



EFFECTS OF POST-TRAUMATIC STRESS DISORDER ON THE BDNF SERIC LEVELS IN THE ANIMAL MODEL

EFECTOS DEL TRASTORNO DE ESTRÉS POSTRAUMÁTICO SOBRE LOS NIVELES SÉRICOS DEL BDNF EN UN MODELO ANIMAL

Iván Noé Martínez-Salazar,^{1*}

Adriana Martínez-Cuazitl,²

David Alberto Comoto-Santacruz,³

Alejandro Camacho Ibarra,⁴

Militar de Graduados de Sanidad- SEDENA

⁴Teniente Coronel Médico Veterinario Zootecnista. Jefe del Bioterio de la Escuela Militar de Medicina-SEDENA.

¹Teniente Coronel Médico Cirujano. Jefe del Departamento de Investigación del Hospital Central Militar – SEDENA.

²Dra. en C. Médico Cirujano y Partero. Departamento de Investigación del Hospital Central Militar – SEDENA, Laboratorio de Biología Celular y Tisular de la Escuela Militar de Medicina-SEDENA.

³Mayor Médico Cirujano. Jefe del Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela

Correspondencia: Iván Noé Martínez-Salazar, Departamento de Investigación-Hospital Central Militar. Periférico Boulevard Manuel Ávila Camacho S/N (Av. Industrial Militar) 11200, Miguel Hidalgo, Ciudad de México. Correo electrónico: drivanmartinez@icloud.com

ABSTRACT

Post-traumatic stress disorder may develop after a stressful event, this affects military and/or civil population. The biomolecular markers could be useful for diagnosis and design new drugs, as BDNF that is associated to other psychiatric pathologies. The main objective of this work was determinate the serum levels of BDNF in an animal posttraumatic stress model.

The forced swim model was done in 30 male Wistar rats of 300g, this model consisted of timing the behavior of afloat, despair and depression for 15 min at 15°C, this test was done two times with a week difference (acute stress and chronic stress respectively). After the forced swim test blood samples were obtained (in both cases), also before the test (basal). In this model, the predominated behavior was despair, augmenting in the chronic stress. The serum levels of BDNF significantly decrease after the chronic stress.

Our results suggest that the BDNF determination could be useful for diagnosis, monitoring and probable development new drugs, however, the effect of drugs on BDNF levels should be studied in animal models.

Keywords: Post-traumatic stress disorder, animal model, BDNF

RESUMEN

El trastorno de estrés postraumático se desarrolla tras un evento estresante, que afecta a la población militar y/o civil. Los marcadores biomoleculares pueden ser útiles para el diagnóstico y diseño de nuevos fármacos, como el BDNF asociado a otras patologías psiquiátricas. El objetivo del trabajo fue determinar los niveles séricos del BDNF en un modelo animal de trastorno de estrés postraumático.

Se desarrolló el modelo de nado forzado en 30 ratas Wistar macho de 300g, el modelo consistió en cronometrar el comportamiento de flote, desesperación, y depresión durante 15 min a 15°C, esta prueba se realizó en dos ocasiones con una diferencia de una semana entre cada prueba (estrés agudo y estrés crónico respectivamente). Posterior a la prueba de nado forzado se tomaron muestras de sangre (en ambas ocasiones), así como previo a esta prueba (basales).

En este modelo, el comportamiento de desesperación predominó, aumentando en el estrés crónico. Los niveles séricos de BDNF disminuyeron significativamente posterior al estrés crónico.

Nuestros resultados sugieren que la determinación del BDNF puede ser útil en el diagnóstico, seguimiento y probable desarrollo de nuevos fármacos, sin embargo, debe estudiarse en modelos animales el efecto de los fármacos sobre los niveles del BDNF.

