

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CURSO DE BIOMEDICINA

**ESTÁGIO DE PESQUISA E TRABALHO DE
CONCLUSÃO DE CURSO EM BIOMEDICINA**

**RILUZOLE ESTIMULA A LIBERAÇÃO DE BDNF
POR PLAQUETAS HUMANAS *IN VITRO***

PATRICK TÜRCK/00194037

Porto Alegre, novembro de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CURSO DE BIOMEDICINA

**ESTÁGIO DE PESQUISA E TRABALHO DE
CONCLUSÃO DE CURSO EM BIOMEDICINA**

**RILUZOLE ESTIMULA A LIBERAÇÃO DE BDNF
POR PLAQUETAS HUMANAS *IN VITRO***

PATRICK TÜRCK/00194037

Orientador:

Marcos Emílio Frizzo

Porto Alegre, novembro de 2014

AGRADECIMENTOS

O agradecimento é parte fundamental do caráter, sem o qual não se desenvolve nada de valor. À minha família devo agradecer pela educação, carinho e por todos os princípios éticos e morais que, sempre partindo do exemplo, me tornaram quem sou hoje. Também à minha família agradeço pelo apoio e confiança, sempre acreditando em mim, inclusive em momentos em que eu mesmo duvidava. À minha namorada, por compartilharmos todos esses anos de faculdade juntos, que só foram os melhores porque foram contigo. Aos meus amigos, aqueles poucos e verdadeiros, agradeço pela compreensão que sempre tiveram por mim e por tornarem tudo sempre mais leve. Aos meus professores, desde a escola de nível básico, devo agradecer demasiadamente. Sempre foram incentivadores, me motivando para melhorar o que não estava bom e expressando sua admiração quando eu desenvolvia um bom trabalho.

Em minha trajetória acadêmica na faculdade, devo agradecer aos meus colegas do laboratório 219 do Centro de Biotecnologia da UFRGS, em especial ao professor Diego Bonatto e à Raquel Calloni, os quais me ensinaram desde o início como desenvolver um bom trabalho, tendo paciência e respeito por mim durante todo esse processo. Aos meus colegas de laboratório na Alemanha e ao meu supervisor Wolf-Rainer Abraham por me receberem com carinho e por acreditarem no meu potencial. Finalmente, devo agradecer aos meus atuais colegas do laboratório 51 de Neurobiologia Celular por me aceitarem tão rapidamente e fazerem me sentir querido entre todos. Em particular, agradeço a meu orientador, Marcos Frizzo, por estar presente durante a realização desse projeto e por acreditar em meu trabalho. Agradeço-lhe também pelo exemplo de que se pode ter sucesso trabalhando-se com ética e princípios. Devo terminar agradecendo à banca por dedicar atenção e tempo na leitura desse trabalho e ao leitor, pelo interesse naquilo que aqui foi desenvolvido.

“Wir lernen nur von denen, die wir lieben.”

Johann Wolfgang von Goethe (1749 - 1832)

ÍNDICE

Resumo.....	5
I. Introdução.....	7
1. Introdução Geral sobre as Plaquetas.....	7
1.1 BDNF.....	8
1.2 Plaquetas: relação com SNC e BDNF.....	10
1.3 Riluzole.....	13
2. Hipótese.....	14
3. Objetivos.....	14
II. Artigo Científico.....	15
III. Conclusão e Perspectivas.....	34
Referências Bibliográficas.....	35
Anexo I (Normas da Revista).....	41

RESUMO

A função mais comumente associada às plaquetas é a de hemostase, com formação do coágulo sanguíneo e bloqueio da hemorragia. Apesar da função hemostática já ser bem descrita, tem se demonstrado que plaquetas participam de outros mecanismos fisiológicos e têm sua biologia associada a doenças neuropsiquiátricas. Desde 1960, vários trabalhos têm utilizado plaquetas como marcadores periféricos da função neuronal do sistema nervoso central (SNC). Os principais motivos que levam a essa abordagem são a inerente dificuldade de acesso direto à função cerebral *in vivo* e as similaridades entre plaquetas e neurônios centrais, tornando-as importantes para o estudo de algumas funções do SNC. Vindo de encontro com esse trabalho, plaquetas contêm BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) estocado em seus grânulos (YAMAMOTO e GURNEY, 1990) e são capazes de liberá-lo quando estimuladas por agonistas (FUJIMURA et al., 2002). Assim, as plaquetas contribuem para os níveis de BDNF circulatório no plasma, o qual varia fisiologicamente conforme a idade, gênero e parâmetros físicos em adultos (LOMMATZSCH et al., 2005). Já foi descrito menores concentrações de BDNF em plasma rico em plaquetas de pacientes suicidas e não-suicidas diagnosticados com depressão maior (LEE e KIM, 2009) e que o tratamento com o antidepressivo sertralina aumenta a liberação de BDNF plaquetário e, por consequência, plasmático (WATANABE et al., 2010). Recentemente, o fármaco riluzole (6-(trifluorometoxi)benzotiazol-2-amina) foi proposto para o tratamento da depressão, uma vez que essa droga é capaz de baixar os níveis de glutamato extracelular e aumentar a expressão de BDNF, ambos mecanismos que poderiam estar associados com sua ação antidepressiva (SANACORA et al., 2007). Considerando que o riluzole aumenta os níveis de BDNF no soro de pacientes, nós investigamos se o tratamento com essa droga poderia estimular a liberação dessa neurotrofina de plaquetas humanas obtidas de doadores saudáveis. Em nosso estudo, buscamos verificar se há mudanças nas concentrações de BDNF extracelulares quando plaquetas são tratadas com riluzole *in vitro*.

Observamos que há uma ampla distribuição nos níveis de BDNF plaquetários na população amostral, que varia de 9,0 a 220,2 pg 10^{-6} plaquetas. Quando plaquetas foram incubadas com riluzole por 4h, o valor basal de BDNF comparado com os controles ($92,9 \pm 11,1$ pg 10^{-6} plaquetas) se mostrou significativamente elevado ($p < 0,05$). Mesmo para plaquetas de doadores que apresentavam baixo nível basal de BDNF, o tratamento

com riluzole estimulou a liberação dessa neurotrofina. Um significativo efeito estimulatório sobre a liberação de BDNF foi observado a partir do tratamento com 10 μM de riluzole (15%), sendo mantido elevado com 40 μM (22%) e 100 μM (20%).

O novo efeito descrito para o riluzole pode contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos com sua ação terapêutica, reforçando a sugestão para seu uso na psiquiatria, como por exemplo, no tratamento da depressão.

I. INTRODUÇÃO

1. Introdução geral sobre as plaquetas

Plaquetas ou trombócitos são pequenas células em forma de disco, medindo entre 2 e 3µm de diâmetro e derivadas da fragmentação de seus precursores, os megacariócitos. Sua meia-vida é de 5 a 9 dias e em seu interior há diversos grânulos que podem ser secretados. Os alfa-grânulos, as organelas mais numerosas em plaquetas, contém diversos fatores de crescimento (fator de crescimento ligado à insulina, fator de crescimento plaquetário, fator de necrose tumoral β , entre outros) e proteínas relacionadas com a coagulação (fator de von Willebrand, fibronectina e moléculas de adesão plaquetária). Já os delta-grânulos, (também chamados de corpos densos) são ricos em ATP, ADP, serotonina, pirofosfato, cálcio e magnésio. Em geral, são 10 vezes menos concentrados em plaquetas quando comparados com os alfa-grânulos (REED, 2006).

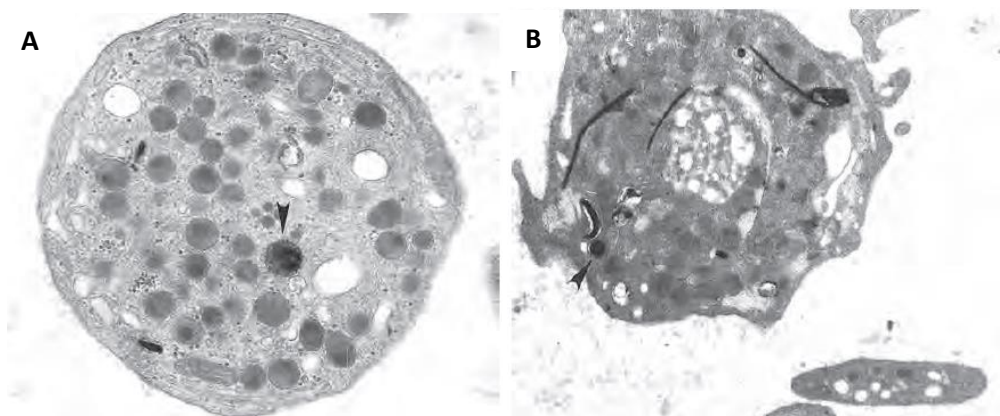


Figura 1: Eletromicrografias de plaquetas, destacando-se seus alfa-grânulos (seta em A) e delta grânulos (seta em B). Aumento x22.000 (a) e x15.000 (b). Imagem adaptada de WHITE, James G. Platelet Structure. In: MICHELSON, Alan D. Platelets. Boston: Elsevier, 2006. p. 47-75.

A função mais comumente associada às plaquetas é a de hemostase, com formação do coágulo sanguíneo e bloqueio da hemorragia. De forma geral, inicialmente há um dano endotelial levando à exposição de colágeno para as plaquetas circulantes. Esse colágeno se associa a receptores de superfície plaquetária, glicoproteínas Ia/IIa, levando à ativação dessas células. Há ainda a ligação das plaquetas com o fator de von Willebrand, formando ligações adicionais com colágeno. Em seguida, ocorre a liberação dos conteúdos dos grânulos para o plasma sanguíneo, com consequente ativação de

outras plaquetas e modificação da glicoproteína IIb/IIIa, a qual resulta no aumento da sua afinidade pelo fibrinogênio. A partir dessa etapa, acontece a ativação da cascata de coagulação, que pode seguir duas vias distintas, envolvendo diversos fatores de coagulação. Como produto comum há a formação da trombina, a qual promove a conversão do fibrinogênio em fibrina, levando ao reforço do tampão hemostático (PALLISTER e WATSON, 2010).

Apesar da função hemostática já ser bem descrita, tem se demonstrado que plaquetas participam de outros mecanismos fisiológicos, como imunorregulação em processos inflamatórios envolvendo recrutamento de leucócitos ao secretarem moléculas de adesão (MCGREGOR et al., 2006) e regeneração de tecidos, como por exemplo, o tecido hepático, ao secretarem diversos fatores de crescimento (NOWATARI et al., 2013). Além disso, plaquetas também desempenham papéis importantes em patologias que não diretamente dizem respeito à hemostase. Essas células já foram observadas como facilitadoras em processos de metástase em diversos cânceres, com participação na angiogênese e progressão tumoral (GASIC et al., 1968; KARPATKIN et al., 1981) e associadas com complicações do diabetes mellitus (STRATMANN et al., 2006). Ademais a essas patologias, no que diz respeito diretamente a esse trabalho, a biologia das plaquetas tem sido associada com doenças neuropsiquiátricas.

