

# Factor neurotrófico derivado del cerebro en tejido cerebral de ratas sanas

**Teresa Serrano Sánchez, Lourdes Lorigados Pedre, Jorge Bergado Rosado, William Almaguer Melián, Jeffrey López Rojas,\* Esteban Alberti-Amador, Ivan Díaz Armesto\*\* y Jorge Felipe Montero León.\*\*\***

Centro Internacional de Restauración Neurológica. Avenida 25 No. 15805 entre Calles 158 y 160, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Código Postal 11300. \*\*Instituto de Neurología y Neurocirugía, El Vedado, Ciudad de La Habana. \*\*Hospital Clínico Quirúrgico "Joaquín Albarrán" Avenida 26, Playa, Ciudad de La Habana. \*\*\*Instituto Nacional de Oncología y Rehabilitación, Calle 29 y E, El Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 15 de octubre de 2008.

Aceptado: 28 de enero de 2009.

Palabras clave: FNDC, hipocampo, corteza cerebral, estriado.

Key words: BDNF, hippocampus, brain cortex, striatum.

**RESUMEN.** Hasta el presente se conocen cinco proteínas, estructuralmente relacionadas, que constituyen la familia de las neurotrofinas dentro de las que se encuentra el factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC), que tiene influencia sobre muchos tipos de neuronas en el sistema nervioso central, promoviendo en ellas su diferenciación, crecimiento y supervivencia. Esta proteína es importante en la neuroprotección, así como en los mecanismos de plasticidad sináptica. Teniendo en cuenta la importancia de este factor en los fenómenos de neuroplasticidad y que no existen datos normativos referente a sus valores normales en el hipocampo, el estriado y la corteza, en este trabajo se evaluó su concentración en el tejido cerebral de ratas sanas. El tejido se obtuvo de ratas machos Wistar con peso corporal entre 200 a 250 g (n = 20). Las muestras fueron homogenizadas y la concentración del FNDC fue estimada por un ensayo inmunoenzimático. No hubo diferencias significativas en las concentraciones de FNDC entre los hemisferios cerebrales derecho e izquierdo para las estructuras homólogas estudiadas, aunque se evidenció una tendencia a la disminución del FNDC en el lado izquierdo con respecto al lado derecho. El hipocampo mostró una concentración más elevada del FNDC que la detectada en el estriado y la corteza, mientras que entre estas dos últimas estructuras no se detectaron diferencias significativas. Este trabajo permitió el establecimiento de los valores de referencia del FNDC, lo cual tendrá utilidad en los estudios futuros que indaguen sobre las potencialidades y los mecanismos neuroplásticos, tanto para el funcionamiento normal del sistema nervioso, como para la recuperación de las funciones perdidas.

**ABSTRACT.** Up to the moment five proteins are known, structurally related that constitute the neurotrophin family that belong to brain derived neurotrophic factor (BDNF) that has influence on many types of neurons in the central nervous system, promoting neuronal differentiation, growth, and survival. This protein is important in the neuroprotection, as well as in the mechanisms of synaptic plasticity. In this work we evaluate the BDNF contents in cerebral tissue from normal rats due to the importance of this factor in neuroplasticity phenomena, and the lack of normative data in the literature regarding the normal values of this protein in hippocampus, cortex, and striatum. Wistar male rats weighing from 200 to 250 g were used as experimental animals (n = 20). The samples were homogenized, and the BDNF concentration was measured using an immunoenzymatic system. There were no significant differences in the BDNF concentrations between homologous areas in both cerebral hemispheres right and left for the studied homologous areas, although a tendency to the decrease was evidenced in the left side concerning the right side when was compared. The concentration in hippocampus was higher than the one detected in the striatum and cortex, while BDNF concentration in the striatum and cortex did not show significant differences among them. This work allowed the established reference values of BDNF, which will be very useful for the future studies that research on the potentialities and neuroplasticity mechanisms, in the normal nervous system, as well as the recovery of lost functions.