Palabras clave: Trastorno de estrés postraumático, modelo animal y BDNF

INTRODUCCIÓN

El trastorno de estrés postraumático (TEPT) en la actualidad es considerado una condición psiquiátrica resultante de la exposición a un evento traumático.(1,2) Desde el 2013, la Asociación Americana de Psiquiatría estableció los siguientes criterios diagnósticos:(3)

- a. Exposición directa o indirecta al evento traumático, con énfasis en la magnitud extraordinaria del evento.
- b. Síntomas de intrusión.
- c. Conductas de evitación.
- d. Alteraciones negativas cognitivas y del estado de ánimo.
- e. Alteración importante del estado de alerta y reactividad.
- f. Duración de los síntomas mayor a un mes.
- g. La alteración causa malestar clínicamente significativo o deterioro en lo social, laboral u otras áreas del funcionamiento.
- h. Los síntomas no se pueden atribuir a los efectos fisiológicos de una sustancia o a otra afección médica.

El desarrollo de TEPT está relacionado al combate por lo que esta patología es considerada de relevancia militar, aunque también puede presentarse en la población civil, principalmente en comunidades con riesgo a accidentes automovilísticos y de trabajo, ataques terroristas, ataques sexuales o físicos o violencia doméstica. (4) Globalmente, la prevalencia del TEPT es de 4 al 6 %, se estima que la prevalencia aumente hasta un 15%.(4,5) Además, quienes desarrollan TEPT tienen mayor riesgo de presentar depresión, adicción a sustancias, problemas de salud física, desempleo e inestabilidad en el matrimonio.(6)

Aunque muchos individuos con TEPT se recuperan durante los primeros 2 años, entre el 30 y 40 % presentan síntomas crónicos. Además, los individuos con TEPT crónico muestran respuestas condicionadas de miedo a estímulos traumáticos hasta 40 a 50 años después del trauma. La alta prevalencia, cronicidad y resistencia al tratamiento resalta la importancia de estudiar y desarrollar nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas para el TEPT.(7)

Recientemente, la neurociencia y la investigación de bases clínicas-moleculares han podido identificar fenotipos operacionalizados del TEPT mediante marcadores biológicos y no por síntomas, como cambios en circuitos y marcadores periféricos; así como comportamientos no verbales dimensionales como el sueño y la respuesta fisiológica al miedo.(4)

Los modelos animales han sido de gran utilidad para el estudio de TEPT incluyendo el de shock sin escape, estrés único prolongado y variable estresante impredecible como es el nado forzado, sin embargo, el fenotipo de TEPT en roedores se considera fenotipo relacionado a TEPT y se reporta como presente o ausente.(4)

El modelo de nado forzado esta validado como modelo de TEPT ya que se observa un comportamiento de inmovilidad-desesperanza; se ha demostrado que los animales presentan sensibilización a noradrenalina en el locus coeruleus, aumento en receptores de mineralocorticoides en el hipocampo y conducta de nado/es-

cape asociado a respuesta al mayor estrés y ansiedad; además, de cambios neuroendocrinos que corresponden con el TEPT, aunque no se han observado síntomas hiperactivación y alerta.(1)

Debido a los avances en la investigación neuro-molecular y que en los modelos solo se evalúa fenotipo similar a TEPT, estudios recientes se han enfatizado en las mediciones corporales y mediciones de biomarcadores en dichos modelos.(4)

Las neurotrofinas son péptidos o proteínas que regulan la viabilidad, desarrollo y función neuronal.(8) Dentro de las neurotrofinas se incluyen al factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado de cerebro (del inglés Brain Derived Neurotrophic Factor BDNF), la neurotrofina-3 (NT-3) y la neurotrofina 4 y 5 (NT-4, -5).(9)

El BDNF se encuentra en todo el cerebro adulto, en especial en el área cortical, algunas áreas subcorticales y regiones de la médula espinal, además esta reportado que esta neurotrofina se encuentra en tejidos como hígado, páncreas, tejido adiposo corazón, el sistema endocrino y musculo esquelético por lo que se puede detectar en suero y en estos tejidos, con la capacidad de traspasar la barrera hematoencefálica.(10,11)

El BDNF es esencial en el mantenimiento de procesos fisiológicos del cerebro adulto, tiene un papel en la modulación de la ramificación dendrítica y su morfología, así como la plasticidad sináptica y la potenciación de largo tiempo, participado en el proceso de aprendizaje y memoria y regulando funciones metabólicas principalmente en el hipotálamo.(10-13)