1.1 BDNF

O fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain-derived neurotrophic factor* - *BDNF*) foi descoberto em 1982 (BARDE et al., 1982) como sendo capaz de promover a sobrevivência de uma população de neurônios do gânglio dorsal em porcos. Desde então outros fatores neurotróficos vêm sendo descritos e estudados, como por exemplo a neurotrofina-3 (NT-3) (MAISONPIERRE et al., 1990) e a neurotrofina-4/5 (NT-4/5) (HALLBOOK et al., 1991), cada uma com um padrão distinto de efeitos tróficos em populações de neurônios no sistema nervoso central ou periférico (BINDER e SCHARFMAN, 2004). O BDNF compartilha em torno de 50% de identidade de seus aminoácidos com o fator de crescimento nervoso (NGF), NT-3 e NT-4/5. Assim como esses fatores, o BDNF é inicialmente produzido com uma pró-neurotrofina, necessitando sua clivagem para atuar como neurotrofina madura (CHAO e

BOTHWELL, 2002). De forma geral, cada neurotrofina se liga a um tipo de receptor cinase relacionado à tropomiosina (tropomyosin-related kinase receptor – trk), membros da família dos receptores tirosina cinase (PATAPOUTIAN et al., 2001). Isso leva à dimerização desses receptores, consequente ativação de cinases e subsequente autofosforilação de múltiplos resíduos de tirosina do receptor, criando sítios específicos para proteínas intracelulares alvo (como a proteína fosfolipase C e a subunidade p85 da proteína fosfatidil-3-inositol cinase) (PATAPOUTIAN et al., 2001). Dentro da família de receptores trk, trkB é responsável pela ligação do BDNF, o qual pode se ligar a forma completa ou truncada desse receptor, havendo diferença nos processos que podem ser desencadeados (PATAPOUTIAN et al., 2001). A ligação do BDNF também ocorre em p75, um receptor transmembrana que tem relação com proteínas da superfamília dos fatores de necrose tumoral (TNF) e leva à sobrevivência celular, mielinização e migração celular (COSGAYA et al., 2002; ROUX e BARKER, 2002).

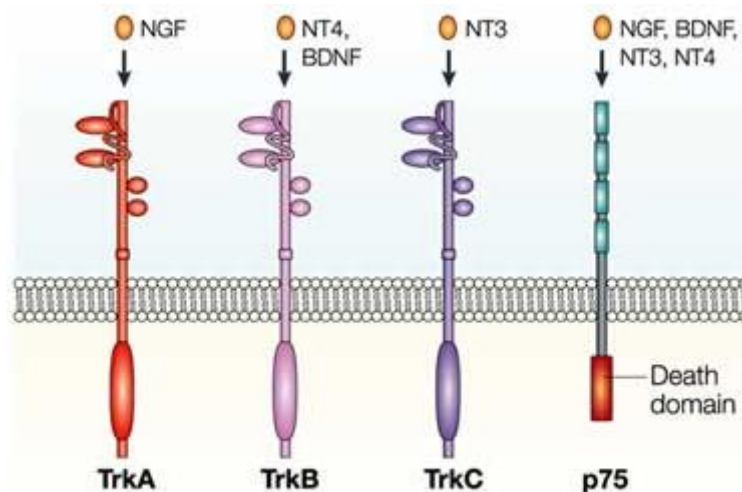


Figura 2: Neurotrofinas se ligam seletivamente a receptores Trk específicos, enquanto todas se ligam a p75. Apenas uma proteína transmembrana do receptor dimérico foi representada. Imagem adaptada de Moses V. Chao “Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways” *Nature Reviews Neuroscience* 4, 299-309 (April 2003).

O BDNF tem ações de sobrevivência e crescimento em uma variedade de neurônios, incluindo células do gânglio da raiz dorsal e do hipocampo (ACHESON et al, 1995; HUANG e REICHARDT, 2001). Camundongos knockout homozigotos para BDNF não são capazes de sobreviver após 3 semanas, enquanto os heterozigotos knockout exibem fenótipos com prejuízo de aprendizagem espacial, mostrando a

importância dessa neurotrofina no correto desenvolvimento neural (HUANG e REICHARDT, 2001). Além disso, de forma geral, o BDNF parece atuar facilitando sinapses excitatórias glutamatérgicas, como, por exemplo, se fazendo necessário para que ocorra a potenciação de longa duração (LTP) (KORTE et al., 1995). O BDNF também foi descrito como estimulador da neurogênese, aprendizagem e memória, havendo aumento desse fator neurotrófico no córtex parietal de animais que aprederam a usar determinados objetos (ISHIBASHI et al., 2002) e também aumento no hipocampo de animais que passaram por processos de aprendizagem (HALL et al., 2000).

Com tamanha importância em diferentes processos cognitivos, os níveis de BDNF também aparecem modificados em diversas patologias. Na epilepsia, por exemplo, essa neurotrofina tem seu mRNA e sua proteína aumentada no hipocampo e, ao se utilizar agentes anti-BDNF ou o uso de camundongos knockout para BDNF, nota-se diminuição dos quadros convulsivos (ERNFORS et al., 1991; KOKAIA et al., 1995). Além disso, esse fator neurotrófico se apresenta diminuído em algumas doenças neurodegenerativas, com menor expressão de mRNA no hipocampo de indivíduos com doença de Alzheimer e menor expressão da sua proteína na substância negra de indivíduos com doença de Parkinson (PHILLIPS et al., 1991; HOWELLS et al., 2000). No campo das doenças neuropsiquiátricas também se encontra diminuição dos níveis de BDNF, como no caso da depressão maior, cujo tratamento com determinados antidepressivos levam ao aumento de seu mRNA e proteína (CHEN et al., 2001). Assim, a quantificação do BDNF em neuropatologias, tanto auxiliando no possível diagnóstico quanto avaliando a eficácia do tratamento é uma ferramenta importante a ser explorada.

1.2 Plaquetas: relação com SNC e BDNF

Desde 1960, vários trabalhos têm utilizado plaquetas como marcadores periféricos da função neuronal do sistema nervoso central (SNC). Os principais motivos que levam a essa abordagem são a inerente dificuldade de acesso direto ao tecido cerebral e as similaridades entre plaquetas e neurônios centrais (GURGUIS,2006). Plaquetas humanas compartilham diversas características com neurônios e astrócitos, tornando-as importantes para o estudo de algumas funções do SNC (STAHL, 1977; DA

PRADA et al., 1988). Inicialmente, essas células foram estudadas como modelo sináptico serotoninérgico e dopaminérgico, uma vez que elas são capazes de liberar e recaptar serotonina (5HT) e dopamina (BARBEAU et al., 1975; ZIEVE et al., 1968), além de expressarem receptores serotoninérgicos (SHELIN et al., 1995). As membranas das plaquetas possuem receptores HT2A similares aos encontrados no córtex, os quais são acoplados à fosfolipase C através de proteínas Gq/11 (SMRCKA et al., 1991). Apresentam também transportadores serotoninérgicos (5-HTTP) e transportadores vesiculares de monoaminas (VMAT2) idênticos aos do córtex (LESCH et al., 1993). Além disso, plaquetas apresentam organelas subcelulares que armazenam serotonina e mitocôndrias com presença de monoaminoxidase (MAO) capaz de catabolizar esse neurotransmissor (PLEIN e BERK, 2001). Existem trabalhos correlacionando a expressão e atividade de receptores de serotonina em plaquetas e algumas patologias psiquiátricas. Observou-se que a captação de 5HT por plaquetas de pacientes depressivos está diminuída, bem como sua resposta de agregação na presença de 5HT (BUTLER e LEONARD, 1988). Alguns autores sugerem que há o aumento dos valores de binding (Bmax) a receptores 5HT2 em plaquetas de pacientes com esquizofrenia (PANDEY et al., 1993), enquanto outros apontam a diminuição deste (MARAZZITI et al., 1989).

Plaquetas também estão envolvidas no metabolismo do glutamato, expressando receptores (FRANCONI et al., 1996) e transportadores de aminoácidos excitatórios (EAAT) 1, 2 e 3 com papéis distintos na captação deste aminoácido (ZOIA et al., 2004). DANIELE et al., 2012 demonstraram que pacientes com episódios de mania mostraram um aumento na captação de glutamato e diminuição na captação de GABA por plaquetas. De forma oposta, pacientes com episódios de depressão apresentaram um aumento na captação de GABA. FERRARESE et al., 2001 demonstraram uma redução na captação de glutamato por plaquetas em pacientes com doença de Parkinson, enquanto RAINESALO et al., 2003 realizaram um estudo em que pacientes com esclerose hipocampal e epilepsia mioclônica juvenil apresentaram níveis maiores de captação de glutamato por plaquetas. BOS et al., 2006 observaram que a atividade da enzima glutamina sintetase (E.C 6.3.1.2) está aumentada em plaquetas de pacientes com esclerose lateral amiotrófica, podendo indicar um aumento no metabolismo de glutamato necessário para a retirada desse aminoácido excitatório do sangue. Além

disso, em pacientes com enxaquecas com aura já se demonstrou um aumento de glutamato plaquetário (D'ANDREA et al., 1991).

No que diz respeito ao metabolismo do GABA, já foi demonstrado que plaquetas têm capacidade de captação de GABA dependente de sódio (HAMBLEY e JOHNSTON, 1985). Também se observou a presença da enzima GABA-transaminase (GABA-T) nessas células, sugerindo que a atividade desta enzima em plaquetas seja equivalente àquela cerebral (SHERIF, 1994). Alguns estudos indicam ainda que a atividade de GABA-T em plaquetas de pacientes com epilepsia está alterada (ARTEAGA et al., 1993). RAINESALO et al., 2003 mostraram não só uma menor captação de GABA por plaquetas de pacientes com síndrome epiléptica generalizada, epilepsia mioclônica juvenil e epilepsia refratária localizada como também um aumento na atividade de GABA-T.

Vindo de encontro com esse trabalho, plaquetas contêm BDNF estocado em seus grânulos (YAMAMOTO e GURNEY, 1990) e são capazes de liberá-lo quando estimuladas por agonistas (FUJIMURA et al., 2002). Assim, as plaquetas contribuem para os níveis de BDNF circulatório no plasma, o qual varia fisiologicamente conforme a idade, gênero e parâmetros físicos em adultos (LOMMATZSCH et al., 2005). A origem do BDNF encontrado no plasma ainda não é esclarecida, com hipóteses que sugerem o endotélio vascular e células musculares lisas como possíveis fontes (FUJIMURA et al., 2002). Uma vez que essa neurotrofina é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica em ambas as direções, uma parte substancial de BDNF poderia se originar de células neuronais e gliais do sistema nervoso central (PAN et al., 1998).

A função do BDNF no sangue periférico ainda é pouco esclarecida, porém alguns autores sugerem que essa neurotrofina possa se encontrar em maiores ou menores concentrações plasmáticas em determinada condição patológica ou no período em que o indivíduo esteja utilizando determinados fármacos. Por exemplo, já foi descrito menores concentrações de BDNF em plasma rico em plaquetas (PRP) de pacientes suicidas e não-suicidas diagnosticados com depressão maior (LEE e KIM, 2009) e que o tratamento com o antidepressivo sertralina aumenta a liberação de BDNF plaquetário e, por consequência, plasmático (WATANABE et al., 2010). Também se observou uma correlação significativa entre os níveis de BDNF e os índices na escala de

depressão, inclusive com autores sugerindo que esse fator neurotrófico possa servir de biomarcador para os estados de humor e para avaliação da progressão de distúrbios do humor, como depressão maior e distúrbio bipolar (BRUNONI et al., 2008; FERNANDES et al., 2011). Em pacientes com doença de Alzheimer já se descreveu a diminuição de BDNF no PRP (PLÁTENÍK et al., 2014) e que a velocidade de declínio cognitivo se mostrava menor conforme esses indivíduos apresentavam maiores concentrações de BDNF no soro (LASKE et al., 2011). O BDNF plaquetário também pode ser mobilizado por drogas neuropsiquiátricas, se observando aumento desse BDNF quando indivíduos depressivos são submetidos a tratamento com citalopram (SERRA-MILLÀS et al., 2011).

