. La hiperglucemia resultante induce numerosas complicaciones que, entre otros, afectan al sistema nervioso central (SNC), induciendo inflamación, estrés oxidativo, muerte neuronal y deterioro cognitivo. El ácido abscísico (ABA) es una fitohormona antioxidante utilizada por las plantas para reducir el estrés y que recientemente ha despertado interés por su participación en el manejo de la homeostasis de la glucosa en humanos. Este trabajo tiene como objetivo determinar el efecto que tiene la administración del ABA sobre el estado oxidativo de la corteza cerebral en un modelo de diabetes tipo I en ratón.

En el estudio se utilizaron ratones C57BL6 macho a los que se indujo la diabetes mediante inyección de aloxana y se les administró ABA durante 3 semanas. El estado oxidativo se determinó evaluando el estado de las defensas antioxidantes (actividad de las enzimas glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR), concentración de GSSG, GSH, cisteína y ácido glutámico), así como el grado de daño oxidativo a proteínas (contenido en grupos carbonilo). Los resultados obtenidos muestran una alteración de las defensas antioxidantes en corteza prefrontal de ratón tres semanas después de la inducción de la diabetes, sin que se observe daño oxidativo a proteínas. Por lo tanto, se demuestra que existe una agresión oxidativa sin que llegue a establecerse una situación de estrés oxidativo. Asimismo, la administración de ABA es capaz de modular el estado oxidativo de la corteza prefrontal de ratones diabéticos sin afectar al estado glucémico de dichos animales.

Palabras claves: Diabetes tipo I; Estrés oxidativo; Corteza prefrontal; Acido Abscísico

Introducción

La diabetes tipo I es un trastorno autoinmune que ataca a las células β de los islotes de Langerhans del páncreas hasta dañarlo o destruirlo lo suficiente para reducir y eliminar la producción de insulina. En 1984, George Eisenbarth desarrolló un modelo conceptual para la patogénesis de la diabetes tipo I que todavía se utiliza hoy en día. El modelo traza la masa de células β frente a la edad, destacando una secuencia de eventos que comienza con un riesgo genético predisponente y luego un riesgo genético precipitante que causa autoinmunidad específica de los islotes, seguido de pérdida de células β , disglucemia clínica de la diabetes y progresión rápida hasta la pérdida completa de células β (DiMeglio et al., 2018)

En estos últimos años se ha reforzado la evidencia de que la diabetes tipo I también afecta a la

integridad funcional y estructural del sistema nervioso central (SNC) debido a las alteraciones vasculares y metabólicas (tanto agudas como crónicas) propias de esta enfermedad (Miladinova V., 2017). Así, se han observado cambios electrofisiológicos y estructurales, así como deterioro cognitivo que implican un daño neuronal directo causado por hiperglucemia persistente, un fenómeno conocido como neurotoxicidad de la glucosa (Bhusal et al., 2019; Wang et al., 2020). Sin embargo, la patogenia de esta enfermedad es poco conocida y su diagnóstico es complicado debido a las múltiples vías patogénicas involucradas. Entre los mecanismos fisiopatológicos implicados en el desarrollo de las complicaciones de la diabetes se encuentra el estrés oxidativo, consistente en un desequilibrio entre los agentes prooxidantes y las defensas antioxidantes del organismo (Soti et al., 2019)

Existe evidencia de que el daño oxidativo aumenta en la diabetes tipo I, debido a un aumento de especies reactivas de oxígeno generadas como resultado de la hiperglucemia. Este daño oxidativo parece estar implicado en el desarrollo de muchas de las complicaciones secundarias de la diabetes, tales como la neuropatía (West, 2000). De hecho, Liu et al., sugirieron que el desarrollo de esta neuropatía diabética podría ser consecuencia de la inflamación persistente provocada por la secreción de una gran cantidad de factores proinflamatorios y sustancias pro-oxidativas (Liu et al., 2018). Además, se ha demostrado que las defensas antioxidantes están alteradas en sujetos diabéticos, lo que sugiere una capacidad alterada de barrido de radicales libres dañinos (Vessby et al., 2002). En una situación normal, enzimas antioxidantes, como la catalasa o el glutatión peroxidasa (GPx) desempeñan un papel de defensa en el cerebro a través de la inactivación de oxidantes. De hecho, existen evidencias de que determinados tratamientos con compuestos antioxidantes podrían resultar útiles para atenuar las complicaciones de las diabetes asociadas al estrés oxidativo (Miranda et al., 2007)

El ácido abscísico (ABA) es una hormona vegetal isoprenoide que desempeña un papel importante en la regulación de las respuestas de las plantas al estrés ambiental. Sin embargo, también parece tener un papel regulador como hormona en humanos, al modular la función de las células inmunes innatas, así como la homeostasis de la glucosa y la liberación de insulina (Magnone et al., 2020). De hecho, gracias a sus propiedades antioxidantes y su capacidad para modular la glucemia, el ABA, se ha propuesto recientemente como posible tratamiento en pacientes prediabéticos (Derosa et al., 2020). Es

remarcable además que, Le Page y colaboradores observaron que las concentraciones de ABA son significativamente más altas en el cerebro de animales como cerdo y ratas que en otros tejidos de los mismos animales, y confirmaron que el propio cerebro produce y libera ABA (Le Page-Degivry -Th. et al., 1986).

Con estos antecedentes, la hipótesis que se plantea en este trabajo es que el ABA es capaz de modular el estado oxidativo de la corteza cerebral en un modelo de diabetes tipo I en ratón.

Para desarrollar dicha hipótesis, el objetivo del presente estudio es determinar la posible existencia de una situación de estrés oxidativo en la corteza prefrontal de ratones tras tres semanas de la inducción de la diabetes tipo I. Se pretende valorar, además, si la administración de ABA es capaz de modular el estado oxidativo de la corteza prefrontal de dichos ratones.

Para determinar la presencia de estrés oxidativo en la corteza cerebral de ratones diabéticos, se evaluará por un lado el estado de las defensas antioxidantes mediante la determinación del estado del sistema glutatión, uno de los principales sistemas antioxidantes intracelulares (Meister & Anderson, 1983). Este sistema incluye el glutatión (en su forma oxidada (GGSG) y reducida (GSH)), así como las enzimas implicadas en su metabolismo. Así, se determinaron la actividad de las enzimas GPx, que cataliza la reacción que permite eliminar peróxido de hidrógeno mediante la oxidación de GSH a GSSG y la enzima GR, que cataliza el proceso inverso. Igualmente, se estudió la concentración de ácido glutámico y L-cisteína, dos precursores del GSH.