## INTRODUCCIÓN

Estudios recientes han reforzado el papel que representan los factores de crecimiento en el mantenimiento de la función y regulación de la plasticidad sináptica.<sup>1</sup> La familia de las neurotrofinas ha sido implicada en la regulación de eventos de plasticidad, que incluyen fenómenos de crecimiento de las fibras nerviosas en el tejido

dañado. Esta capacidad regenerativa es importante si se tiene en cuenta que ella permite restablecer las funciones normales en el tejido cerebral lesionado.<sup>1,2</sup>

Se ha demostrado que de las proteínas que pertenecen a la familia de las neurotrofinas, el factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC), un homodímero de 27 kDa que fue identificado por Barde y cols.<sup>3</sup> y clonado por

### Correspondencia:

Teresa Serrano Sánchez

Centro Internacional de Restauración Neurológica. Avenida 25 No. 15805 entre Calles 158 y 160, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba, Código Postal 11300. Correo electrónico: [teresa.serrano@infomed.sld.cu](mailto:teresa.serrano@infomed.sld.cu)

Leibrock y cols.<sup>4</sup> a finales de la década de los ochentas, es el que está íntimamente relacionado con eventos de plasticidad sináptica que tienen lugar en regiones cerebrales específicas.<sup>5</sup> Para llevar a cabo estos estudios han sido utilizados diversos métodos de detección que permiten identificar no solo a la proteína, sino también, a su ARNm (ácido ribonucleico mensajero), así como a su receptor.<sup>6-8</sup> Estos estudios han aportado datos relacionados con las principales funciones que el FNDC ejerce sobre diferentes poblaciones neuronales. Se conoce que esta neurotrofina tiene acción directa sobre la síntesis de proteína, hecho este muy importante en los procesos de plasticidad neuronal, en los que la potenciación a largo plazo es considerada la base de la consolidación del aprendizaje y la memoria y está relacionada con el agrandamiento de espinas neuríticas, que dependen de la síntesis de proteína inducida por el FNDC.<sup>1</sup>

Por el creciente interés de determinar la actividad que realiza esta proteína y por la existencia de referencias escasas sobre las concentraciones normales de ella en el hipocampo, el estriado y la corteza, el presente trabajo cuantificó las concentraciones del FNDC a través de un ensayo inmunoenzimático. Los datos mostrados aquí revelan la utilidad del método utilizado, así como la función de dicha proteína en áreas de tejido cerebral de ratas en condiciones normales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales de Experimentación

Se utilizaron ratas machos de la línea Wistar, con un peso corporal entre 200 y 250 g, (Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, Ciudad de La Habana). Se distribuyeron cinco animales por caja, con acceso libre al agua, comida y con ciclos de luz-oscuridad de 12 h, hasta que fueron sacrificadas para el estudio.<sup>9</sup> Se incluyeron todos los animales que no mostraron signos de infección o lesión de algún tipo, El número de animales experimentales fue de 20.

Bajo anestesia con hidrato de cloral 7 % (420 mg/kg), los animales fueron sacrificados, los cerebros extraídos y separados bilateralmente el cuerpo estriado, el hipocampo y la corteza frontal. Las n por área fue la siguiente: corteza, 23; estriado, 27 e hipocampo, 23.

### Procesamiento de las muestras de tejido

Las muestras de tejido obtenidas, fueron homogenizadas en disolución reguladora de lisis (homogenizador bioblock scientific) en disolución a 4 °C (cloruro de sodio 0,15 mol/L; Tris-HCL 0,2 mol/L (pH 8); Nonidet-40 1 %; glicerol 10 %; PMSF 0,001 mol/L; aprotinina 10 µg/mL; leupeptin 1 µg/mL; vanadato de sodio 0,000 5 mol/L). Se aplicaron 20 golpes a 500 g y se aisló la fracción citosólica por centrifugación a 2 800 g, durante 30 min a 4 °C .