Debido a las funciones y distribución del BDNF, las alteraciones en la concentración del BDNF están asociados a la patogénesis de enfermedades neurológicas, neurodegenerativas, psiquiátricas, cardiometabólicas, oculares, de la piel y del sistema urinario. Particularmente la disminución del BDNF está relacionado con el desarrollo de desórdenes psiquiátricos como demencia, depresión, ansiedad, esquizofrenia y desorden bipolar.(9)

El principal objetivo de este trabajo fue determinar los niveles del BDNF en un modelo de TEPT en ratas, ya que esta patología tiene relevancia en las fuerzas armadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 30 ratas macho Wistar de 300 g, las cuales se mantuvieron en cajas individuales con temperatura controlada y con ciclos de luz/oscuridad 12/12, con dieta estándar y agua a libre demanda. Todos los experimentos fueron examinados y aprobados por el Comité de Ética e Investigación del Centro Militar de Ciencias de la Salud y del Comité de Ética de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad. El cuidado, mantenimiento y la realización de los experimentos fueron realizados bajo los estándares éticos establecidos en la Declaración de Heilsinki de 1964 y siguiendo las directrices de las Normas Oficiales Mexicanas "Guía para el uso y cuidado de los animales de laboratorio" (NOM-062-ZOO-1999) y

la "Guía para la eliminación de residuos biológicos" (NOM-087-ECOL-1995).(14,15)

Modelo de nado Forzado:

Para provocar los signos de estrés postraumático en las ratas se utilizó el modelo de nado forzado. Esta prueba se dividió en tres fases: la primera fase fue de preparación de las tinas, se llenaron las tinas de nado (60 cm de longitud x 60 cm de ancho x 100 cm de altura de plástico) al 60 % con agua a 15 °C, lo que evitó que las ratas tocaran el fondo o se salieran de la tina; una rata que no pertenece a los sujetos de evaluación fue expuesta al nado forzado durante 15 min; en la segunda fase (estrés agudo), en la misma tina que nadó la primera rata nadaron cada una de las ratas de experimentación durante 15 min y se cronometrarón tres tipos de conducta: flote/sacudida de cabeza, nado/escape e inmovilidad/hundimiento; y la tercera fase (estrés crónico) se repitió la prueba de nado forzado una semana posterior a la fase dos y se cronometrarón los tres tipos de conducta mencionadas previamente en todos los animales de experimentación similar al descrito por Rodríguez-Landa y M-Contreras (2000).(16)

Toma de muestras sanguíneas:

Se tomaron 500 µl de sangre mediante punción intracardiaca bajo anestesia con isoflurano a dosis respuesta, previo a los experimentos de nado forzado (muestra basal) e inmediatamente después de la prueba de nado forzado en ambas ocasiones (estrés agudo y estrés crónico).

La muestra sanguínea se centrifugó a 3500 rpm a 4 °C durante 20 min, se conservó el sobrenadante correspondiente al suero, el cual fue almacenado a -80 °C hasta su posterior análisis.

Cuantificación de BNDF en suero:

Para analizar los niveles séricos de BNDF se determinaron las concentraciones de BNDF en las muestras de suero almacenadas a -80 °C en el equipo HIDEX Sense 425-301, EU. La medición se realizó en estado basal al finalizar la fase dos y tres de la prueba de nado forzado en las 30 ratas, utilizando el kit de ELISA Rat BNDF PicoKine EK308 siguiendo las instrucciones del fabricante (Boster Biological Technology, CA. USA). Todas las muestras se analizaron por duplicado.

Análisis estadístico:

Para analizar los cambios en los niveles séricos de BNDF se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis y una comparación post hoc usando la prueba de Dunns, ya que los datos fueron no paramétricos, utilizando el software GraphPad 7.0.

RESULTADOS

La conducta observada en los animales sometidos al modelo de nado forzado fue de 3 tipos: flote/movimiento de cabeza, nado/escape e inmovilidad/hundimiento.

En la fase de estrés agudo la conducta de flote fue durante 2 minutos, la de nado 10 minutos y la de inmovilidad 3 minutos; mientras que en la fase de estrés crónico el comportamiento de flote solo fue de 1 minuto, el de nado 12 minutos y el de inmovilidad 2 minutos. Predominó la conducta de nado/escape en ambos tiempos evaluados.