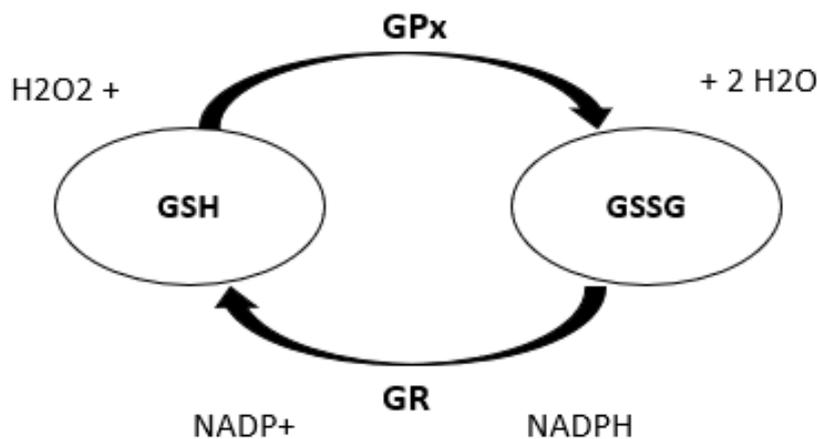


Figura 1. Reducción del H₂O₂ a agua, en presencia de la GPx, transformándose el glutatión reducido (GSH) en glutatión oxidado (GSSG). El GSSG es reducido enzimáticamente a GSH por el glutatión reductasa NADPH, que se oxida a NADP

Por otro lado, para determinar la presencia de daño oxidativo se determinará el contenido en grupos carbonilos (como medida de daño oxidativo a proteínas) (Baliño et al., 2021). Además, se determinará la concentración de ABA en corteza cerebral, para estudiar el efecto de la suplementación con dicho antioxidante.

Materiales y Métodos

Animales y diseño experimental

Se utilizaron en este estudio un total de 40 ratones macho C57BL6. Los animales, tenían cuatro semanas de edad a su llegada. Todos los procedimientos realizados en esta investigación estaban aprobados por el comité de bienestar animal de la Universidad Jaume I. Los animales después de estar 2 semanas en la sala de cuarentena fueron trasladados a la sala de colonia donde se asignaron tres ratones por cada jaula. Se proporcionó agua y alimento durante todo el estudio, cumpliendo con todos los procedimientos experimentales establecido el Consejo de la Comunidad Europea (2010/63/UE) y según lo indica el artículo 33 punto 5 y 6 (Anexo 1).

Se dividió a los ratones en 4 grupos (n= 9-18 por grupo): diabéticos (D), diabéticos-ABA (D-ABA), Controles-ABA (C-ABA) y controles (C). Los grupos diabéticos y diabéticos-ABA se les administró aloxana intraperitoneal (200mg/kg). Se considerarán diabéticos a aquellos que en la prueba de glucemia marcan más o igual 300 mg/dl de glucosa en sangre. Aquellos animales que presentaban un claro deterioro físico se les administró insulina en dosis de 0,1 mL/10g peso animal.

Productos Químicos

Para la inducción de la diabetes se usó aloxana disuelta en tampón citrato fosfato 10mM pH 4,5 según el modelo experimental propuesto por Hermenegildo y colaboradores, 1993 (Hermenegildo, 1993). El ABA se preparó a una dosis de 20mg/kg en DMSO al 2% en suero salino (0,9%). A los grupos (control-ABA) y (diabéticos-ABA) se les administró ABA intraperitoneal (20mg/kg) durante las 3 semanas que duró el experimento. Se determinaron los valores de peso y glucemia cada 2 días de todos los grupos. Finalmente, los animales fueron sacrificados por medio de CO₂ y se extrajeron las muestras de sangre, y corteza las cuales se congelaron a -80 °C para su posterior análisis.

Pruebas de glucemia

La glucemia se midió utilizando un glucómetro ACCU-CHECK (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suiza) cada dos días mediante la recolección de una gota de sangre extraída de la cola del ratón.

Defensas antioxidantes

El glutatión (L-glutamil-L-cisteinil-glicina) es un tripéptido con múltiples funciones siendo el principal sistema antioxidante de la célula y un agente de desintoxicación para ROS y especies de nitrógeno reactivo. Hay dos formas de glutatión: la forma oxidada (GSSG) y la forma reducida (GSH). El par redox GSH/GSSG es un cosustrato para las enzimas glutatión peroxidasa y reductasa (GPx y GR) que actúan como un tampón redox celular modulando diferentes procesos bioquímicos y biofísicos sensibles. La L-cisteína es un precursor de la biosíntesis de glutatión utilizado como biomarcador de estrés oxidativo (Morris et al., 2014).

GSH, GSSG, Acido glutámico y L-cisteína

Las concentraciones de GSH, GSSG, ácido glutámico y L-cisteína se cuantificaron cromatográficamente utilizando el método de Reed (Reed et al., 1980). Este método deriva los grupos amino con 1-fluoro-2,4-dinitrobenzenceno (reactivo de Sanger) después de bloquear los grupos tiol libres con ácido yodoacético. Brevemente, se centrifugaron 200 µL de muestra con 20 µL de ácido perclórico al 20%. Después de la centrifugación se le añadió el ácido yodoacético (40 µL, 0,1 M). Después de ajustar a pH 9 se le añadió 200 µL del reactivo Sanger y con oscuridad se incubó en la nevera durante 30 minutos. Luego, las muestras se incubaron durante toda la noche a 4°C. Las muestras se centrifugaron y filtraron a través de un filtro de nailon antes de proceder al análisis cromatográfico. Las soluciones de trabajo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que se utilizaron fueron metanol: agua (4: 1, v/v) (fase móvil A) y metanol: tampón acetato de sodio 3,45 M pH 5,3 (64:36, v/v) (fase móvil B). La separación se realizó utilizando un Kromasyl-NH2 250 × 4,6 mm 5 µm columna (Waters Corporation, Milford, MA, EE.UU.), y el detector de UV-Vis se fijó a 365 nm. El gradiente de separación fue 20% B desde el tiempo inicial hasta 10 min, que luego se incrementó linealmente hasta 80% B a los 45 min a un flujo de 1 mL / min.

Actividad de glutatión peroxidasa (GPx)

GPx se determinó espectrofotométricamente y se midió controlando la desaparición de NADPH a 340 nm (Lawrence et al., 1978). Brevemente, se añadió 50-µL de muestras que se mezcló con tampón fosfato potásico 0,1 M pH 7,0 (550 µL) que contiene ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), NaN₃ 3 (ambos 1 mM) y 100 µL de las siguientes soluciones: GSH disulfuro reductasa (0,24 U / mL), glutatión reducido (1 mM), y NADPH (0,15 mM). Después se incubó (3 min a 37 °C), y se inició la reacción mediante la adición de peróxido de hidrógeno 1,5 mM (100 µL).