### Ensayo inmunoenzimático

Placas de 96 pocillos fueron recubiertas con el anticuerpo monoclonal (AcMo) anti-FNDC a una concentración de 10 µg/mL, el cual se unió al FNDC presente en las muestras en disolución. Además, se utilizó una curva patrón a una concentración de 7,8 a 500 pg/mL . El FNDC capturado se unió al anticuerpo policlonal específico anti-FNDC (a una dilución de 1 : 500). Después de utilizar una disolución de lavado, la cantidad de anticuerpo policlonal unido específicamente, se detectó utilizando un anticuerpo anti-IgG especie específico conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) a una dilución de 1 : 200, que actuó como reactante terciario.

El conjugado que no se unió al complejo fue eliminado con tres lavados y seguidamente, se incubó con el sustrato cromogénico (TMB, tetrametilbenzidina). De esta manera, se midió la intensidad del color producida en la reacción de oxido-reducción. La cantidad de FNDC detectable en tejido fue proporcional al color generado durante la reacción. La determinación se realizó en un lector de ensayo inmunoenzimático (Elx 800 µV) a 450 nm de longitud de onda.

Para la detección específica del FNDC, se utilizó un EIE en un formato de doble sitio utilizando un juego de reactivos comercial (Promega Corporation, USA).<sup>10</sup> Las placas recubiertas con el anticuerpo fueron incubadas durante 14 a 18 h . El resto de las incubaciones fueron realizadas al día siguiente. Los procedimientos realizados a temperatura ambiente se llevaron a cabo entre 18 y 23 °C .

### Procesamiento estadístico

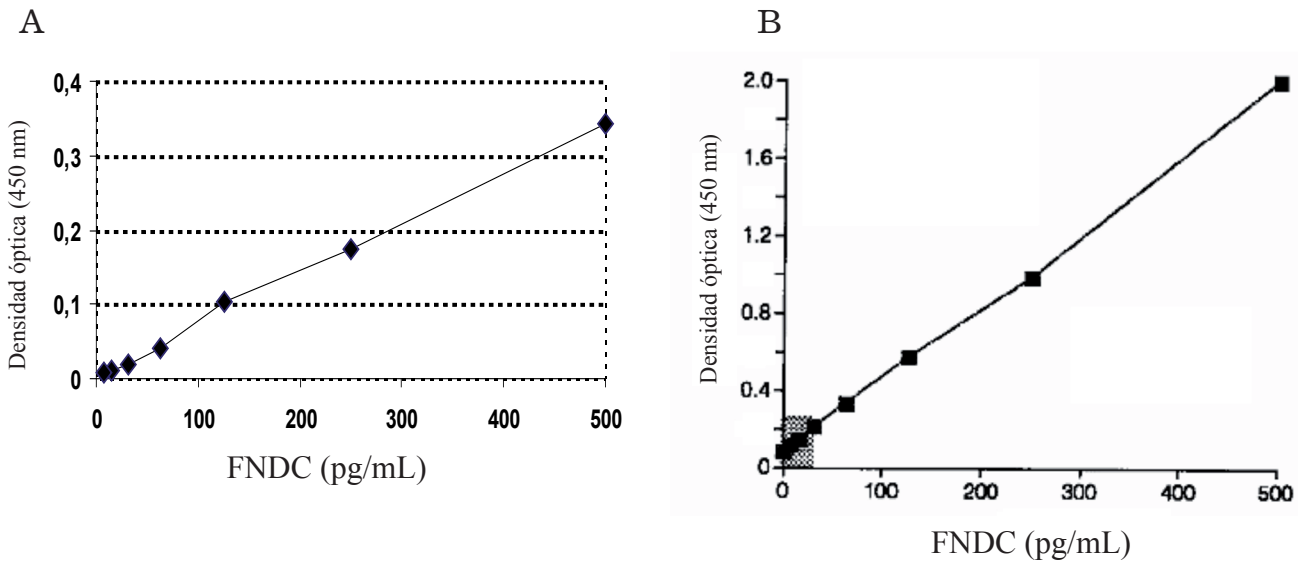
Fue analizada la distribución y la homogeneidad de varianza de la variable concentración del FNDC mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la prueba de Levene, respectivamente. Una vez comprobada la distribución normal de la muestra, los datos fueron analizados con pruebas paramétricas. Se procesó toda la información recogida mediante el programa profesional Statistica para Windows. Versión 6,0 (Copyright Statsoft, Inc. 1993). Para determinar la concentración del FNDC en las diferentes áreas de tejido cerebral seleccionadas, se realizó estadística descriptiva. Para precisar las diferencias en la concentración del FNDC entre los lados izquierdos y derecho entre las áreas estudiadas (hipocampo, estriado y corteza), se realizó la comparación mediante la aplicación de la prueba t-student. Para el estudio comparativo de la concentración del FNDC entre en las diferentes áreas cerebrales se realizó una prueba de ANOVA de una vía.