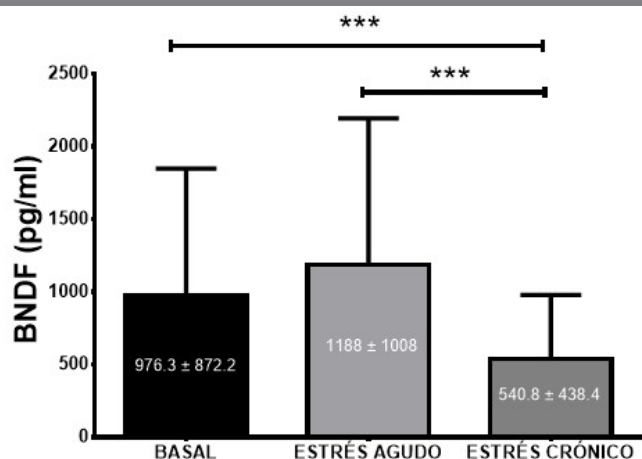
En la fase de estrés crónico, que se evaluó con una diferencia de 1 semana, disminuyó 1 min la conducta de flote/movimiento de la cabeza y la conducta de inmovilidad/hundimiento, aumentando 2 minutos la conducta de nado/escape y por lo tanto se presentó esta conducta en menor tiempo que en la fase de estrés agudo. Aunque no se observaron cambios significativos en los tiempos de cada conducta, el comportamiento sugiere mayor ansiedad en algunos individuos, sin embargo, otros animales presentaron datos de conductas adaptativas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Conducta del modelo de nado forzado de TEPT.

FASE	FLOTE/MOVIMIENTO DE CABEZA	NADO/ESCAPE	INMOVILIDAD/HUNDIMIENTO
Estrés agudo	2 min	10 min	3 min
Estrés crónico	1 min	12 min	2 min

Respecto a los niveles séricos de BNDF los niveles basales (estado basal) fueron 976.3 ± 872.2 pg/ml, aumentando hasta 1188 ± 1008 pg/ml en la fase de estrés agudo y disminuyendo hasta 540.8 ± 438.4 pg/ml en la fase de estrés crónico. Se encontró una diferencia significativa entre los niveles basales y los niveles encontrados en la fase de estrés crónico, así como entre los niveles del estrés agudo y el estrés crónico con una $p < 0.0001$ (Figura 1).

Figura 1. Niveles séricos de BDNF en el modelo de TEPT. Estrés agudo corresponde a la primera prueba de nado forzado y estrés crónico corresponde a la segunda fase del desarrollo del TEPT * $p < 0.0001$.**



DISCUSIÓN

El trastorno de estrés postraumático se puede desarrollar posterior a la exposición a un suceso traumático, un evento suficientemente estresante como el combate o por una catástrofe.(17) Solo entre el 10 y 20 % de los sujetos expuestos desarrollan TEPT, debido a que la susceptibilidad depende de la carga genética y la historia de exposiciones traumáticas.(17)

En la actualidad el diagnóstico del TEPT se realiza de acuerdo a los criterios del DSM-5 y su tratamiento se basa en la psicoterapia e inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina, a pesar de presentar del 30 a 40 % de resistencia.(3,17) Por lo tanto, conocer el comportamiento neurobiológico mediante su estudio en modelos animales y tener un biomarcador será de gran utilidad para diagnosticar de forma oportuna y eficaz, dar seguimiento y diseñar nuevos fármacos para el tratamiento de esta patología.

El modelo animal de nado forzado fue desarrollado en la cepa Wistar, ya que está descrito que esta es la segunda sepa más utilizada en modelos de estrés postraumático y debido a que los niveles de estrógenos que presentan las hembras podrían alterar la conducta, en este estudio solo se utilizaron ratas macho.(17,18)