Actividad de glutatión reductasa (GR)

GR se determinó espectrofotométricamente utilizando el método propuesto por Smith (Smith et al., 1988). Brevemente, cuando la reducción provocada por GR de GSSG a GSH se produjo en presencia de 5,50-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) se formó ácido 2-nitrobenzoico como subproducto. La formación se controló a 412 nm. La reducción de GSSG se inició agregando 25 μ L de muestra de cerebro a una solución que contiene DTNB 3 mM preparada en tampón fosfato sódico 10 mM, NADPH 2 mM y EDTA 10 mM en tampón fosfato sódico 0,2 M pH 7,5.

Daño a macromoléculas: oxidación de proteínas.

El daño oxidativo a las macromoléculas se evaluó de la siguiente manera. El daño oxidativo de las proteínas tiene una química compleja, produciendo la aparición de numerosos grupos carbonílicos y otras alteraciones, siendo así que las proteínas sufren oxidación de sus aminoácidos más sensibles, como: cisteína, triptófano, valina, fenilalanina y metionina (Cárdenas et al., 2012).

Se determinó la oxidación proteica espectrofotométricamente utilizando el método propuesto por Levine et al. (1980) La oxidación proteica se midió por medio de la cuantificación de los grupos carbonilo formados durante la incubación con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH) en condiciones ácidas, basándose en la reacción equimolar entre ellos. La DNFH unidad de proteínas se cuantificó colorimétricamente ($\epsilon_{373} = 21.10^{-3} M^{-1} C m^{-1}$) tras la separación de las proteínas derivatizadas por la precipitación con el ácido, lavado y posterior solubilización con la guanidina. Se toma 200 μ L y se añade 400 μ L de (DNFH) en un eppendorf. De la misma muestra se toma 200 μ L y se le añade 400 μ L de HCL en otro eppendorf (este será el blanco). Se incubó 1h a temperatura ambiente con agitación ocasional. Se centrifugó a 12600 rpm durante 3 min. Posteriormente se añadió 1mL de TCA al 20% y se volvió a Centrifugar a 12600 rpm durante 3 min. Se recoge el pellet y se lavó 3 veces con 1mL de etanol: acetato de etilo (1:1 v/v), dejando solo el pellet se centrifugó a 12600 rpm durante 3min. Finalmente, al pellet que queda se añade 1mL de Guanidina 6N a pH 2,3 y se agita en el vortex durante 3 min (también se puede calentar la muestra a 38 grados hasta que se destruya el pellet), se debe Centrifugar nuevamente las muestras a 12600 rpm durante 3 min para medir el sobrenadante en micro cubetas a 370nm.

Contenido de proteínas

Los niveles de proteína se determinaron siguiendo el método descrito por Bradford (Emami

Bistgani et al., 2017) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.).

Acido Abscísico ABA

Los niveles de ABA existentes en el tejido de corteza prefrontal se determinaron cromatográficamente a través del análisis de ácido abscísico que fue modificado por Simura (Šimura et al., 2018) a partir de la extracción de tubos de 2mL en los que se pesa y tritura 20-50 mg peso fresco con molinillo de bolas (Millmix 20) a 17 rpm durante un periodo de 5 minutos. Posteriormente se añadió 25 μ L de ABA-d6 1 ppm (25 ng) como estándar interno y 1 mL de ACN 50% frío. Se extrajo mediante molino de bolas durante 10 minutos a 17 rpm y se lo puso en un ultrasonido a 5min para luego centrifugar 5 minutos a 10000 rpm. Se extrajo en fase sólida (SPE) con cartuchos OASIS HLB de 1cc, 30mg en donde se acondicionó la columna de 1 mL MeOH + 1 mL H₂O de Milli Q descartándolos. Después se puso en nuevos eppendorf de 2ml debajo y pasar 1 mL de muestra seguido de 500 μ L ACN al 30% recogiendo los tubos para así pasar a viales de cromatografía. Se cuantifica la respuesta obtenida (Área de ABA/Área ABA-d6) y se interpola con la obtenida de una curva patrón preparada con ABA comercial. Uso del software Masslynx v4.2 para procesar los datos cromatográficos.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software SPSS (IBM SPSS Statistics para Windows, versión 25.0 IBM Corp, Armonk, NY, EE. UU.). De modo que se procedió a presentar los resultados como valores de la media \pm SE. Por otro lado, las comparaciones entre los grupos se realizaron mediante un Anova de un factor.

Resultados

Peso y la glucemia basal

La pérdida de peso es uno de los efectos de la diabetes tipo I, por lo que se monitoreó el peso de los ratones durante el transcurso del experimento. El análisis estadístico confirmó que el peso de los animales diabéticos fue significativamente menor que el de los controles, sin que la administración de ABA afecte a este parámetro (figura 2a).

Además del peso, se controló la glucemia de los animales a lo largo del estudio. En este caso el análisis estadístico muestra un aumento significativo de la glucemia en los grupos de animales diabéticos frente a los controles. La administración de ABA tampoco afectó a la glucemia de los animales diabéticos o controles (figura 2b).

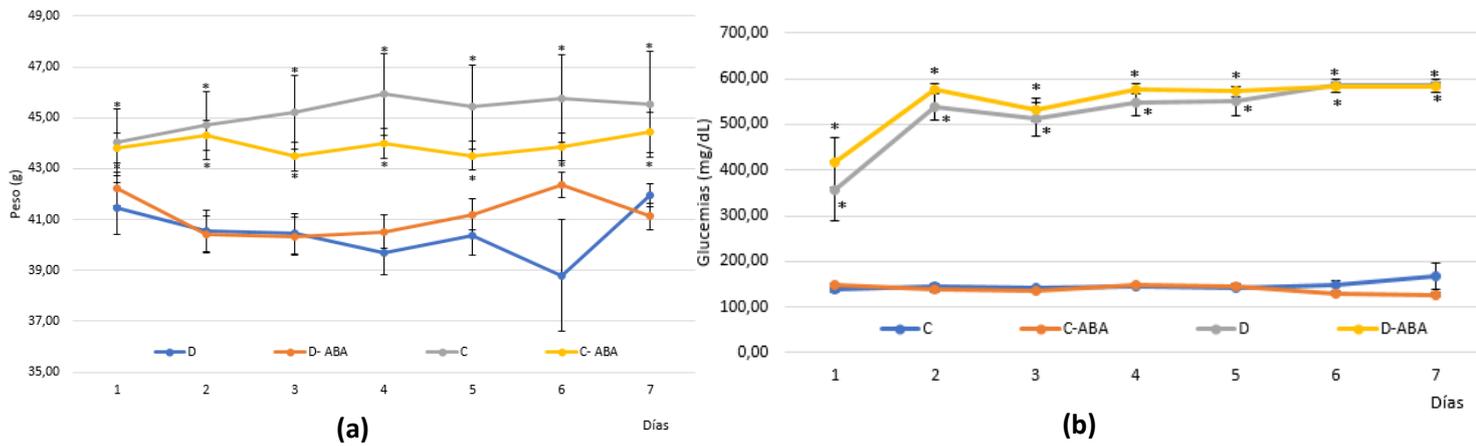


Figura 2. a) Pesos de los animales (* $p < 0,05$ vs C y C-ABA); **(b)** glucemia basal (* $p < 0,05$ vs C y C-ABA)