## RESULTADOS

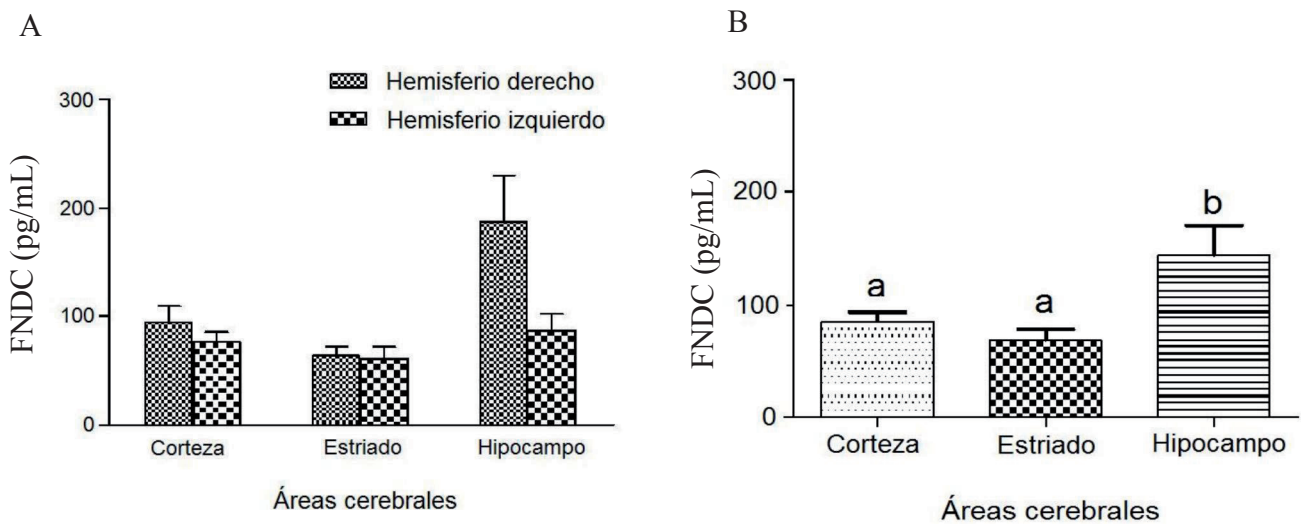
El FNDC estándar utilizado en este estudio (Fig. 1A), mostró similitud con el referido por la casa comercial (Fig. 1B). Los resultados mostraron una curva de regresión lineal entre la concentración del FNDC y la densidad óptica, con un coeficiente de regresión de:  $r^2 = 0,99$ , condiciones en que la concentración, según las diluciones realizadas para el estándar del FNDC (0 a 500 pg/mL) estuvo dentro del intervalo descrito por el fabricante.