1.3 Riluzole

O riluzole (6-(trifluorometoxi)benzotiazol-2-amina) é uma droga utilizada para tratamento da esclerose lateral amiotrófica aprovada pela Administração de Alimentos e Drogas (*Food and Drug Administration*, FDA) desde 1995. Seu mecanismo de ação clássico descrito se dá através do bloqueio de canais de sódio voltagem-dependentes sensíveis a tetrodotoxina inativos em neurônios danificados, suprimindo o excesso de estimulação dos receptores glutamatérgicos e o massivo influxo de cálcio (SONG et al., 1997). Porém, desde sua descrição, tem se estudado a ação dessa droga sobre outros canais (AHN et al., 2005) e sobre o metabolismo glutamatérgico, diminuindo seus níveis extracelulares (DALL'IGNA et al., 2013).

O riluzole parece também estar envolvido no metabolismo de neurotrofinas, uma vez que ratos tratados com essa droga demonstraram aumento de BDNF no giro denteado hipocampal ao ativar a proteína p38 MAPK, presente na via de sinalização envolvida na produção dessa neurotrofina (KATOH-SEMBA et al., 2009). Já se comprovou o efeito do riluzole de reverter os baixos níveis de BDNF no hipocampo de ratos modelos para depressão induzida por corticosterona, refletindo a ação de antidepressivos clássicos, como sertralina (GOURLEY et al., 2012). O riluzole também promove a síntese de NGF e GDNF (fator neurotrófico de linhagem glial) além de BDNF em cultura de astrócitos de camundongos, através dos quais exerce seu efeito neuroprotetor (MIZUTA et al., 2001). No que refere a plaquetas, o riluzole foi testado em poucos trabalhos (CALCERRADA et al., 1999; KALEV-ZYLINSKA et al., 2014) e

com intuito de inibir a liberação de glutamato, em estudos que avaliavam a agregação plaquetária. Até a presente data não havia na literatura estudos que analisavam seu efeito em plaquetas na liberação de fatores neurotróficos, incluindo BDNF.

2. Hipótese

O riluzole, assim como em sua atuação neural, poderia exercer efeito na liberação de BDNF por plaquetas humanas *in vitro*, aumentando os níveis extracelulares dessa neurotrofina.

3. Objetivos

- Determinar os níveis basais de BDNF liberado por plaquetas de doadores nas condições experimentais.
- Verificar se o tratamento com riluzole afeta os níveis de BDNF liberado por plaquetas de doadores nas condições experimentais.

II. ARTIGO CIENTÍFICO

**RILUZOLE ESTIMULA A LIBERAÇÃO DE BDNF POR
PLAQUETAS HUMANAS *IN VITRO***

Patrick Türck^a p.turck@gmail.com

**^a Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmento Leite, 500. CEP 90050-
170, Porto Alegre, Brasil.**

Marcos Emílio Frizzo^a frizzo@ufrgs.br –Autor correspondente

**^a Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmento Leite, 500. CEP 90050-
170, Porto Alegre, Brasil.**

Resumo

O BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) apresenta diversas funções no sistema nervoso central, onde ele contribui para o desenvolvimento cerebral e sua funcionalidade, afetando a atividade e sobrevivência neuronal e também modulando os níveis de neurotransmissores. Essa neurotrofina é também encontrada no soro, porém sua origem e função periférica continuam desconhecidas. Apesar da fonte de BDNF circulante não estar claramente definida, ele é estocado em plaquetas e pode ser liberado por tratamentos farmacológicos. Níveis baixos de BDNF no soro têm sido relatados na patofisiologia da depressão e sua relação é reforçada pelo quadro oposto na condição de tratamento com antidepressivos.

Recentemente, o riluzole foi proposto para o tratamento da depressão, uma vez que essa droga é capaz de baixar os níveis de glutamato extracelular e aumentar a expressão de BDNF e ambos os mecanismos poderiam estar associados com sua ação antidepressiva. Considerando que o riluzole aumenta os níveis de BDNF no soro de pacientes, nós investigamos se o tratamento com essa droga poderia estimular a liberação dessa neurotrofina de plaquetas humanas obtidas de doadores saudáveis. Quando plaquetas foram incubadas com riluzole por 4h, o valor basal de BDNF ($92.9 \pm 11.1 \text{ pg } 10^{-6}$ plaquetas) foi significativamente aumentado ($p < 0.05$, $n = 27$). Esse efeito estimulatório foi obtido em baixas concentrações de riluzole (a partir de $10\mu\text{M}$) e não foi observado quando plaquetas foram incubadas com a droga por 24h. A ação direta do riluzole evocando a liberação de BDNF de plaquetas humanas em concentrações terapêuticas é importante e pode contribuir para o entendimento do seu mecanismo de ação no tratamento da depressão.

Introdução

O BDNF contribui para o desenvolvimento do cérebro [1,2] e está relacionado à sobrevivência e atividade neuronal uma vez que ele atua como modulador dos níveis de neurotransmissores e participa da plasticidade neuronal [3,4]. Nos humanos, macacos e ratos, o BDNF também é encontrado no soro em níveis significantes [5-7], porém a origem e a função dessa neurotrofina permanece desconhecida. Investigadores têm mencionado o cérebro como a fonte dessa neurotrofina circulante [8], apesar de já se ter demonstrado que o BDNF atravessa a barreira hematoencefálica em ambas as direções [9,10]. De fato, o BDNF pode ser originário de neurônios e células gliais [9,10], porém ele também é liberado em taxas significativas por outros tecidos periféricos, como diferentes epitélios, onde sua quantidade pode alcançar níveis acima daqueles encontrados no sistema nervoso central [11]. Outros exemplos da origem do BDNF não relacionada com o SNC são as células brancas [12-14] e plaquetas, essas últimas contendo quantidades significativas dessa proteína e podendo fornecer uma importante fonte dessa neurotrofina circulante [5]. Foi demonstrado que mais de 99% das proteínas do BDNF sanguíneo estão estocadas em plaquetas e podem ser liberadas no soro [6] através de tratamento farmacológico [15,16].

Estudos recentes têm reportado mudanças nos níveis de BDNF no soro de pacientes com doenças psiquiátricas [17-20], como a depressão maior [21]. A relação entre diminuição dos níveis de BDNF e a patofisiologia da depressão é sustentada por diversos trabalhos [21-25]. Pandey et al. [26] mostraram que a expressão gênica do BDNF em linfócitos e sua expressão proteica em plaquetas de pacientes adultos e pediátricos com depressão estavam significativamente diminuídas, com os autores propondo que isso poderia ser um alvo de drogas antidepressivas. De fato, alguns antidepressivos aumentam a expressão de BDNF [27] e também evocam a liberação de BDNF por plaquetas, de uma forma dose-dependente após tratamento direto *in vitro* [15]. A concentração de BDNF no soro aumenta após tratamento intravenoso com antidepressivo e o efeito dessas drogas na liberação de BDNF por plaquetas foi relacionado com o nível dessa neurotrofina no sangue periférico [15].

Recentemente, moduladores glutamatérgicos têm sido propostos como uma estratégia para o tratamento de transtornos de humor [28]. Entre essas drogas propostas está o riluzole (6-(trifluorometoxi)benzotiazol-2-amina), o qual foi originalmente

desenvolvido como um anticonvulsivante [29], porém tem sido usado em um grande número de ensaios para condições psiquiátricas nas quais o excesso de glutamato tem sido proposto como parte do mecanismo patológico [30-33]. Diferentes mecanismos de ação têm sido descritos para o riluzole [32], o que provavelmente explica seus complexos efeitos farmacológicos. Por exemplo, um efeito estimulatório na captação de glutamato foi observado em baixas concentrações de riluzole [34] e sua habilidade de para baixar os níveis extracelulares de glutamato foi sugerida como o mecanismo de ação antidepressivo, pelo menos parcialmente [32]. Tratamento com riluzole aumenta significativamente os níveis de BDNF no soro de pacientes [37]. Considerando que o BDNF no sangue é pensado como sendo originado de plaquetas e há sua evocação por drogas antidepressivas, decidimos investigar se o riluzole poderia estimular a liberação dessa neurotrofina por plaquetas humanas.

Material e Métodos

Doadores

Sangue foi coletado de 27 doadores saudáveis, masculinos, os quais não faziam uso de antibióticos, antidepressivos ou anticonvulsivantes, no Serviço de Hemoreterapia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. O projeto intitulado “Avaliação do efeito periférico de neurofármacos glutamatérgicos” foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEP-HCPA) e os doadores foram informados de sua participação através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, que se encontra em anexo.

Obtenção das Plaquetas

Duas amostras de sangue de 4 mL foram retiradas da veia cubital mediana de cada doador e estocadas em tubos à vácuo contendo K₃-EDTA (BD Franklin Lakes, EUA). Imediatamente, os tubos foram gentilmente invertidos 10 vezes e o sangue analisado no analisador hematológico ABX Micros ES 60 (HORIBA ABX SAS, Japão) para determinação do número de plaquetas em cada amostra. As plaquetas foram isoladas como previamente descrito por Mangano e Schwarcz [38]. Os tubos à vácuo foram centrifugados a 300 x g por 5 minutos a 4°C para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP). O sobrenadante (PRP) foi cuidadosamente removido com uma pipeta automática com o cuidado de não provocar nenhum distúrbio à camada de leucócitos logo abaixo. O volume de PRP coletado de cada amostra foi anotado e o PRP foi transferido para um tubo de microcentrífuga. O PRP foi então centrifugado a 7000 x g por 10 minutos a 4°C. O plasma foi descartado e o pellet ressuscitado em 0,5 mL de tampão fosfato sacarose 0,32 M (pH 7,4 a 4°C). A suspensão, daqui para frente referida como concentrado de plaquetas (CP) foi repetidamente passada através de uma ponteira de plástico de 1 mL até eliminação de agregados plaquetários. Adicionalmente foram pipetados 0,5 mL de tampão fosfato sacarose à suspensão e a solução foi misturada com 5 gentis inversões do tubo de microcentrífuga. O CP foi novamente centrifugado a 7000 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em um volume de tampão fosfato sacarose (pH 7,4 a 4°C) igual a um quinto do volume inicial

de PRP obtido. Após, as duas suspensões obtidas de cada doador foram juntadas e o número de plaquetas foi novamente determinado.

Como descrito anteriormente por nosso grupo, as plaquetas necessitam ser contadas no CP após sua lavagem [39]. O volume médio plaquetário (MPV) e a amplitude de distribuição plaquetária (PDW) também foram determinados tanto no sangue total quanto no CP para avaliação de variações potenciais nas plaquetas durante o processamento. A incubação das plaquetas foi realizada em uma placa de 96 poços e a cada poço foram adicionadas 20×10^6 plaquetas em 130 μL de tampão Tris-citrato (112,8 mM NaCl, 4,5 mM KCl, 1,1 mM KH_2PO_4 , 1,1 mM MgSO_4 , 11 mM Na_3 -citrato, 25 mM Tris-HCl e 10,2 mM de glicose) pH 6,5. As drogas foram diluídas em tampão Tris-citrato e o volume final em cada poço foi de 150 μL .