Concentración de ABA en la corteza prefrontal

La Figura 3 muestra el contenido de ABA en corteza prefrontal de los ratones pertenecientes a los distintos grupos. El análisis estadístico muestra que los animales

diabéticos presentan una concentración de ABA significativamente menor que los pertenecientes a los grupos control. la administración

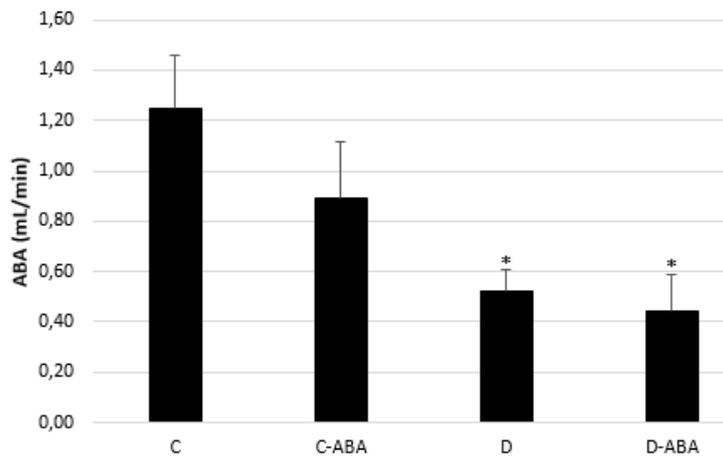


Figura 3. Efecto del ABA sobre los ratones diabéticos y no diabéticos en la corteza prefrontal (* $p < 0.05$ vs C y C-ABA)

diaria de ABA durante 3 semanas no incrementó de forma significativa el contenido de esta hormona en la corteza prefrontal de los animales controles ni en los diabéticos.

actividad GPx en la corteza prefrontal de ratones diabéticos con respecto a los controles. Contrariamente, la actividad GR se vio reducida significativamente tras tres semanas de condición diabética. No se observaron diferencias significativas a nivel enzimático entre grupos tras la administración de ABA.

Actividad enzimática GR y GPx en corteza prefrontal

La Figura 4 refleja la actividad enzimática del sistema glutatión, GPx y GR, en la corteza prefrontal de los ratones pertenecientes a los cuatro grupos de estudio (Figura 4a, b, respectivamente). El análisis estadístico muestra un aumento significativo de la

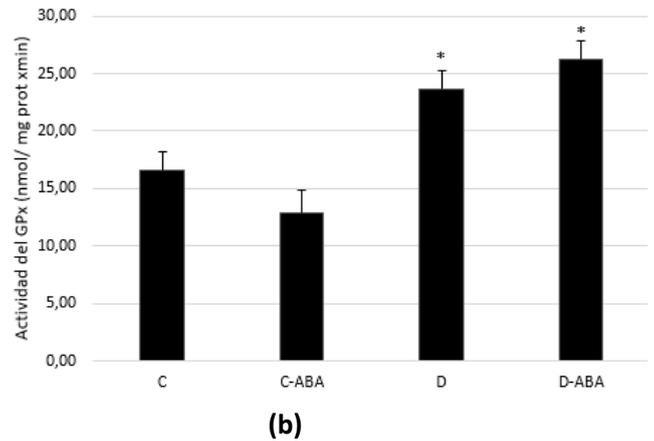
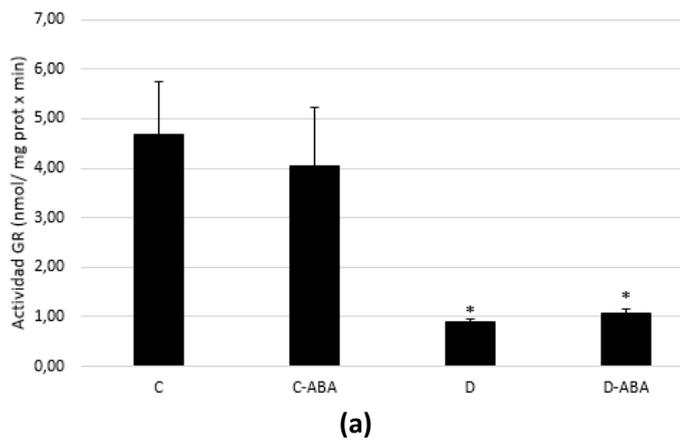
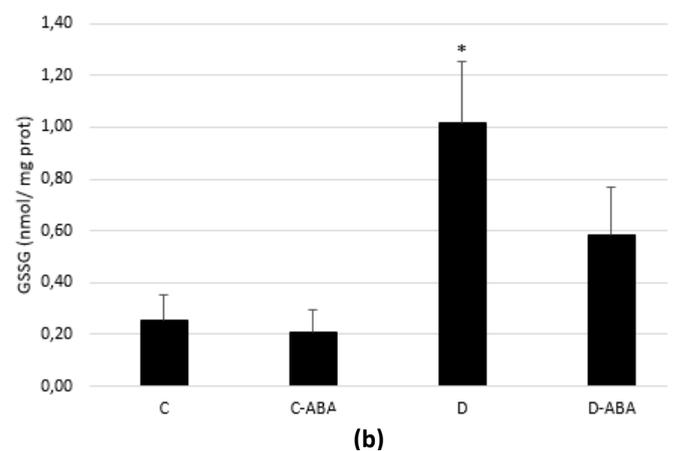
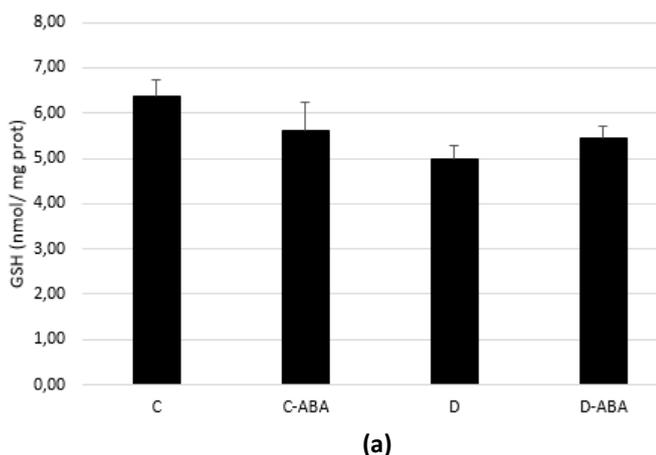


Figura 4. Efecto de la actividad enzimática en la corteza prefrontal por diabetes tipo I peroxidasa (GPx) (a) y glutación reductasa (GR) (b) en la corteza prefrontal del cerebro. Las barras representan la media \pm SEM. * $P < 0,05$ vs C y C-ABA)

Concentración de GSH, GSSG, relación GSH / GSSG, L-cisteína y Glutamato en corteza prefrontal

No se observaron diferencias significativas en los niveles de GSH en la corteza prefrontal después de 3 semanas desde la inducción de la diabetes y/o administración de ABA (Figura 5a). Sin embargo, el ANOVA de un factor muestra diferencias significativas en las concentraciones de GSSG entre los distintos grupos. Las comparaciones post hoc indicaron que concentraciones de GSSG aumentaron en los grupos diabéticos en comparación con los controles, controles ABA y diabéticos-ABA (Figura 5b; $p < 0,05$ D vs C, C-ABA y D-ABA). Con respecto a la proporción de GSH / GSSG en la corteza prefrontal, el ANOVA de un factor mostró una diferencia estadísticamente significativa en los grupos.