El ensayo inmunoenzimático utilizado fue capaz de detectar las concentraciones del FNDC en el tejido cerebral de ratas sanas. Entre las estructuras homólogas de tejido (corteza, estriado e hipocampo) correspondientes a cada hemisferio cerebral derecho e izquierdo, las concentraciones del FNDC no mostraron diferencias significativas, a pesar de que en el hipocampo hubo cierta tendencia a disminuir la concentración del FNDC en el lado izquierdo con respecto al lado derecho (Fig. 2A).

Aunque no hubo diferencias en las concentraciones del FNDC entre los dos hemisferios cerebrales para una misma estructura en cada sujeto experimental, la comparación de la concentración del FNDC entre las diferentes áreas cerebrales, sí mostró heterogeneidad (Fig. 2B). Se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), entre el hipocampo con respecto al estriado y la corteza, ya que este mostró la presencia de una mayor concentración del FNDC. Por otro lado, se pudo determinar que la corteza mostró concentraciones del FNDC similares a las detectadas en el



**Fig. 1.** Curva estándar del factor neurotrófico derivado del cerebro. A) Curva de regresión lineal obtenida en el ensayo. B) Curva de regresión lineal referida por la casa comercial.<sup>10</sup> Para ambas curvas se aprecia un coeficiente de regresión cercano a 1 ( $r^2 = 0,999$ ). Comparativamente, las concentraciones, según las diluciones realizadas para el estándar del FNDC utilizadas en este estudio (0 a 500 pg/mL) estuvieron dentro de los valores las descritas por la casa comercial.



**Fig. 2.** Concentraciones del factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC) en muestras de tejido cerebral de ratas (corteza, estriado e hipocampo). En A se muestra que no existen diferencias significativas en las concentraciones del FNDC entre las estructuras homólogas en los hemisferios cerebrales derecho e izquierdo (prueba t-student,  $p > 0,05$ ). En B se muestran las diferencias significativas de las concentraciones del FNDC entre las diferentes áreas cerebrales. Letras comunes significa que no hay diferencias significativas, letras diferentes indican diferencias significativas. (Prueba de ANOVA de una vía,  $p < 0,05$ ). Los datos expresan la media  $\pm$  el error estándar de la media.

estriado. Los resultados obtenidos en cada área fueron: corteza:  $(84,54 \pm 8,98)$  pg/mL; estriado:  $(68,74 \pm 9,39)$  pg/mL; e hipocampo:  $(143,81 \pm 26,27)$  pg/mL.

### DISCUSIÓN

Se utilizó un ELISA<sup>10</sup> para estimar las concentraciones del FNDC en tejido cerebral, tomando como referencia el tejido cerebral de ratas normales. Este método inmunoenzimático ha sido utilizado por otros grupos,<sup>11,12</sup> y las bajas concentraciones del FNDC que

fueron obtenidas son similares a las ya reportadas por estos autores, lo que confirma la validez del método y su uso adecuado en la detección del FNDC. Sin embargo, debe notarse que el número de muestras utilizadas en este trabajo supera la reportada para animales controles, ya que en los estudios en que se ha realizado este tipo de ensayo, la n utilizada como control negativo para ser comparada con respecto a los animales enfermos, es muy pequeña,<sup>7,11</sup> y en otros casos, corresponden a estudios en humanos.<sup>13</sup> En todas las ocasiones, la cantidad de FNDC

en la disolución fue proporcional al color generado por la reacción de oxidación-reducción.

Se han descrito ampliamente estudios relacionados con la expresión del FNDC, su RNAm y sus receptores,<sup>14,15</sup> que han permitido demostrar, la importancia de este factor en la regulación de las conexiones neuronales, en la eficacia de las sinapsis y en la producción de neuropéptidos en etapas más tardía del desarrollo neuronal.<sup>16,17</sup> Muchos de estos estudios son controversiales, ya que arrojan diferentes resultados en cuanto a la posibilidad de detectar o no el FNDC en determinadas estructuras cerebrales. Se considera por las evidencias, que esto obedece básicamente a la variabilidad de las técnicas empleadas para la cuantificación del FNDC y por consiguiente, la sensibilidad de los métodos utilizados, si se tiene en cuenta que esta proteína se encuentra en muy bajas concentraciones, tanto en tejido como en fluidos corporales, y a la edad a la cual se mide el factor, pues ya se conoce que el FNDC tiene una expresión diferencial en función de la edad, el sexo y el tipo de muestra que se analiza.<sup>11,12,18</sup>