Quantificação do BDNF

Os níveis de BDNF extracelulares foram quantificados utilizando o kit ELISA Sandwich ChemiKine™ Brain Derived Neurotrophic Factor (Millipore, EUA) seguindo as orientações do fabricante. Todas as quantificações foram realizadas em triplicatas em placas de 96 poços e uma curva padrão foi realizada para cada experimento. Amostras do sobrenadante das plaquetas incubadas foram retiradas e diluídas 1:16 em tampão fosfato (pH 7,4) para a quantificação de BDNF. O conteúdo de BDNF plaquetário foi calculado dividindo-se o resultado de BDNF obtido pela contagem total de plaquetas do mesmo indivíduo, e foi expresso como pg BDNF 10^{-6} plaquetas. A densidade óptica de cada poço foi medida utilizando-se um leitor de microplacas (EZ Read 400, Biochrom, Reino Unido) ajustado para 450nm. A sensibilidade do kit é de 7,8 pg BDNF mL^{-1} e não há reação cruzada com outros membros da família de fatores de crescimento nervoso.

Ensaio MTT

O ensaio de MTT foi realizado para determinar o efeito do riluzole ou sertralina sobre a viabilidade plaquetária após 4h e 24h de exposição às drogas. Para períodos curtos (4h), 20 μL de MTT (5 mg mL^{-1}) foram adicionados a cada poço no momento de

plaqueamento das plaquetas, mantidas em temperatura ambiente por 4h. Para períodos longos de incubação (24h), 20 μL de MTT (5 mg mL^{-1}) foram adicionados a cada poço 20h após plaqueamento, e as células foram mantidas 4h adicionais à temperatura ambiente. Subsequentemente, 150 μL de DMSO foram adicionados para a dissolução do formazan, o qual foi detectado utilizando-se um leitor de microplacas (EZ Read 400, Biochrom, Reino Unido). A absorção foi lida a 570nm e o valor obtido (UAbs) foi dividido pelo número de plaquetas e expresso como UAbs 20×10^{-6} plaquetas.

Estatística

Os valores são apresentados como média \pm EPM e a análise estatística foi realizada utilizando-se o software SPSS. Os dados tiveram distribuição normal, conforme determinado pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk e foram analisados através de um teste ANOVA de uma via (para BDNF) e ANOVA de duas vias (para MTT) seguidos pelo teste de Tukey para múltiplas comparações (alfa 0,05).

Resultados

Lavados plaquetários foram utilizados para analisar se o riluzole poderia estimular a liberação de BDNF atuando diretamente sobre essas células. Parâmetros plaquetários (números de células, volume médio plaquetário e amplitude de distribuição plaquetária) foram analisados no sangue total e após a obtenção do concentrado plaquetário, para avaliação se esses parâmetros variavam por conta do processamento. O número de plaquetas quantificado em cada CP foi utilizado para normalizar a quantidade de BDNF em cada respectivo experimento. Nossos dados mostraram que a contagem de plaquetas precisa ser determinada no CP após sua obtenção, uma vez que há redução do número de células durante o processamento (rendimento de $42 \pm 8\%$). A análise do CP demonstrou a ausência de células contaminantes e, apesar da perda de plaquetas, os índices de MPV e PDW não se modificaram após obtenção das células. Os índices de MPV e PDW no sangue total foram $8,1 \pm 0,6 \mu\text{m}^3$ e $14,9 \pm 1,0\%$, respectivamente. Quando comparados com o CP, não observamos diferenças significativas para os índices de MPV e PDW, os quais mostraram valores de $8,2 \pm 0,6 \mu\text{m}^3$ e $14,9 \pm 1,0\%$, respectivamente. Em nossa análise, o número de plaquetas no CP foi de $1545 \pm 338 \times 10^3 \text{ mm}^{-3}$.

Em nossas condições experimentais, os valores basais de BDNF liberado pelas plaquetas dos doadores foram de 9,0 a 220,2 pg 10^{-6} plaquetas. A ampla distribuição do BDNF quantificado no grupo de estudo é representada na Figura 1. Dada a recente evidência de que o tratamento com riluzole causa um aumento de BDNF no soro de pacientes (Squitieri F et al, 2009), o efeito dessa droga na liberação de BDNF por plaquetas foi testado. Plaquetas de voluntários saudáveis foram tratadas com diferentes concentrações de riluzole por 4h e 24h à temperatura ambiente. Quando plaquetas foram incubadas com riluzole por 4h, o valor basal de BDNF comparado com os controles ($92,9 \pm 11,1 \text{ pg } 10^{-6}$ plaquetas) se mostrou significativamente elevado ($p < 0,05$). Mesmo para plaquetas de doadores que apresentavam baixo nível basal de BDNF, o tratamento com riluzole estimulou a liberação dessa neurotrofina. O aumento mediado pelo riluzole foi significativo a partir de $10 \mu\text{M}$ (15%) sendo mantido elevado para $40 \mu\text{M}$ (22%) e $100 \mu\text{M}$ (20%). Também foi estudado o efeito de $1 \mu\text{M}$ de riluzole, concentração em que o nível de BDNF não diferiu do controle (Figura 2).

O efeito do riluzole na liberação de BDNF determinado em nosso modelo foi reprodutível em repetidos experimentos, mesmo que variando de indivíduo para indivíduo. Considerando a variabilidade no nível basal de BDNF entre diferentes doadores (Figura 1), em cada conjunto de experimentos o efeito da droga foi comparado com seu respectivo controle. Sertralina também foi utilizada (0,3 μ M) como controle positivo, tendo em vista que recentemente foi reportado seu efeito indutor na liberação de BDNF por plaquetas [15]. Porém, ao contrário das expectativas, em nossos experimentos a sertralina não estimulou significativamente a liberação de BDNF.

O aumento na liberação de BDNF evocado por riluzole não foi observado quando plaquetas foram incubadas por 24h com a droga. Para determinar se a viabilidade das plaquetas foi afetada pelo riluzole durante a exposição à droga, nós utilizamos o ensaio de MTT. Assim, a atividade de enzimas oxidoredutases NAD(P)H-dependentes foi avaliada após 4h e 24h de incubação. A viabilidade de plaquetas não tratadas não diferiu significativamente após os períodos de incubação, apesar de uma leve redução na produção de formazan após 24h (Figura 3).

Discussão

Nós avaliamos os parâmetros plaquetários MPV e PDW, uma vez que esses índices têm sido correlacionados com a função plaquetária [40]. MPV é uma medida que é comumente usada para descrever o tamanho da plaqueta, sendo um indicador da ativação das plaquetas [41,42], enquanto PDW representa a faixa de variabilidade do volume plaquetário [43]. Levando em consideração que tanto MPV quanto PDW não mudaram antes da obtenção das plaquetas e após seu processamento, podemos dizer que as células utilizadas nesses estudos não estavam ativadas no momento de exposição ao riluzole. De forma importante, não selecionamos uma subpopulação dessas células, já que não houve diferença significativa nos valores de PDW. Outro ponto importante é que nosso protocolo utilizou apenas plaquetas e, conseqüentemente, o BDNF quantificado não pode ser atribuído a células contaminantes, como leucócitos.

Em nosso estudo, observamos uma ação direta do riluzole, evocando a liberação de BDNF de plaquetas humanas. O efeito estimulatório foi atingido em baixas concentrações (desde 10 μ M), o que pode ser uma informação importante no estudo clínico do riluzole. Apesar desse aumento não ser tão grande como demonstrado para outro antidepressivo [15], o efeito estimulatório foi reproduzível quando comparado com seus respectivos controles, mesmo havendo variações entre diferentes doadores. A ausência de efeito estimulatório com sertralina na liberação de BDNF talvez possa ser devido ao uso de células humanas, já que Watanabe et al. [15] utilizaram plaquetas de ratos em seu estudo. Infelizmente, Watanabe e os coautores não reportaram os níveis basais de BDNF obtidos, o que possibilitaria uma comparação com nossos dados.

O riluzole evocou um efeito agudo sobre as plaquetas, o qual não foi observado após maiores tempos de incubação. A liberação de BDNF em resposta ao riluzole de forma aguda (4h) e não em 24h sugere que seu efeito deriva de uma evocação de neurotrofina já presente nas plaquetas, e não está relacionado ao efeito estimulatório sobre a síntese de neurotrofina. Essa informação vai de encontro com dados mostrando que a expressão de mRNA de BDNF em plaquetas humanas é extremamente baixa [5,10].

A descoberta de que o riluzole causa a liberação de BDNF de plaquetas humanas é importante, uma vez que essa situação pode ocorrer periféricamente e também em regiões profundas do sistema nervoso central, onde plaquetas e astrócitos estão muito

próximos e onde essa neurotrofina é capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica. Além das consequências periféricas dessa liberação mediada por riluzole, os efeitos dessa neurotrofina no sistema nervoso central podem ser complexos e significantes, especialmente no que se refere ao sistema glutamatérgico. Foi demonstrado que o BDNF exerce efeitos agudos na transmissão sináptica glutamatérgica e na plasticidade, como por exemplo ao fortificar a transmissão sináptica excitatória através de mecanismos pré e pós-sinápticos [44]. Por outro lado, seu efeito estimulatório na expressão de transportadores de glutamato astrogliais e a consequente capacidade de captação de glutamato também foi descrita [45]. Mais recentemente, foi demonstrado que o BDNF regula positivamente a expressão proteica de transportadores vesiculares de glutamato (VGLUT1 e VGLUT2) em neurônios hipocampais [46], o que reforça a participação do BDNF como um modulador da sinapse glutamatérgica.

Clinicamente, o riluzole tem sido usado em ensaios para condições psiquiátricas onde o glutamato em excesso é proposto como parte do mecanismo patológico [47]. Também se sugere que o riluzole tenha efeitos antidepressivos e ansiolíticos no tratamento de depressão refratária [32]. Seu efeito nessas condições é associado com a habilidade de reduzir os níveis extracelulares de glutamato e também pode envolver sua ação estimulatória na expressão de BDNF [32]. Portanto, a demonstração de que o riluzole em baixas concentrações causa a liberação de BDNF é significativa *in vivo* e mostra a importância de estudar plaquetas de pacientes sob o tratamento dessa droga.

Conclusão

O novo efeito descrito para o riluzole pode contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos com sua ação terapêutica, reforçando a sugestão para seu uso na psiquiatria, como por exemplo no tratamento da depressão.