Las comparaciones post hoc demostraron una relación GSH / GSSG aumentada en diabéticos en comparación con los controles, controles ABA y diabéticos- ABA (Figura 5c; * $p < 0,05$ vs controles, controles ABA y diabéticos- ABA). Cuando se compararon las concentraciones de L-cisteína en muestras de corteza de ratón. Las comparaciones post hoc indicaron una disminución en grupo diabéticos en comparación con los controles, controles ABA y diabéticos- ABA (figura 5d; $p < 0,05$ vs controles, controles ABA y diabéticos- ABA). Las comparaciones post hoc indicaron un aumento de glutamato en grupo diabéticos en comparación con los controles, controles-ABA y diabéticos-ABA (figura 5e; $p < 0,05$ vs controles, controles ABA y diabéticos- ABA)



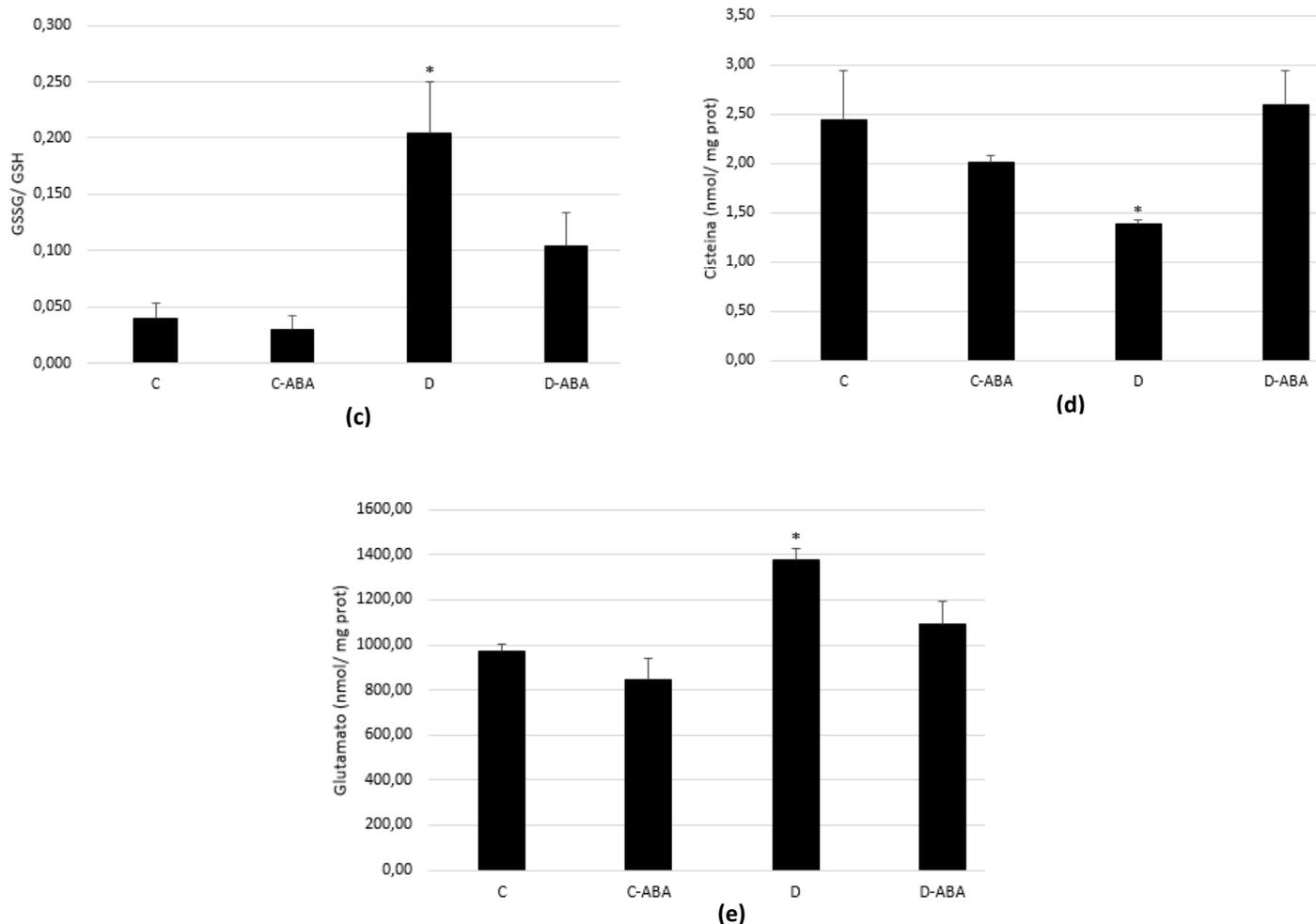


Figura 5. Efecto del ácido abscísico sobre las concentraciones de glutatión (GSH) en la corteza prefrontal (a), concentraciones de disulfuro de glutatión (GSSG) (b) (* $p < 0,05$ C, C-ABA y D-ABA), relación GSH / GSSG (c) (* $p < 0,05$ frente C, C-ABA y D-ABA, * $p < 0.05$ frente a C, C-ABA y D-ABA), valores de L-cisteína (d) (* $p < 0.05$ frente C, C-ABA y D-ABA) y valores de glutamato (e) (* $p < 0.05$ frente C, C-ABA y D-ABA). Las barras representan la media \pm SEM de los grupos control, control-ABA, diabéticos y diabéticos-ABA.

Efectos de la administración ABA en los grupos carbonilos

El daño oxidativo a las macromoléculas se evaluó utilizando los grupos carbonilos como medida

para estudiar el daño oxidativo a las proteínas. El ANOVA de un factor mostró diferencia significativa entre los grupos (Figura 6).