El modelo de nado forzado fue desarrollado en 1978 por Porsolt; aunque ha sido utilizado con mayor frecuencia como modelo de depresión, también presenta una conducta de desesperación/ansiedad por lo que ha sido utilizado como modelo de TEPT.(1,4,18) El estrés agudo fue evaluado con la primera prueba de nado forzado (primeros 15 min de la fase dos del experimento), mientras que el estrés crónico se presentó al reevaluar una semana posterior a la primera fase de nado forzado, considerando que 1 semana de

la vida de una rata corresponde a un mes de vida de los humanos,(19) y dado que dentro de los criterios del DSM-5 los síntomas de TEPT deben permanecer al menos un mes después del evento traumático, nuestro modelo cumpliría con este criterio como esta reportado según Li et al. 2010, quienes mencionan que siete días es suficiente para desarrollar y evaluar el TEPT en ratas, observando cambios en las vías de apoptosis a nivel del hipocampo.(3,20)

La temperatura de 15 °C fue utilizada como un factor estresante agregado ya que está reportado que la temperatura del agua influye en el comportamiento presentado durante la prueba; se ha observado que el modelo de nado forzado para evaluar depresión y medicamentos antidepresivos debe estar entre 23-25 °C, la disminución de la temperatura disminuye el comportamiento de inmovilidad.(18) Así como lo reportaron Rodríguez-Landa y M-Contreras en el 2000, quienes describieron que a temperaturas menores de 20°C y más de 29°C el tiempo de nado es mayor que en las temperaturas intermedias, refieren que la mayor actividad está relacionada con el incremento al estrés, estos datos concuerdan con nuestros resultados, ya que nosotros observamos que a 15°C las ratas pasan la mayor parte del tiempo de la prueba nadando, y en la fase de estrés crónico 2 min la fase de nado/escape, sugiriendo que las ratas presentaban mayor estrés que en el estrés agudo.(16)

De forma interesante el tiempo de inmovilidad/hundimiento relacionada como depresión disminuye en el estrés crónico, aunque no existió diferencia significativa, nuestro modelo se comportó como lo reportado previamente mostrando predominio de la fase de desesperación/ansiedad.(21)

Como se ha reportado, los modelos de TEPT en animales solo cumplen con algunos de los signos similares a los que se presentan en los humanos, por lo que, en patologías como esta, tener un biomarcador es de gran utilidad para realizar un diagnóstico preciso; el BDNF es una neurotrofina que disminuye en casos de trastornos psiquiátricos y aumenta con el ejercicio siendo este un factor protector.(9) De manera relevante observamos que el BDNF disminuyó significativamente en el estrés crónico en comparación con los niveles basales y respecto a los niveles observados en el estrés agudo, y aumentó ligeramente en el estrés agudo. Se ha descrito una disminución del BDNF en pacientes con depresión, relacionado con la disminución de la función neurocognitiva,(22) aunque en este estudio no se realizaron pruebas de memoria, sugiere que el TEPT al disminuir los niveles de BDNF afectaría la plasticidad neuronal siendo este un biomarcador prometedor que permita el diagnóstico, seguimiento y desarrollo de nuevos tratamientos del TEPT.(10)

Agradecimientos

Agradecemos el financiamiento por SEDENA mediante el programa A022. Agradecimientos al personal del Bioterio de la Escuela Militar de Medicina.