Tabelas e Figuras

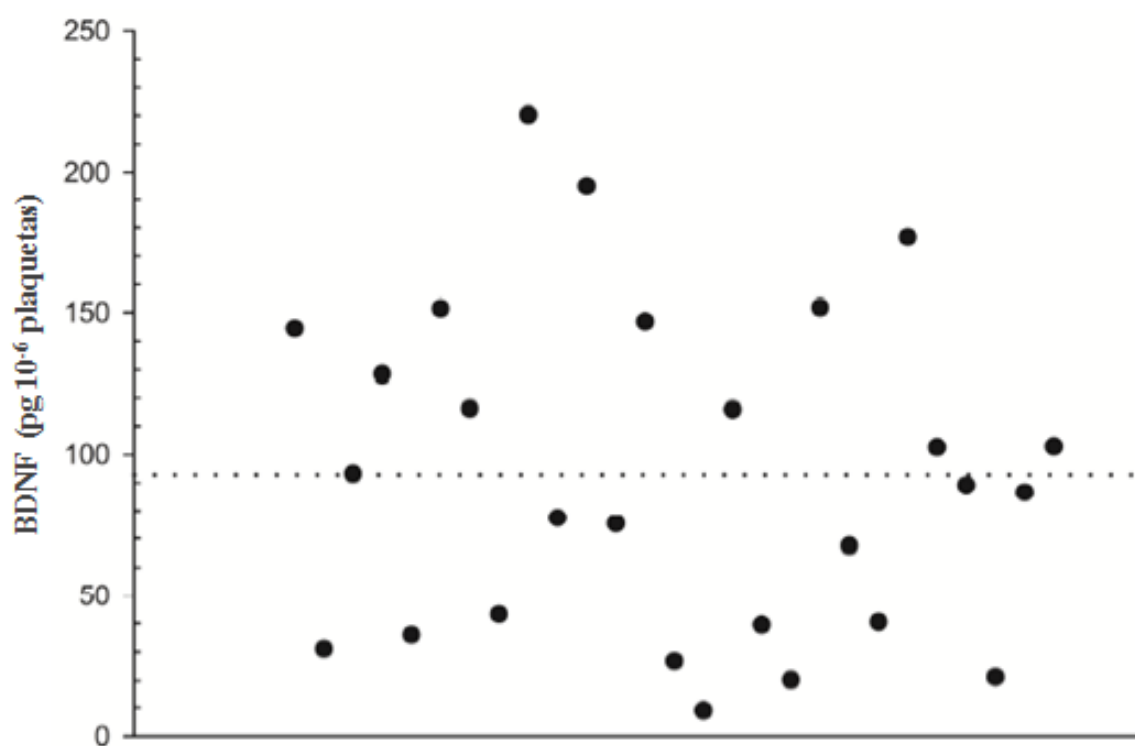


Figura 1. Gráfico de distribuição da liberação de BDNF por plaquetas humanas. A média dos valores de BDNF (92.9 ± 11.1 pg 10^{-6} platelets) é indicada pela barra pontilhada ($n=27$).

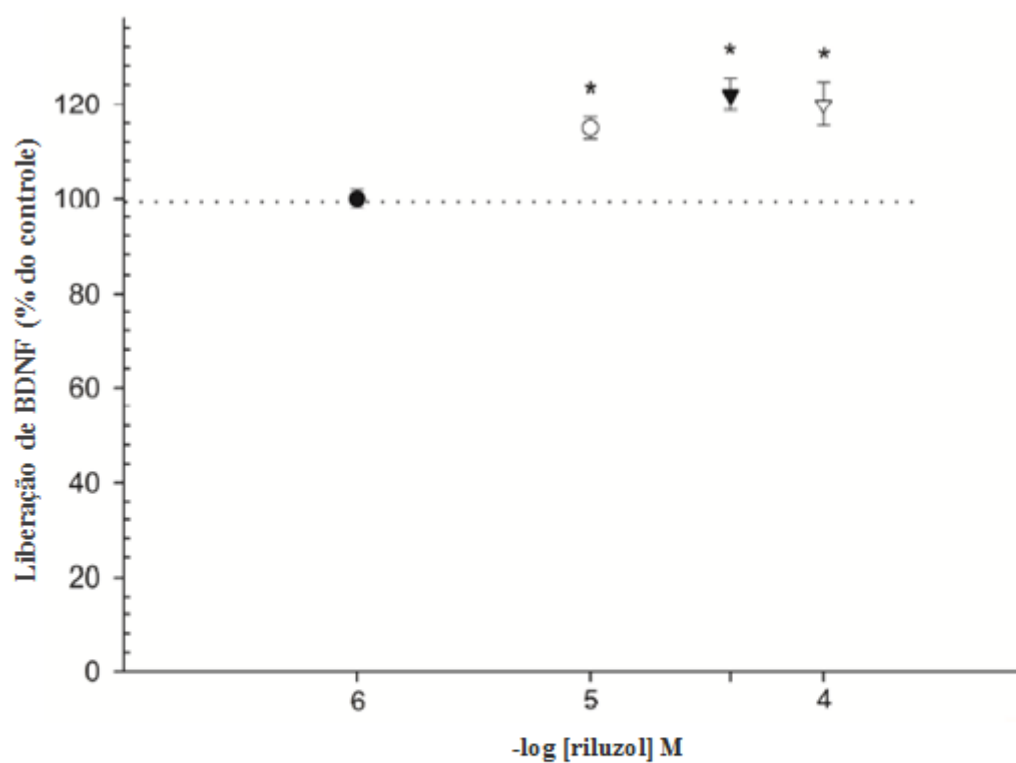


Figura 2. Efeito estimulatório do riluzol na liberação de BDNF. Plaquetas obtidas de doadores saudáveis foram incubadas com diferentes concentrações de riluzol (1, 10, 40 ou 100 μM) por 4 horas. O controle está representado pela barra pontilhada. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. *Diferente do controle (n=27).

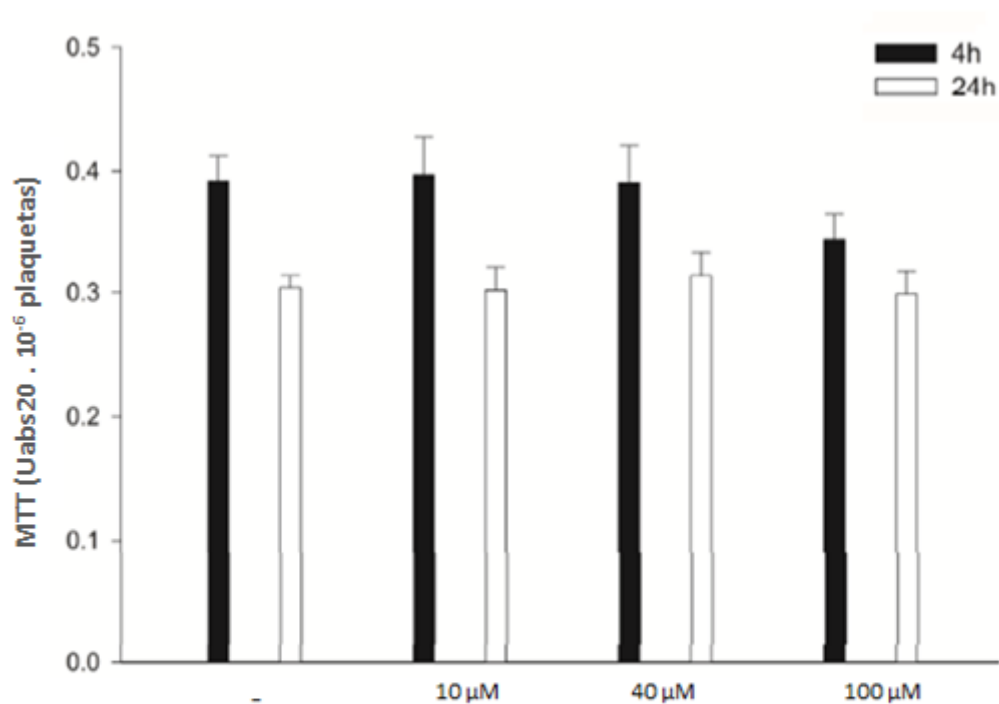


Figura 3. Viabilidade plaquetária durante o período de incubação. O efeito de diferentes concentrações do riluzol sobre a viabilidade plaquetária foi determinado após 4h e 24h de incubação. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (n=27).

Referências

- [1] G.R. Lewin, Y.A. Barde, Physiology of the neurotrophins, *Annu. Rev. Neurosci.* 19 (1996) 289-317.
- [2] S.D. Croll, N.Y. Ip, R.M. Lindsay, S.J. Wiegand, Expression of BDNF and trkB as a function of age and cognitive performance, *Brain Res.* 812 (1998) 200-8.
- [3] E. Castrén, M. Pitkänen, J. Sirviö, A. Parsadanian, D. Lindholm, H. Thoenen, P.J. Riekkinen, The induction of LTP increases BDNF and NGF mRNA but decreases NT-3 mRNA in the dentate gyrus, *Neuroreport.* 4 (1993) 895-8.
- [4] J.L. Jankowsky, P.H. Patterson, Cytokine and growth factor involvement in longterm potentiation, *Mol. Cell. Neurosci.* 14 (1999) 273-86.
- [5] H. Yamamoto, M.E. Gurney, Human platelets contain brain-derived neurotrophic factor, *J. Neurosci.* 10 (1990) 3469-78.
- [6] S.F. Radka, P.A. Holst, M. Fritsche, C.A. Altar, Presence of brain-derived neurotrophic factor in brain and human and rat but not mouse serum detected by a sensitive and specific immunoassay, *Brain Res.* 709 (1996) 122-301.
- [7] T. Mori, K. Shimizu, M. Hayashi, Levels of serum brain-derived neurotrophic factor in primates, *Primates.* 44 (2003) 167-9.
- [8] R. Katoh-Semba, R. Wakako, T. Komori, H. Shigemi, N. Miyazaki, H. Ito, T. Kumagai, M. Tsuzuki, K. Shigemi, F. Yoshida, A. Nakayama, Age-related changes in BDNF protein levels in human serum: differences between autism cases and normal controls, *Int. J. Dev. Neurosci.* 25 (2007) 367-72.
- [9] W. Pan, W.A. Banks, M.B. Fasold, J. Bluth, A.J. Kastin, Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier, *Neuropharmacology.* 37 (1998) 1553-61.
- [10] F. Karege, M. Schwald, M. Cisse, Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets, *Neurosci.Lett.* 328 (2002a) 261-4.
- [11] M. Lommatzsch, A. Braun, A. Mannsfeldt, V.A. Botchkarev, N.V. Botchkareva, R. Paus, A. Fischer, G.R. Lewin, H. Renz, Abundant Production of Brain-Derived Neurotrophic Factor by Adult Visceral Epithelia. Implications for Paracrine and Target-Derived Neurotrophic Functions, *Am. J. Pathol.* 155 (1999) 1183-1193.
- [12] A. Braun, M. Lommatzsch, A. Mannsfeldt, U. Neuhaus-Steinmetz, A. Fischer, N. Schnoy, G.R. Lewin, H. Renz, Cellular sources of enhanced brain-derived neurotrophic factor production in a mouse model of allergic inflammation, *Am. J. Respir. Cell.Mol. Biol.* 21 (1999) 537-46.
- [13] A. Gielen, M. Khademi, S. Muhallab, T. Olsson, F. Piehl, Increased brain-derived neurotrophic factor expression in white blood cells of relapsing-remitting multiple sclerosis patients, *Scand. J. Immunol.* 57 (2003) 493-7.