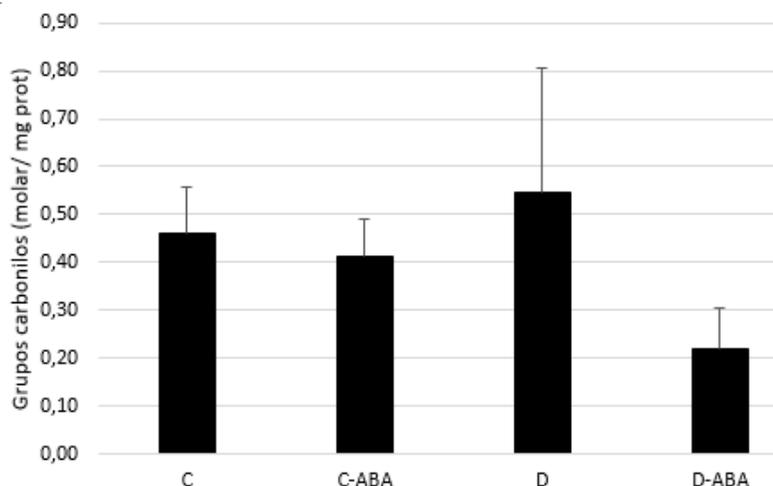


Figura 6. Efectos de la administración de ABA sobre los grupos carbonilos. Las barras representan la media \pm SEM., controles, controles-ABA, diabéticos y diabéticos-ABA

Discusión

El presente estudio se desarrolló para valorar los efectos de la diabetes tipo I, inducida mediante inyección de aloxana, sobre el estado oxidativo de la corteza prefrontal de ratón. Este modelo de diabetes experimental se caracteriza por la destrucción de las células β en los islotes de Langerhans del páncreas. La hiperglucemia resultante es la causante del síndrome que caracteriza a esta enfermedad y que incluye poliuria, polidipsia, pérdida de peso. Los resultados obtenidos en el presente estudio, tres semanas después de la inducción de la diabetes, encajan con este cuadro y son similares a los obtenidos por nuestro grupo de investigación en estudios previos (Muriach et al., 2006; Miranda et al., 2007). La administración de ABA no afectó al peso ni a la glucemia basal de los animales tal y como se observa en la Figura 1a y 1b. Se ha demostrado anteriormente que el ABA participa en el manejo de la homeostasis de la glucemia, modulando la secreción de insulina en pacientes con resistencia a la insulina y diabéticos tipo II (Derosa et al., 2020). Sin embargo, dado que la administración de aloxana es un modelo de diabetes tipo I, en el que se destruyen las células β del páncreas, es esperable que en este trabajo el ABA no afecte a la hiperglucemia observada en los ratones diabéticos.

Valoración del estado oxidativo de la corteza prefrontal de ratones diabéticos

En lo que se refiere al estado oxidativo de la corteza prefrontal, son pocos los estudios sobre los efectos de la diabetes tipo I sobre este área del cerebro, habiéndose estudiado más en profundidad otras estructuras, como el hipocampo (Muriach et al., 2006; Ceretta et al., 2012; Bampi et al., 2020). Así, se ha demostrado la existencia de estrés oxidativo y un sistema de defensa oxidante deteriorado en el hipocampo de sujetos diabéticos, lo que probablemente promueve las complicaciones asociadas con la diabetes en el SNC (Zhang et al., 2017). En relación a la corteza prefrontal, Ceretta y colaboradores demostraron la existencia de daño oxidativo tras 15 días de evolución de la diabetes inducida por aloxana en rata, pero no un desequilibrio en las enzimas antioxidantes (Ceretta et al., 2012). Sin embargo, en este estudio se valoraron otras enzimas antioxidantes, como, la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT) (Ceretta et al., 2012). Nuestro estudio muestra que la actividad GPx sí aumenta en los grupos de ratones diabéticos en comparación con los controles (figura 4a) tras 21 días de evolución de la diabetes. Estos resultados confirman resultados obtenidos por Akinola y colaboradores (Akinola et al., 2011) y encajarían con un mecanismo compensatorio transitorio en el que se produce un

aumento de las defensas antioxidantes para contrarrestar un aumento de las especies reactivas de oxígeno (Baliño et al., 2019, 2021). Posiblemente, de haber alargado el estudio este mecanismo compensatorio hubiera derivado en un agotamiento de la actividad de dicha enzima, tal y como nuestro grupo ha demostrado previamente en hipocampo (Muriach et al., 2006). Curiosamente, la actividad GR sí disminuye significativamente en la corteza de los animales diabéticos y diabéticos suplementados con ABA en comparación con los controles y controles-ABA (figura 4b). Este resultado justificaría el aumento de GSSG y de la relación GSSG/GSH observados en el grupo de ratones diabéticos (figuras 1,5b y 5c). Por contra, no observamos diferencias significativas entre grupos en lo que se refiere a la concentración de GSH en corteza prefrontal (figura 5a). Este resultado encajaría con el estudio de Cardoso y colaboradores en el que a nivel hipocampal no observaron una reducción estadísticamente significativa de GSH en las primeras 4 semanas de experimentación, pero sí a las 12 semanas (Cardoso et al., 2013).

Por otro lado, se estudiaron el ácido glutámico y la cisteína, como aminoácidos precursores del GSH. La cisteína además, es un antioxidante ampliamente utilizado como biomarcador de estrés oxidativo (Morris et al., 2014), por lo que la disminución de la misma en el grupo de ratones diabéticos en relación a los controles demuestra una alteración en el estado oxidativo (figura 5d). En relación al glutamato, la regulación de los niveles de este neurotransmisor es fundamental para el funcionamiento del cerebro, ya que la concentración extracelular anormal de glutamato puede provocar alteraciones de la neurotransmisión, neurodegeneración e incluso muerte neuronal (Mangia et al., 2012). Por lo tanto, el incremento observado en los ratones diabéticos (figura 5e), además de alterar el sistema glutamato, podría inducir daño neuronal por otras vías. Sin embargo, para comprobar el alcance del posible daño inducido por el incremento de la concentración de glutamato en ratones diabéticos es necesario finalizar los estudios de muerte neuronal e inflamación que se están llevando a cabo actualmente.

Finalmente, para valorar la existencia de estrés oxidativo se determinó el contenido de grupos carbonilo, como marcador de daño oxidativo a proteínas, sin que se apreciaran diferencias significativas entre los distintos grupos de estudio (Figura 6). En el estudio realizado por Ceretta y colaboradores se describe que existe un aumento de grupos carbonilo en hipocampo y amígdala, pero no en corteza. Este resultado, acorde con nuestro estudio,

sugiere que la corteza prefrontal pueda ser menos sensible al daño oxidativo que otras áreas del cerebro (Ceretta et al., 2012). Por otro lado, dado que los lípidos son más sensibles al daño oxidativo que las proteínas, es posible que, si se hubieran estudiado también marcadores de peroxidación lipídica, sí se hubiera podido observar daño oxidativo y confirmarse una situación de estrés oxidativo en la corteza prefrontal, tal y como anteriormente hemos demostrado en hipocampo (Muriach et al., 2006).