Los resultados pusieron de manifiesto, que no existen diferencias en las concentraciones detectadas de FNDC, entre los lados derecho e izquierdo en las estructuras estudiadas (hipocampo, corteza y estriado), sin embargo, se halló una tendencia a la disminución de las concentraciones del FNDC en el hipocampo cuando se comparó el lado izquierdo con respecto al derecho, aunque no fue estadísticamente significativa. De manera general, se cuantificaron bajas concentraciones de la proteína, lo cual concuerda con lo reportado para otros fluidos corporales.<sup>12</sup>

Se pudo comprobar que la cantidad del FNDC existente en las distintas estructuras cerebrales no se distribuye uniformemente, lo cual le da un carácter heterogéneo a la concentración del FNDC cuantificado en este estudio y es de utilidad cuando se utiliza como referencia al estado patológico. Este hecho ha sido discutido en la comunidad científica y ya se conoce que la concentración de esta proteína al igual que para otras que forman parte de la familia de las neurotrofinas, esta sujeta a las características propias de cada área, al tipo de población neuronal y a la función que posea cada estructura.<sup>11,12,18</sup> Se ha podido evidenciar que frente a determinados estados patológicos que involucran alteraciones de esta familia de proteínas puede estar afectada seriamente la plasticidad sináptica, independientemente de que aún permanecen muchos aspectos sin aclarar. No obstante, se les adjudica un papel importante a determinadas moléculas, que inducen la expresión de otros elementos que actúan en estos mecanismos de neuroplasticidad.<sup>18</sup> Finalmente, en concordancia con lo reportado para fluidos corporales como el suero y el líquido cefalorraquídeo,<sup>19,20</sup> se muestra un estudio descriptivo de las funciones del FNDC en tres estructuras cerebrales en condiciones normales. Todo esto en su conjunto reviste gran importancia si se tiene en cuenta que estos valores pueden ser utilizados como referencia para evaluar la expresión del FNDC en los procesos patológicos donde este factor se encuentra comprometido o para seguir sus variaciones en el caso que sea usado como terapia neurorestauradora.

En conclusión, las concentraciones del FNDC detectados estuvieron en el orden de los picogramos, lo que evidencia que esta proteína se encuentra en bajas concentraciones en el tejido cerebral. No se observaron diferencias entre las concentraciones detectadas del FNDC entre los hemisferios cerebrales derecho e