- [14] M. Kerschensteiner, E. Gallmeier, L. Behrens, V.V. Leal, T. Misgeld, W.E. Klinkert, R. Kolbeck, E. Hoppe, R.L. Oropenza-Wekerle, C. Stadelmann, H.Lassmann, H. Wekerle, R. Hohlfeld, Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation?, *J. Exp. Med.* 189 (1999) 865-70.
- [15] K. Watanabe, E. Hashimoto, W. Ukai, T. Ishii, T. Yoshinaga, T. Ono, M. Tateno, I. Watanabe, T. Shirasaka, S. Saito, T. Saito, Effect of antidepressants on brain-derived neurotrophic factor (BDNF) release from platelets in the rats, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 34 (2010) 1450-4.
- [16] P. Stoll, A. Plessow, K. Bratke, J.C. Virchow, M. Lommatzsch, Differential effect of clopidogrel and aspirin on the release of BDNF from platelets, *J. Neuroimmunol.* 238 (2011) 104-6.
- [17] K. Toyooka, K. Asama, Y. Watanabe, T. Muratake, M. Takahashi, T. Someya, H. Nawa, Decreased levels of brain-derived neurotrophic factor in serum of chronic schizophrenic patients, *Psychiatry Res.* 110 (2002) 249-57.
- [18] K.B. Nelson, J.K. Grether, J.M. Dambrosia, B.F. Dickens, L.L. Jelliffe, R.L. Hansen, T.M. Phillips, Neuropeptides and neurotrophins in neonatal blood of children with autism or mental retardation, *Ann. Neurol.* 49 (2001) 597-606.
- [19] K. Miyazaki, N. Narita, R. Sakuta, T. Miyahara, H. Naruse, N. Okado, M. Narita, Serum neurotrophin concentrations in autism and mental retardation: a pilot study, *Brain. Dev.* 26 (2004) 292-5.
- [20] K. Hashimoto, Y. Iwata, K. Nakamura, M. Tsujii, K.J. Tsuchiya, Y. Sekine, K. Suzuki, Y. Minabe, N. Takei, M. Iyo, N. Mori, Reduced serum levels of brain derived neurotrophic factor in adult male patients with autism, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 30 (2006) 1529-31.
- [21] E. Shimizu, K. Hashimoto, N. Okamura, K. Koike, N. Komatsu, C. Kumakiri, M. Nakazato, H. Watanabe, N. Shinoda, S. Okada, M. Yio, Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants, *Biol. Psychiatry.* 54 (2003) 70-5.
- [22] F. Karege, G. Perret, G. Bondolfi, M. Schwald, G. Bertschy, J.M. Aubry, Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients, *Psychiatry. Res.* 109 (2002b) 143-8.
- [23] F. Karege, G. Bondolfi, N. Gervasoni, M. Schwald, J.M. Aubry, G. Bertschy, Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity, *Biol. Psychiatry.* 57 (2005) 1068-72.
- [24] A.B. Cunha, B.N. Frey, A.C. Andreazza, J.D. Goi, A.R. Rosa, C.A. Gonçalves, A. Santin, F. Kapczinski, Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes, *Neurosci. Lett.* 398 (2006) 215-9.

- [25] R. Machado-Vieira, M.O. Dietrich, R. Leke, V.H. Cereser, V. Zanatto, F. Kapczinski, D.O. Souza, L.V. Portela, V. Gentil, Decreased plasma brain derived neurotrophic factor levels in unmedicated bipolar patients during manic episode, *Biol. Psychiatry*. 61 (2007) 142-4.
- [26] G.N. Pandey, Y. Dwivedi, H.S. Rizavi, X. Ren, H. Zhang, M.N. Pavuluri, Brain derived neurotrophic factor gene and protein expression in pediatric and adult depressed subjects, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 34 (2010) 645-51.
- [27] C. Pittenger, R.S. Duman, Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms, *Neuropsychopharmacology*. 33 (2008) 88-109.
- [28] C. Zarate Jr., R. Machado-Vieira, I. Henter, L. Ibrahim, N. Diazgranados, G. Salvadore, Glutamatergic modulators: the future of treating mood disorders?, *Harv. Rev. Psychiatry*. 18 (2010) 293-303.
- [29] J. Mizoule, B. Meldrum, M. Mazadier, M. Croucher, C. Ollat, A. Uzan, J.J. Legrand, C. Gueremy, G. Le Fur, 2-Amino-6-trifluoromethoxy benzothiazole, a possible antagonist of excitatory amino acid neurotransmission. I. Anticonvulsant properties, *Neuropharmacology* 24(1985) 767-73.
- [30] S.J. Mathew, K. Keegan, L. Smith, Glutamate modulators as novel interventions for mood disorders, *Rev. Bras. Psiquiatr*. 27 (2005) 243-8.
- [31] S.J. Mathew, J.W. Murrough, M. aan het Rot, K.A. Collins, D.L. Reich, D.S. Charney, Riluzole for relapse prevention following intravenous ketamine in treatment-resistant depression: a pilot randomized, placebo-controlled continuation trial, *Int. J. Neuropsychopharmacol*. 13 (2010) 71-82.
- [32] G. Sanacora, S.F. Kendell, Y. Levin, A.A. Simen, L.R. Fenton, V. Coric, J.H. Krystal, Preliminary evidence of riluzole efficacy in antidepressant-treated patients with residual depressive symptoms, *Biol. Psychiatry*. 61 (2007) 822-5.
- [33] C.A. Jr. Zarate, J.L. Payne, J. Quiroz, J. Sporn, K.K. Denikoff, D. Luckenbaugh, D.S. Charney, H.K. Manji, An open-label trial of riluzole in patients with treatment-resistant major depression, *Am. J. Psychiatry*. 161 (2004) 171-4.
- [34] M.E. Frizzo, L.P. Dall'Onder, K.B. Dalcin, D.O. Souza, Riluzole enhances glutamate uptake in rat astrocyte cultures, *Cell. Mol. Neurobiol*. 24 (2004) 123-8.
- [35] R. Katoh-Semba, T. Asano, H. Ueda, R. Morishita, I.K. Takeuchi, Y. Inaguma, K. Kato, Riluzole enhances expression of brain-derived neurotrophic factor with consequent proliferation of granule precursor cells in the rat hippocampus, *FASEB J*. 16 (2002) 1328-30.
- [36] I. Mizuta, M. Ohta, K. Ohta, M. Nishimura, E. Mizuta, S. Kuno, Riluzole stimulates nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor synthesis in cultured mouse astrocytes, *Neurosci. Lett*. 310 (2001) 117-20.

- [37] F. Squitieri, S. Orobello, M. Cannella, T. Martino, P. Romanelli, G. Giovacchini, L. Frati, L. Mansi, A. Ciarmiello, Riluzole protects Huntington disease patients from brain glucose hypometabolism and grey matter volume loss and increases production of neurotrophins, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 36 (2009) 1113-20.
- [38] R.M. Mangano, R. Schwarcz, The human platelet as a model for the glutamatergic neuron: platelet uptake of L-glutamate, *J. Neurochem.* 36 (1981) 1067-76.
- [39] D.S. Rocha, S.K. Souza, T.G.H. Onsten, R.S.M. Silva, M.E. Frizzo, A Simple Method to Quantify Glycogen from Human Platelets, *J. Cytol. Histol.*5:217(2014) <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7099.1000217>.
- [40] Q. Niu, R. Zhang, M. Zhao, S. Zeng, X. Huang, H. Jiang, Y. An, L. Zhang, Differences in platelet indices between healthy Han population and Tibetans in China, *PLoS One.* 8 (2013) e67203.doi: 10.1371/journal.pone.0067203. Print 2013.
- [41] A. Arikanoğlu, Y. Yucel, A. Acar, M.U. Cevik, E. Akil, S. Varol, The relationship of the mean platelet volume and C-reactive protein levels with mortality in ischemic stroke patients, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 17 (2013) 1774-7.
- [42] G. De Luca, G.G. Secco, M. Verdoia, E. Casetti, A. Schaffer, L. Coppo, P. Marino, Combination between mean platelet volume and platelet distribution width to predict the prevalence and extent of coronary artery disease: results from a large cohort study, *Blood Coagul. Fibrinolysis* 25 (2014) 86-91.
- [43] R. Ozdemir, C. Karadeniz, O. Doksoz, M. Celegen, Y. Yozgat, B. Guven, T. Mese, N. Unal, Are mean platelet volume and platelet distribution width useful parameters in children with acute rheumatic carditis? *Pediatr. Cardiol.*(2014) 35 53-6.
- [44] J.L. Martin, C. Finsterwald, Cooperation between BDNF and glutamate in the regulation of synaptic transmission and neuronal development, *Commun. Integr. Biol.* 4 (2011) 14-6.
- [45] A. Rodriguez-Kern, M. Gegelashvili, A. Schousboe, J. Zhang, L. Sung, G. Gegelashvili, Beta-amyloid and brain-derived neurotrophic factor, BDNF, upregulate the expression of glutamate transporter GLT-1/EAAT2 via different signaling pathways utilizing transcription factor NF-kappaB, *Neurochem. Int.* 43 (2003) 363-70.
- [46] C.V. Melo, M. Mele, M. Curcio, D. Comprimido, C.G. Silva, C.B. Duarte, BDNF regulates the expression and distribution of vesicular glutamate transporters in cultured hippocampal neurons, *PLoS One.* 8 (2013) e53793.doi: 10.1371/journal.pone.0053793. Epub 2013.
- [47] P. Grant, J.Y. Song, S.E. Swedo, Review of the use of the glutamate antagonist riluzole in psychiatric disorders and a description of recent use in childhood obsessive compulsive disorder, *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.*20 (2010) 309-15.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Nesse trabalho, demonstramos que plaquetas humanas liberam BDNF quando tratadas *in vitro* com o fármaco riluzole em concentrações terapêuticas. Uma vez que o BDNF está envolvido em diversos processos cognitivos e mudanças em seus níveis já foram correlacionadas com diversas patologias, o estudo de fármacos que podem modificar os níveis circulantes dessa neurotrofina ao atuarem sobre células periféricas tem grande relevância. Sendo as plaquetas a principal fonte do BDNF no soro, estudar a liberação desse fator trófico por essas células e verificar modulação dessa liberação por fármacos comerciais pode abrir caminho para se entender de forma mais ampla o mecanismo de ação de determinadas drogas. O riluzole, proposto como antidepressivo, atua sobre plaquetas e aumenta a liberação de BDNF extracelular, o que talvez explique em parte os efeitos desse fármaco como possível droga no tratamento da depressão.

Entre as perspectivas, está o entendimento do processo de liberação do BDNF por plaquetas, como, por exemplo, em que receptores a droga está atuando e como ocorre a saída de BDNF dessas células. Pode-se, inclusive, avaliar a liberação de aminoácidos excitatórios e inibitórios, tentando correlacionar mudanças nos níveis desses aminoácidos com os resultados já encontrados para BDNF, em se tratando da exposição das plaquetas ao riluzole (trabalho que já está em andamento no grupo). Assim, há um grande conjunto de possibilidades que podemos explorar, incluindo outras drogas, para melhor entendermos a fisiologia das plaquetas e também o mecanismo de ação de fármacos.

BIBLIOGRAFIA ADICIONAL

- ACHESON A.; CONOVER J.C.; FANDL J.P.; DECHIARA T.M.; RUSSELL M.; THADANI A.; SQUINTO S.P.; YANCOPOULOS G.D.; LINDSAY R.M. A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature*. 1995;374:450–453.
- AHN H.S.; CHOI J.S.; CHOI B.H.; KIM M.J.; RHIE D.J.; YOON S.H.; JO Y.H.; KIM M.S.; SUNG K.W.; HAHN S.J. Inhibition of the cloned delayed rectifier K⁺ channels, Kv1.5 and Kv3.1, by riluzole. *Neurosci* 2005;133:1007–1019.
- ARTEAGA R.; HERRANZ J.L.; ARMIJO J.A. Platelet GABA-transaminase in epileptic children: influence of epilepsy and anticonvulsants. *Epilepsy Res*. 1993 Jan;14(1):73-85.
- BARBEAU A.; CAMPANELLA G.; BUTTERWORTH R.F.; YAMADA K. Uptake and efflux of 14-C-dopamine in platelets: evidence for a generalized defect in Parkinson's disease. *Neurology*. 1975 Jan;25(1):1-9.
- BARDE Y.A.; EDGAR D.; THOENEN H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J*. 1982;1:549–553
- BINDER D.K.; SCHARFMAN H.E. Brain-derived Neurotrophic Factor. *Growth Factors*. 2004 Sep;22(3):123-31.
- BRUNONI A.R.; LOPES M.; FREGNI F. A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2008; 11 (8):1169–1180.
- BOS I.W.; HOOGLAND G.; MEINE JANSEN C.F.; WILLIGEN Gv.; SPIERENBURG H.A.; VAN DEN BERG L.H.; DE GRAAN P.N. Increased glutamine synthetase but normal EAAT2 expression in platelets of ALS patients. *Neurochem Int*. 2006 Mar;48(4):306-11. Epub 2006 Jan 19.
- BUTLER J.; LEONARD B.E. The platelet serotonergic system in depression and following sertraline treatment. *Int Clin Psychopharmacol*. 1988 Oct;3(4):343-7.
- CALCERRADA M.C.; CATALÁN R.E.; MARTÍNEZ A.M. Glutamate release is involved in PAF-increased cyclic GMP levels in hippocampus. *Biochem Mol Biol Int*. 1999 Mar;47(3):529-35.
- CHAO M.V.; BOTHWELL M. Neurotrophins: to cleave or not to cleave. *Neuron*. 2002;33:9–12.
- CHEN B.; DOWLATSHAHI D.; MACQUEEN G.M.; WANG J.F.; YOUNG L.T. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry*. 2001;50:260–265.
- COSGAYA J. M., CHAN J. R.; Shooter E. M. The neurotrophin receptor p75^{NTR} as a positive modulator of myelination. *Science* 2002;298:1245–1248

DA PRADA M.; CESURA A.M.; LAUNAY J.M.; RICHARDS J.G.; Platelets as a model for neurones? *Experientia*. 1988 Feb 15;44(2):115-26.