Efecto de la administración del ABA sobre el estado oxidativo de la corteza prefrontal de ratones diabéticos

Ha sido demostrado que el ácido abscísico está involucrado en la regulación de los procesos fisiológicos de muchas plantas, entre ellos la resistencia al estrés (Le Page-Degivry -Th. et al., 1986). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran una disminución de la concentración de ABA en la corteza prefrontal de ratones diabéticos, posiblemente debido al insulto oxidativo asociado a la diabetes. Es interesante, sin embargo, que la administración de ABA durante 21 días no incrementa su concentración de forma significativa en la corteza prefrontal de los grupos suplementados, ni en animales controles, ni en los diabéticos (Figura 3).

Por otro lado, en relación a su posible efecto sobre el estado oxidativo de la corteza prefrontal de ratones diabéticos, se observa que no afectó a las actividades enzimáticas (GPx y GR) (Figura 4), pero sí redujo significativamente la concentración de GSSG (Figuras 1 y 5b). Por lo tanto, el ABA parece ejercer un efecto regulador sobre otros componentes de la defensa antioxidante que son capaces de modular la concentración GSSG, como por ejemplo podrían ser las peroxirredoxinas (Prx) (Sue et al., 2005). De hecho, estas enzimas contienen un residuo de cisteína, que también se ve incrementada por la administración de ABA en ratones diabéticos (Figura 5d). Además, las enzimas Prx I y II que se encuentran en abundancia en el citosol, al igual que las enzimas GPx y GR, (Sue et al., 2005)

Cabe destacar también, que el ABA redujo la concentración de glutamato y recuperó los niveles de cisteína en los ratones diabéticos. Estudios previos muestran que la administración de ABA intracerebroventricular en ratas indujo un mayor consumo de alimento junto con una reducción de estrés oxidativo en el tronco encefálico (Soti et al., 2019). Nuestro estudio confirmaría que la administración de ABA es capaz de modular el estado oxidativo del cerebro y más concretamente en un estado patológico, como la diabetes tipo 1. Futuros estudios permitirán elucidar el papel de esta fitohormona antioxidante

capaz de modular la homeostasis de la glucosa, como posible terapia adyuvante en el tratamiento de la diabetes.

Conclusión

Existe una afectación del estado oxidativo de la corteza prefrontal de ratones tras 21 días de evolución de la diabetes tipo 1. La administración de ABA es capaz de modular dicho estado oxidativo reduciendo la concentración de GSSG, la ratio GSSG/GSH y la concentración de ácido glutámico, así como incrementando la concentración de cisteína. Sin embargo, no se ha podido demostrar la existencia de daño oxidativo a proteínas en la corteza prefrontal de ratones diabéticos, por lo que no se establece una situación de estrés oxidativo en esta área del cerebro de ratones tras 3 semanas de inducción de la diabetes.

Limitaciones

A lo largo del presente estudio nos hemos encontrado con una serie de dificultades que no han permitido finalizar todas las determinaciones previstas en el planteamiento inicial del trabajo.

Así, estaba previsto estudiar el daño oxidativo a lípidos, mediante la determinación de la concentración de malondialdehído (MDA). Sin embargo, dicho método requiere del uso de HPLC, y el equipo del que se dispone ha estado fuera de servicio durante estos meses, por lo que no se ha podido estudiar este marcador de peroxidación lipídica. Dado que los lípidos son más sensibles al daño oxidativo que las proteínas, es posible que de haber podido realizar esta determinación, se hubieran encontrado alteraciones que permitieran establecer la existencia de estrés oxidativo en la corteza prefrontal de ratones diabéticos.

Por otro lado, entre los objetivos del presente estudio se encontraba el estudio de marcadores de inflamación (Iba 1, marcador de microglía reactiva) y muerte celular (Caspasa 3) mediante la técnica de Western-Bot. Estos estudios se encuentran en proceso en la actualidad, pero no ha dado tiempo a finalizarlos a tiempo para incluirlos en el trabajo.

Anexos

Anexo 1, resolución del comité de experimentación animal.

Referencias

Akinola, O. B., Omotoso, O. G., Dosumu, O. O., Akinola, O. S., & Olotufore, F. (2011). Diabetes-Induced Prefrontal Nissl SAKinola, O. B., Omotoso, O. G., Dosumu, O. O., Akinola, O. S., & Olotufore, F. (2011). Diabetes-Induced

- Prefrontal Nissl Substance Deficit and the Effects of Neem-Bitter Leaf Extract Treatment. *International Journal of Morphology*, 29(3), 850–856. <https://doi.org/10.4067/s0717-95022011000300031>
- Baliño, P., Romero-Cano, R., & Muriach, M. (2021). Biochemical and behavioral consequences of ethanol intake in a mouse model of metabolic syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms22020807>
- Baliño, P., Romero-Cano, R., Sánchez-Andrés, J. V., Valls, V., Aragón, C. G., & Muriach, M. (2019). Effects of Acute Ethanol Administration on Brain Oxidative Status: The Role of Acetaldehyde. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 43(8), 1672–1681. <https://doi.org/10.1111/acer.14133>
- Bampi, S. R., Casaril, A. M., Domingues, M., de Andrade Lourenço, D., Pesarico, A. P., Vieira, B., Beghini, K. R., Seixas, F. K., Collares, T. V., Lenardão, E. J., & Savegnago, L. (2020). Depression-like behavior, hyperglycemia, oxidative stress, and neuroinflammation presented in diabetic mice are reversed by the administration of 1-methyl-3-(phenylselanyl)-1H-indole. *Journal of Psychiatric Research*, 120(September 2019), 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2019.10.003>
- Bhusal, A., Rahman, M. H., Lee, I. K., & Suk, K. (2019). Role of hippocampal lipocalin-2 in experimental diabetic encephalopathy. *Frontiers in Endocrinology*, 10(JAN), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00025>
- Cárdenas, A. M., Tataje, L. A., Florentini, E. A., Peña, C. G., & Carranza A., E. (2012). Oxidación de proteínas y lípidos en cerebro de cobayos durante la exposición a grandes alturas (4540 m). *Ciencia e Investigación*, 15(1), 36–41. <https://doi.org/10.15381/ci.v15i1.3188>
- Cardoso, S., Santos, R. X., Correia, S. C., Carvalho, C., Santos, M. S., Baldeiras, I., Oliveira, C. R., & Moreira, P. I. (2013). Insulin-induced recurrent hypoglycemia exacerbates diabetic brain mitochondrial dysfunction and oxidative imbalance. *Neurobiology of Disease*, 49, 1–12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.08.008>
- Ceretta, L. B., Réus, G. Z., Abelaira, H. M., Ribeiro, K. F., Zappellini, G., Felisbino, F. F., Steckert, A. V., Dal-Pizzol, F., & Quevedo, J. (2012). Increased oxidative stress and imbalance in antioxidant enzymes in the brains of alloxan-induced diabetic rats. *Experimental Diabetes Research*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/302682>
- Derosa, G., Maffioli, P., D'angelo, A., Preti, P. S., Tenore, G., & Novellino, E. (2020). Abscisic acid treatment in patients with prediabetes. *Nutrients*, 12(10), 1–11. <https://doi.org/10.3390/nu12102931>
- DiMeglio, L. A., Evans-Molina, C., & Oram, R. A. (2018). Type 1 diabetes. *The Lancet*, 391(10138), 2449–2462. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31320-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31320-5)
- Emami Bistgani, Z., Siadat, S. A., Bakhshandeh, A., Ghasemi Pirbalouti, A., & Hashemi, M. (2017). Interactive effects of drought stress and chitosan application on physiological characteristics and essential oil yield of *Thymus daenensis* Celak. *Crop Journal*, 5(5), 407–415. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.04.003>
- Lawrence, R. A., Parkhill, L. K., & Burk, R. F. (1978). Hepatic cytosolic non selenium-dependent glutathione peroxidase activity: Its nature and the effect of selenium deficiency. *Journal of Nutrition*, 108(6), 981–987. <https://doi.org/10.1093/jn/108.6.981>
- Le Page-Degivry -Th., M., Bidard, J. N., & Rouvier, E. (1986). Presence of abscisic acid, a phytohormone, in the mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(4), 1155–1158. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.4.1155>
- Liu, Y., Li, M., Zhang, Z., Ye, Y., & Zhou, J. (2018). Role of microglia-neuron interactions in diabetic encephalopathy. *Ageing Research Reviews*, 42(November 2017), 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.12.005>
- Magnone, M., Emionite, L., Guida, L., Vigliarolo, T., Sturla, L., Spinelli, S., Buschiazzi, A., Marini, C., Sambucetti, G., De Flora, A., Orenzo, A. M., Cossu, V., Ferrando, S., Barbieri, O., & Zocchi, E. (2020). Insulin-independent stimulation of skeletal muscle glucose uptake by low-dose abscisic acid via AMPK activation. *Scientific Reports*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58206-0>
- Mangia, S., Giove, F., & DiNuzzo, M. (2012). Metabolic Pathways and Activity-Dependent Modulation of Glutamate Concentration in the Human Brain. *Neurochemical Research*, 37(11), 2554–2561. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0848-4>
- Meister, A., & Anderson, M. E. (1983). GLUTATHIONE. *Annual Review of Biochemistry*, 52(1), 711–760. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.52.070183.003431>