izquierdo de las áreas de tejido cerebral seleccionadas, lo cual sugiere que entre los dos hemisferios cerebrales no hay variaciones de esta proteína para una misma estructura en condiciones normales. Finalmente, el estudio mostró una distribución no homogénea de las concentraciones detectables del FNDC donde los niveles más elevados correspondieron al hipocampo de manera significativa, y aunque la corteza y el estriado, mostraron un comportamiento similar, se pudo apreciar que en el estriado las concentraciones detectadas son menores que en la corteza, lo cual significa que para las estructuras estudiadas, el hipocampo representa el reservorio mayor de esta proteína en condiciones normales.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tanaka JI, Horiike Y, Matsuzaki M, Miyazaki T, Ellis-Davies GC, and Kasai H. Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines. *Science*. 2008;319:1683-7.
2. Kurisaki A, Inoue I, Kurisaki K, Yamakawa N, Tsuchida K and Sugino H. Activin induces long-lasting N-methyl-D-aspartate receptor activation via scaffolding PDZ protein activin receptor interacting protein 1. *Neuroscience*. 2008;151:1225-35.
3. Barde YA, Edgar D and Thoenen H. Purificación of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J*. 1982;1:549-553.
4. Leibrock J, Lottspeich F, Hohn A, Hofer M, Hengerer B, Masiakowski P, *et al*. Molecular cloning and expression of brain derived neurotrophic factor. *Nature*. 1989;341:149-152.
5. Alme MN, Wibrand K, Dagestad G and Bramham CR. Chronic fluoxetine treatment induces brain region-specific upregulation of genes associated with BDNF-induced long-term potentiation. *Neural Plast*. 2007;26:496.
6. Akaneya Y, Jiang B and Tsumoto T. RNAi-induced gene silencing by local electroporation in targeting brain region. *J Neurophysiol*. 2005;93:594-602.
7. Feng H, Lu LM, Huang Y, Zhu YC and Yao T. Blockade of NMDA receptor enhances corticosterone-induced down regulation of brain-derived neurotrophic factor gene expression in the rat hippocampus through cAMP response element binding protein pathway. *Sheng Li Xue Bao*. 2005;57: 537-44.
8. Von Bohlen und Halbach O, Krause S, Medina D, Sciarretta C, Minichiello L and Unsicker K. Regional- and age-dependent reduction in trkB receptor expression in the hippocampus is associated with altered spine morphologies. *Biol Psychiatry*. 2006;59:793-800.
9. Canadian Council on Animal Care. Guidelines for the use of animals in neuroscience research In: Olfert ED, Cross BM, McWilliam DVM, McWilliam AA, editors. Guide to the care and use of experimental animals. Ottawa Bradda Printing Services Inc. 1997;163-165.
10. Promega Corporation. BDNF E<sup>max</sup> ImmunoAssay System. Instructions for use of products G7610. Technical Bulletin 2005;257:1-16.
11. Angelucci F, Aloe L, Vasquez P and Mathé A. Mapping the differences in the brain concentration of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in an animal model of depression. *NeuroReport*. 2000;11:1369-1373.
12. Xia YX, Tomoaki I, Xiao Y, and Tsuyomu I. Differential neurotrophin levels in cerebrospinal fluid and their changes during development in newborn rat. *Neurosci Lett*. 2000;280:220-222.
13. Schidt-Kastner R, Wetmore C and Olson L. Comparative study of brain derived neurotrophic factor messenger RNA and protein at the cellular levels suggests multiple roles in the hippocampus, striatum an cortex. *Neurosci*. 1996;74:161-83.
14. John F, Jane T, Jie W, Robert R, Andrew W and Tsutomu A. Interactions of Neurotrophin-3 (NT-3), Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and the NT-3. BDNF Heterodimer with the Extracellular Domains of the TrkB and TrkC Receptors. *J Biol Chem*. 1994;269:27840-27846.

15. Torkel F, Abdul KM, Bengt H, Hakan P, Bengt W and Nils L. Increased expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus is associated with improved spatial memory and enriched environment. *Neurosci Lett.* 1992;138:153-156.
16. Lohof AM, Ip NY and Poo MM. Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF. *Nature.* 1993;363:350-352.
17. Snider W.D. and Johnson J. Neurotrophic molecules. *Ann Neurol.* 1989;26:489-506.
18. Yang PC, Yang CH, Huang CC and Hsu KS. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for stress protocol-induced modification of hippocampal synaptic plasticity. *J Biol Chem.* 2008;283:2631-43.
19. Katoh-Semba R, Wakako R, Komori T, Shigemi H, Miyazaki N, Ito H, *et al.* Age-related changes in BDNF protein levels in human serum: differences between autism cases and normal controls. *Int J Dev Neurosci.* 2007;25:367-72.
20. Laske C, Stransky E, Leyhe T, Eschweiler GW, Maetzler W, Wittorf A, Soekadar S, Richartz E, Koehler N, Bartels M, Buchkremer G, and Schott K. BDNF serum and CSF concentrations in Alzheimer's disease, normal pressure hydrocephalus and healthy controls. *J Psychiatr Res.* 2007;41:387-94.