D'ANDREA G.; CANANZI A.R.; JOSEPH R.; MORRA M.; ZAMBERLAN F.; FERRO MILONE F.; GRUNFELD S.; Welch K.M. Platelet glycine, glutamate and aspartate in primary headache. *Cephalalgia*. 1991 Sep;11(4):197-200.

DALL'IGNA O.P.; BOBERMIN L.D.; SOUZA D.O.; QUINCOZES-SANTOS A. Riluzole increases glutamate uptake by cultured C6 astroglial cells. *Int J Dev Neurosci*. 2013 Nov;31(7):482-6.

DANIELE S.; DA POZZO E.; ABELLI M.; PANIGHINI A.; PINI S.; GESI C.; LARI L.; CARDINI A.; CASSANO G.B.; MARTINI C. Platelet uptake of GABA and glutamate in patients with bipolar disorder, *Bipolar Disord*. 2012 May; 14(3):301-8. No prelo.

ERNFORS P.; BENGZON J.; KOKAIA Z.; PERSSON H.; LINDVALL O. Increased levels of messenger RNAs for neurotrophic factors in the brain during kindling epileptogenesis. *Neuron*. 1991;7:165–176.

FERNANDES B.S.; GAMA C.S.; CERESÉR K.M.; YATHAM L.N.; FRIES G.R.; COLPO G. Brain-derived neurotrophic factor as a state-marker of mood episodes in bipolar disorders: a systematic review and meta-regression analysis. *J Psychiatr Res*, 2011; 45 (8):995–1004.

FERRARESE C.; TREMOLIZZO L.; RIGOLDI M.; SALA G.; BEGNI B.; BRIGHINA L.; RICCI G.; ALBIZZATI M.G.; PIOLTI R.; CROSTI F.; DALPRÀ L.; FRATTOLA L. Decreased platelet glutamate uptake and genetic risk factors in patients with Parkinson's disease, *Neurol Sci*. 2001 Feb;22(1):65-6.

FRANCONI F.; MICELI M.; DE MONTIS M.G.; CRISAFI E.L.; BENNARDINI F.; TAGLIAMONTE A. NMDA receptors play an anti-aggregating role in human platelets. *ThrombHaemost*. 1996 Jul;76(1):84-7.

FUJIMURA H.; ALTAR C.A.; CHEN R.; NAKAMURA T.; TAKAHASHI T.; KAMBAYASHI J.. Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. *Thromb.Haemost*, 2002; 87 (4):728–734.

GASIC G.J.; GASIC T.B.; STEWART C.C.; Antimetastatic effects associated with platelet reduction. *ProcNatAcadSci U S A*. 1968 Sep;61(1):46-52.

GOURLEY S.L.; ESPITIA J.W.; SANACORA G.; TAYLOR J.R. Antidepressant-like properties of oral riluzole and utility of incentive disengagement models of depression in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2012 Feb;219(3):805-14.

GURGUIS, G.N.M. *Psychiatric Disorders*. In: MICHELSON, Alan D. *Platelets*. Boston: Elsevier, 2006. p. 791-821.

HALL J.; THOMAS K.L.; EVERITT B.J. Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nat Neurosci.* 2000;3:533–535.

HALLBOOK F.; IBANEZ C.F.; PERSSON H. Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron.* 1991;6:845–858.

HAMBLEY J.W.; JOHNSTON G.A. Uptake of gamma-aminobutyric acid by human blood platelets: comparison with CNS uptake. *Life Sci.* 1985 May 27;36(21):2053–62.

HOWELLS D.W.; PORRITT M.J.; WONG J.Y.; BATCHELOR P.E.; KALNINS R.; HUGHES A.J.; DONNAN G.A. Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra. *Exp Neurol.* 2000;166:127–135.

HUANG E.J.; REICHARDT L.F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:677–736.

ISHIBASHI H.; HIHARA S.; TAKAHASHI M.; HEIKE T.; YOKOTA T.; IRIKI A. Tool-use learning induces BDNF expression in a selective portion of monkey anterior parietal cortex. *Brain Res Mol Brain Res.* 2002;102:110–112.

KALEV-ZYLINSKA M.L.; GREEN T.N.; MOREL-KOPP M.C.; SUN P.P.; PARK Y.E.; LASHAM A.; DURING M.J.; WARD C.M. N-methyl-D-aspartate receptors amplify activation and aggregation of human platelets. *Thromb Res.* 2014 May;133(5):837–47.

KARPATKIN S.; PEARLSTEIN E. Role of platelets in tumor cell metastases. *Ann Intern Med.* 1981 Nov;95(5):636–41.

KATOH-SEMBA R.; KANEKO R.; KITAJIMA S.; TSUZUKI M.; ICHISAKA S.; HATA Y.; YAMADA H.; MIYAZAKI N.; TAKAHASHI Y.; KATO K. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for in vivo brain-derived neurotrophic factor production in the rat hippocampus. *Neuroscience.* 2009 Sep 29;163(1):352–61

KOKAIA M.; ERNFORS P.; KOKAIA Z.; ELMÉR E.; JAENISCH R.; LINDVALL O. Suppressed epileptogenesis in BDNF mutant mice. *Exp Neurol.* 1995;133:215–224.

KORTE M.; CARROLL P.; WOLF E.; BREM G.; THOENEN H.; BONHOEFFER T. Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:8856–8860.

LASKE C.; STELLOS K.; HOFFMANN N.; STRANSKY E.; STRATEN G.; ESCHWEILER G.W. Higher BDNF serum levels predict slower cognitive decline in Alzheimer's disease patients. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2011; 14 (3): 399–404

LEE B.H. e KIM Y.K. Reduced platelet BDNF level in patients with major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2009 Aug 1;33(5):849–53.

LESCH K.P.; WOLOZIN B.L.; MURPHY D.L.; REIDERER P. Primary structure of the human platelet serotonin uptake site: identity with the brain serotonin transporter, *J Neurochem.* 1993 Jun;60(6):2319-22.

LOMMATZSCH M.; ZINGLER D.; SCHUHBAECK K.; SCHLOETCKE K.; ZINGLER C.; SCHUFF-WERNER P.; VIRCHOW J.C. The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. *Neurobiol Aging.* 2005 Jan;26(1):115-23.

MAISONPIERRE P.C.; BELLUSCIO L.; SQUINTO S.; IP N.Y.; FURTH M.E.; LINDSAY R.M.; YANCOPOULOS G.D. Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science.* 1990;247:1446–1451.

MARAZZITI D.; ROTONDO A.; PERUGI G.; PLACIDI G.F.; CASSANO G.B.; PACIFICI G.M. Plasma of depressed patients enhances platelet imipramine binding. *Biol Psychiatry.* 1989 Apr 1;25(7):985-7.

MCGREGOR L.; MARTIN J.; MCGREGOR J. L. Platelet-leukocyte aggregates and derived microparticles in inflammation, vascular remodelling and thrombosis. *Front Biosci.* 2006 Jan 1;11:830-7.

NOWATARI T.; MURATA S.; FUKUNAGA K.; OHKOHCHI N. Role of platelets in chronic liver disease and acute liver injury. *Hepatol Res.* 2013 Jul 11. No prelo.

PALLISTER, Christopher J.; WATSON, Malcolm. *Haematology.* 2. ed. Banbury: Scion Publishing Ltd, 2010. 400 p.

PANDEY S.C.; SHARMA R.P.; JANICAK P.G.; MARKS R.C.; DAVIS J.M.; PANDEY G.N. Platelet serotonin-2 receptors in schizophrenia: effects of illness and neuroleptic treatment. *Psychiatry Res.* 1993 Jul;48(1):57-68.

PATAPOUTIAN A.; REICHARDT L.F. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol.* 2001;11:272–280.

PHILLIPS H.S.; HAINS JM.; ARMANINI M.; LARAMEE G.R.; JOHNSON S.A.; WINSLOW J.W. BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron.* 1991;7:695–702.

PLÁTENÍK J.; FIŠAR Z.; BUCHAL R.; JIRÁK R.; KITZLEROVÁ E.; ZVĚŘOVÁ M.; RABOCH J. GSK3 β , CREB, and BDNF in peripheral blood of patients with Alzheimer's disease and depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2014 Apr 3;50:83-93.

PLEIN H.; BERK M. The platelet as a peripheral marker in psychiatric illness, *Hum Psychopharmacol Clin Exp* 2001 ; 16: 229-236

RAINESALO S.; SARANSAARI P.; PELTOLA J.; KERÄNEN T. Uptake of GABA and activity of GABA-transaminase in platelets from epileptic patients. *Epilepsy Res.* 2003 Mar;53(3):233-9.

RAINESALO S.; KERÄNEN T.; PELTOLA J.; SARANSAARI P. Glutamate uptake in blood platelets from epileptic patients, *Neurochem Int.* 2003 Sep-Oct;43(4-5):389-92.

REED, Guy L. Platelet Secretion. In: MICHELSON, Alan D. *Platelets*. Boston: Elsevier, 2006. p. 309-318.

ROUX, P. e BARKER, P. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog. Neurobiol.* 2002;67:203–233

SERRA-MILLÀS M.; LÓPEZ-VÍLCHEZ I.; NAVARRO V.; GALÁN A.M.; ESCOLAR G.; PENADÉS R.; CATALÁN R.; FAÑANÁS L.; ARIAS B.; GASTÓ C. Changes in plasma and platelet BDNF levels induced by S-citalopram in major depression. *Psychopharmacology (Berl)*. 2011 Jul;216(1):1-8.

SHELIN Y.I.; BARDGETT M.E.; JACKSON J.L.; NEWCOMER J.W.; CSERNANSKY J.G. Platelet serotonin markers and depressive symptomatology. *Biol Psychiatry*. 1995 Apr 1;37(7):442-7.

SHERIF F.M. GABA-transaminase in brain and blood platelets: basic and clinical aspects. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1994 Dec;18(8):1219-33.

SMRCKA A.V.; HEPLER J.R.; BROWN K.O.; STERNWEIS P.C.; Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified Gq, *Science*. 1991 Feb 15;251(4995):804-7.

SONG J.H.; HUANG C.S.; NAGATA K.; YEH J.Z.; NARAHASHI T. Differential action of riluzole on tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1997 Aug;282(2):707-14.