- Miladinova V. (2017). *Complicaciones Crónicas De La Diabetes Mellitus Tipo 2*. 1–20.
<http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/VIKTORIYA MILADINOVA TODOROVA.pdf>
- Miranda, M., Muriach, M., Almansa, I., Arnal, E., Messeguer, Á., Díaz-Llopis, M., Romero, F. J., & Bosch-Morell, F. (2007). CR-6 protects glutathione peroxidase activity in experimental diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*, *43*(11), 1494–1498.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.08.001>
- Morris, G., Anderson, G., Dean, O., Berk, M., Galecki, P., Martin-Subero, M., & Maes, M. (2014). The Glutathione System: A New Drug Target in Neuroimmune Disorders. *Molecular Neurobiology*, *50*(3), 1059–1084.
<https://doi.org/10.1007/s12035-014-8705-x>
- Muriach, M., Bosch-Morell, F., Alexander, G., Blomhoff, R., Barcia, J., Arnal, E., Almansa, I., Romero, F. J., & Miranda, M. (2006). Lutein effect on retina and hippocampus of diabetic mice. *Free Radical Biology & Medicine*, *41*(6), 979–984.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.06.023>
- Reed, D. J., Babson, J. R., Beatty, P. W., Brodie, A. E., Ellis, W. W., & Potter, D. W. (1980). High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. *Analytical Biochemistry*, *106*(1), 55–62.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90118-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90118-9)
- Šimura, J., Antoniadi, I., Široká, J., Tarkowská, D., Strnad, M., Ljung, K., & Novák, O. (2018). Plant hormonomics: Multiple phytohormone profiling by targeted metabolomics. *Plant Physiology*, *177*(2), 476–489.
<https://doi.org/10.1104/pp.18.00293>
- Smith, I. K., Vierheller, T. L., & Thorne, C. A. (1988). Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Analytical Biochemistry*, *175*(2), 408–413.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90564-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90564-7)
- Soti, M., Abbasnejad, M., Kooshki, R., & Esmaeili-Mahani, S. (2019). Central microinjection of phytohormone abscisic acid changes feeding behavior, decreases body weight, and reduces brain oxidative stress in rats. *Nutritional Neuroscience*, *22*(10), 678–687.
<https://doi.org/10.1080/1028415X.2018.1431093>
- Sue, G. R., Ho, Z. C., & Kim, K. (2005). Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, *38*(12), 1543–1552.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.02.026>
- Vessby, J., Basu, S., Mohsen, R., Berne, C., & Vessby, B. (2002). Oxidative stress and antioxidant status in type 1 diabetes mellitus. *Journal of Internal Medicine*, *251*(1), 69–76.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2002.00927.x>
- Wang, C., Li, J., Zhao, S., & Huang, L. (2020). Diabetic encephalopathy causes the imbalance of neural activities between hippocampal glutamatergic neurons and GABAergic neurons in mice. *Brain Research*, *1742*(January), 146863.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.146863>
- West, I. C. (2000). Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabetic Medicine*, *17*(3), 171–180.
<https://doi.org/10.1046/j.1464-5491.2000.00259.x>
- Zhang, S., Li, H., Zhang, L., Li, J., Wang, R., & Wang, M. (2017). Effects of troxerutin on cognitive deficits and glutamate cysteine ligase subunits in the hippocampus of streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus rats. *Brain Research*, *1657*, 355–360.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.12.009>

Anexo 1 resolución del comité de experimentación animal



Dirección General de Agricultura, Ganadería y Pesca
Ciudad Administrativa 9 de Octubre
Calle de La Democracia, 77 · 46018 Valencia
www.gva.es



UNIÓN EUROPEA

AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2020/VSC/PEA/0039

Vista la solicitud realizada en fecha **10/02/20** con nº reg. entrada **184727** por D/D^a. **Jesús Lancis Sáez, Vicerector d' Investigació i Transferència**, centro usuario **ES120400001002**, para realizar el procedimiento:

"Papel del Acido abcisico, un agente antiinflamatorio en la retinopatía diabética"

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Producción y Sanidad Animal.

AUTORIZO:

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: **2020/VSC/PEA/0039** tipo **2**, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: **Universitat Jaume I Castellon**

Responsable del proyecto: **María Muriach Saurí**

Establecimiento: **Servicio de Experimentación Animal**

Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, fecha de la firma electrónica
El director general de Agricultura, Ganadería y Pesca

Firmat per Rogelio Llanes Ribas el
03/03/2020 10:32:10
Càrrec: **Dirección General**