REFERENCIAS

1. Liberzon I, Khan S, Young EA. Chapter 3.1 - Animal models of posttraumatic stress disorder. In: Steckler T, Kalin NH, Reul JM, editors. *Techniques in the Behavioral and Neural Sciences*. Elsevier; 2005. p. 231–50. (Handbook of Stress and the Brain; vol. 15). [accessed 23 Dec 2020] Available from: [https://doi.org/10.1016/S0921-0709\(05\)80057-4](https://doi.org/10.1016/S0921-0709(05)80057-4)
2. Whitaker AM, Gilpin NW, Edwards S. Animal Models of Post-Traumatic Stress Disorder and Recent Neurobiological Insights. *Behav Pharmacol*. 2014 Sep;25(0):398–409. doi: <https://dx.doi.org/10.1097%2FFBP.0000000000000069>
3. McNamara CA, Sarembok IJ, Gimple LW, Fenton JW, Coughlin SR, Owens GK. Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor. *J Clin Invest*. 1993 Jan;91(1):94–8. doi: <https://doi.org/10.1172/jci116206>
4. Deslauriers J, Toth M, Der-Avakian A, Risbrough VB. Current Status of Animal Models of Posttraumatic Stress Disorder: Behavioral and Biological Phenotypes, and Future Challenges in Improving Translation. *Biol Psychiatry*. 2018 May 15;83(10):895–907. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.11.019>
5. Richter-Levin G, Stork O, Schmidt MV. Animal models of PTSD: a challenge to be met. *Mol Psychiatry*. 2019 Aug;24(8):1135–56. doi: <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0272-5>
6. Bountress KE, Bacanu S-A, Tomko RL, Korte KJ, Hicks T, Sheerin C, et al. The Effects of a BDNF Val66Met Polymorphism on Posttraumatic Stress Disorder: A Meta-Analysis. *Neuropsychobiology*. 2017;76(3):136–42. doi: <https://doi.org/10.1159/000489407>
7. Yamamoto S, Morinobu S, Takei S, Fuchikami M, Matsuki A, Yamawaki S, et al. Single prolonged stress: toward an animal model of posttraumatic stress disorder. *Depress Anxiety*. 2009;26(12):1110–7. doi: <https://doi.org/10.1002/da.20629>
8. Habtemariam S. The brain-derived neurotrophic factor in neuronal plasticity and neuroregeneration: new pharmacological concepts for old and new drugs. *Neural Regen Res*. 2018 Jun;13(6):983–4. doi: <https://doi.org/10.4103/1673-5374.233438>
9. Mróczyński W. Health Benefits of Endurance Training: Implications of the Brain-Derived Neurotrophic Factor-A Systematic Review. *Neural Plast*. 2019;2019:5413067. doi: <https://doi.org/10.1155/2019/5413067>
10. Nagahara AH, Tuszynski MH. Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. *Nat Rev Drug Discov*. 2011 Mar;10(3):209–19. doi: <https://doi.org/10.1038/nrd3366>
11. Kowiański P, Lietzau G, Czuba E, Waśkow M, Steliga A, Moryś J. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cell Mol Neurobiol*. 2018 Apr;38(3):579–93. doi: <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0510-4>
12. Adachi N, Numakawa T, Richards M, Nakajima S, Kunugi H. New insight in expression, transport, and secretion of brain-derived neurotrophic factor: Implications in brain-related diseases. *World J Biol Chem*. 2014 Nov 26;5(4):409–28. doi: <https://doi.org/10.4331/wjbc.v5.i4.409>
13. Bathina S, Das UN. Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications. *Arch Med Sci*. 2015 Dec 10;11(6):1164–78. doi: <https://doi.org/10.5114/aoms.2015.56342>
14. Norma Oficial Mexicana. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. 1999 p. 1–58.
15. Norma Oficial Mexicana. Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. 2002.
16. Rodríguez Landa JF, Contreras M. C. Los Fármacos antidepressivos y la conducta de inmovilidad en la prueba de nado forzado: participación de los sistemas de neurotransmisión. *Arch neurociencias*. 2000;74–83.
17. Török B, Sipos E, Pivac N, Zelena D. Modelling posttraumatic stress disorders in animals. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2019 Mar 2;90:117–33. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.11.013>
18. Bogdanova OV, Kanekar S, D'Anci KE, Renshaw PF. Factors influencing behavior in the forced swim test. *Physiol Behav*. 2013 Jun 13;118:227–39. doi: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.05.012>
19. Massagué J. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000 Dec;1(3):169–78. doi: <https://doi.org/10.1038/35043051>
20. Li XM, Han F, Liu DJ, Shi YX. Single-prolonged stress induced mitochondrial-dependent apoptosis in hippocampus in the rat model of post-traumatic stress disorder. *J Chem Neuroanat*. 2010 Nov;40(3):248–55. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2010.07.001>
21. Deak T, Bellamy C, D'Agostino LG, Rosanoff M, McElderry NK, Borden KA. Behavioral responses during the forced swim test are not affected by anti-inflammatory agents or acute illness induced by lipopolysaccharide. *Behav Brain Res*. 2005 May 7;160(1):125–34. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.11.024>
22. Tural Ü, Aker AT, Önder E, Sodan HT, Ünver H, Akansel G. Neurotrophic factors and hippocampal activity in PTSD. *PLoS One*. 2018;13(5):e0197889. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197889>