STAHL S.M. The human platelet. A diagnostic and research tool for the study of biogenic amines in psychiatric and neurologic disorders, *Arch Gen Psychiatry*. 1977 May;34(5):509-16.

STRATMANN, Bernd; MENART, Barbara; TSCHOEPE, Diethelm. Diabetes mellitus. In: MICHELSON, Alan D. *Platelets*. Boston: Elsevier, 2006. p. 309-318.

ZIEVE P.D.; SOLOMON H.M. Uptake of amino acids by the human platelet. *Am J Physiol*. 1968 Jan;214(1):58-61.

ZOIA C.; COGLIATI T.; TAGLIABUE E.; CVALETTI G.; SALA G.; GALIMBERTI G.; RIVOLTA I.; ROSSI V.; FRATTOLA L.; FERRARESE C. Glutamate transporters in platelets: EAAT1 decrease in aging and in Alzheimer's disease, *Neurobiol Aging*. 2004 Feb;25(2):149-57.

ANEXO I (NORMAS DA REVISTA “BIOMED RESEARCH INTERNATIONAL”)

Author Guidelines

Submission

Manuscripts should be submitted by one of the authors of the manuscript through the online [Manuscript Tracking System](#). Regardless of the source of the word-processing tool, only electronic PDF (.pdf) or Word (.doc, .docx, .rtf) files can be submitted through the MTS. There is no page limit. Only online submissions are accepted to facilitate rapid publication and minimize administrative costs. Submissions by anyone other than one of the authors will not be accepted. The submitting author takes responsibility for the paper during submission and peer review. If for some technical reason submission through the MTS is not possible, the author can contact bmri@hindawi.com for support.

Terms of Submission

Papers must be submitted on the understanding that they have not been published elsewhere and are not currently under consideration by another journal published by Hindawi or any other publisher. The submitting author is responsible for ensuring that the article's publication has been approved by all the other coauthors. It is also the authors' responsibility to ensure that the articles emanating from a particular institution are submitted with the approval of the necessary institution. Only an acknowledgment from the editorial office officially establishes the date of receipt. Further correspondence and proofs will be sent to the author(s) before publication unless otherwise indicated. It is a condition of submission of a paper that the authors permit editing of the paper for readability. All enquiries concerning the publication of accepted papers should be addressed to bmri@hindawi.com.

Peer Review

All manuscripts are subject to peer review and are expected to meet standards of academic excellence. Submissions will be considered by an editor and “if not rejected right away” by peer-reviewers, whose identities will remain anonymous to the authors.

Microarray Data Submission

Before publication, the microarray data should be deposited in an appropriate database such as Gene Expression Omnibus (GEO) or Array Express, and an entry name or accession number must be included in the manuscript prior to its publication. Microarray data should be MIAME compliant. During the reviewing

process, submitting authors are committed to provide the editor and the reviewers handling his/her manuscript with the login information by which they can access this information in the database.

Concurrent Submissions

In order to ensure sufficient diversity within the authorship of the journal, authors will be limited to having two manuscripts under review at any point in time. If an author already has two manuscripts under review in the journal, he or she will need to wait until the review process of at least one of these manuscripts is complete before submitting another manuscript for consideration. This policy does not apply to Editorials or other non-peer reviewed manuscript types.

Article Processing Charges

BioMed Research International is an open access journal. Open access charges allow publishers to make the published material available for free to all interested online visitors. For more details about the article processing charges of BioMed Research International, please visit the [Article Processing Charges](#) information page.

Units of Measurement

Units of measurement should be presented simply and concisely using System International (SI) units.

Title and Authorship Information

The following information should be included

- Paper title
- Full author names
- Full institutional mailing addresses
- Email addresses

Abstract

The manuscript should contain an abstract. The abstract should be self-contained and citation-free and should not exceed 200 words.

Introduction

This section should be succinct, with no subheadings.

Materials and Methods

This part should contain sufficient detail so that all procedures can be repeated. It can be divided into subsections if several methods are described.

Results and Discussion

This section may each be divided by subheadings or may be combined.

Conclusions

This should clearly explain the main conclusions of the work highlighting its importance and relevance.

Acknowledgments

All acknowledgments (if any) should be included at the very end of the paper before the references and may include supporting grants, presentations, and so forth.

References

Authors are responsible for ensuring that the information in each reference is complete and accurate. All references must be numbered consecutively and citations of references in text should be identified using numbers in square brackets (e.g., “as discussed by Smith [9]”; “as discussed elsewhere [9, 10]”). All references should be cited within the text; otherwise, these references will be automatically removed.

Preparation of Figures

Upon submission of an article, authors are supposed to include all figures and tables in the PDF file of the manuscript. Figures and tables should not be submitted in separate files. If the article is accepted, authors will be asked to provide the source files of the figures. Each figure should be supplied in a separate electronic file. All figures should be cited in the paper in a consecutive order. Figures should be supplied in either vector art formats (Illustrator, EPS, WMF, FreeHand, CorelDraw, PowerPoint, Excel, etc.) or bitmap formats (Photoshop, TIFF, GIF, JPEG, etc.). Bitmap images should be of 300 dpi resolution at least unless the resolution is intentionally set to a lower level for scientific reasons. If a bitmap image has labels, the image and labels should be embedded in separate layers.

Preparation of Tables

Tables should be cited consecutively in the text. Every table must have a descriptive title and if numerical measurements are given, the units should be included in the column heading. Vertical rules should not be used.

Proofs

Corrected proofs must be returned to the publisher within 2-3 days of receipt. The publisher will do everything possible to ensure prompt publication. It will therefore be appreciated if the manuscripts and figures conform from the outset to the style of the journal.

Copyright

Open Access authors retain the copyrights of their papers, and all open access articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided that the original work is properly cited.

The use of general descriptive names, trade names, trademarks, and so forth in this publication, even if not specifically identified, does not imply that these names are not protected by the relevant laws and regulations.

While the advice and information in this journal are believed to be true and accurate on the date of its going to press, neither the authors, the editors, nor the publisher can accept any legal responsibility for any errors or omissions that may be made. The publisher makes no warranty, express or implied, with respect to the material contained herein.

Disclosure Policy

A competing interest exists when professional judgment concerning the validity of research is influenced by a secondary interest, such as financial gain. We require that our authors reveal any possible conflict of interests in their submitted manuscripts.

If there is no conflict of interests, authors should state that “The author(s) declare(s) that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.”

Clinical Study

When publishing clinical studies, Hindawi aims to comply with the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) on trials registration. Therefore, authors are requested to register the clinical trial presented in the manuscript in a public trials registry and include the trial registration number at the end of the abstract. Trials initiated after July 1, 2005 must be registered prospectively before patient recruitment has begun. For trials initiated before July 1, 2005, the trial must be registered before submission.

Ethical Guidelines

In any studies that involve experiments on human or animal subjects, the following ethical guidelines must be observed. For any human experiments, all work must be conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (1964). Papers describing experimental work on human subjects who carry a risk of harm must include a statement that the experiment was conducted with the understanding and the consent of the human subject, as well as a statement that the responsible Ethical Committee has approved the experiments. In the case of any animal experiments, the authors should provide a full description of any anesthetic and surgical procedure used, as well as evidence that all possible steps were taken to avoid animal suffering at each stage of the experiment.

**ANEXO II (TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO -
TCLE)**

Você está sendo convidado a participar da pesquisa **Avaliação do efeito periférico de neurofármacos glutamatérgicos** que tem por objetivo testar novos usos para medicamentos conhecidos usando amostras de sangue. Para realizar este teste devemos utilizar sangue de pessoas que não estejam fazendo uso de antibióticos, antidepressivos ou anticonvulsivantes.

Se você aceitar participar sua contribuição será a de ceder 8 mL de sangue que serão coletados no final da doação de sangue. Antes disso você será perguntado se está usando **antibióticos, antidepressivos ou anticonvulsivantes**.

Você não terá benefícios diretos com a sua participação, mas estará colaborando para o conhecimento de novos efeitos de medicamentos.

Não são conhecidos riscos pela sua participação no estudo.

A sua participação é voluntária e, se optar por não participar, não terá nenhum prejuízo na sua relação com a Instituição.

As informações são confidenciais e seu nome não será divulgado na publicação dos resultados.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. **Pesquisador responsável: Dr. Marcos Frizzo: 3308 4536.**

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) HCPA: 3359 7640.**

Nome do participante

Nome da pessoa que aplicou o TCLE

Assinatura do participante

Assinatura da pessoa que aplicou o TCLE

Data:

1ª via assinada (participante)
2ª via assinada (pesquisador responsável)

**ANEXO III (ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA BIOMED RESEARCH
INTERNATIONAL)**

Research Article

Riluzole Stimulates BDNF Release from Human Platelets

Patrick Türck and Marcos Emilio Frizzo

Department of Morphological Sciences, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, 90050-170 Porto Alegre, Brazil

Correspondence should be addressed to Marcos Emilio Frizzo; frizzo@ufrgs.br

Received 1 July 2014; Accepted 17 September 2014

Academic Editor: Gianluca Coppola

Copyright © 2014 P. Türck and M. E. Frizzo. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has several functions in the central nervous system, where it contributes to brain development and its functionality through affecting neuronal survival and activity and also modulating neurotransmitter levels. This neurotrophin is also found in the serum, but its origin and peripheral function remain unknown. Although the source of circulating BDNF is uncertain, it is stored in platelets and can be released through pharmacological treatment. Decreased levels of BDNF in the serum have been related to the pathophysiology of depression, and this relationship is reinforced by the reversal of this condition by treatment with antidepressants. Recently, riluzole has been proposed for the treatment of depression because it has the ability to lower extracellular glutamate levels and increase BDNF expression; and both mechanisms could be associated with its antidepressant action. Considering that riluzole enhances BDNF levels in the serum of patients, we investigated if treatment with this drug could stimulate the release of this neurotrophin from human platelets obtained from healthy subjects. When platelets were incubated with riluzole for 4 h, the basal value of BDNF (92.9 ± 11.1 pg 10^{-6} platelets) was significantly increased ($P < 0.05$, $n = 27$). This stimulatory effect was achieved at low concentrations of riluzole (from 10 μ M) and was not observed when platelets were incubated with the drug for 24 h. The direct action of riluzole evoking BDNF release from human platelets at therapeutic concentrations is important and may contribute to the understanding of its mechanisms of action in the treatment of depression.

1. Introduction

2 Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) contributes to brain development [1, 2] and is related to neuronal survival and activity since it acts as a modulator of neurotransmitter levels and participates in neuronal plasticity [3, 4]. In the human, monkey, and rat, BDNF is also found in the serum at significant levels [5–7], but the origin and function of this neurotrophin remain unknown. Investigators have mentioned the brain as the source for this circulating neurotrophin [8], even though it has been demonstrated that BDNF crosses the blood-brain barrier (BBB) in both directions [9, 10]. Indeed, BDNF may originate from neurons and glia cells [9, 10]; however, it is also released at significant rates by other peripheral tissues, such as different epithelia, where its amounts may reach levels higher than those found in the central nervous system (CNS) [11]. Other examples of BDNF origins other than from CNS are white cells [12–14] and platelets; the latter contain significant quantities of this protein and might provide an important source of this

circulating neurotrophin [5]. It has been shown that more than 99% of blood BDNF proteins are stored in platelets and that these proteins can be released into the serum [6] through pharmacological treatment [15, 16].

Recent studies have reported changes in serum BDNF levels in patients with psychiatric diseases [17–20], such as major depressive disorders [21]. The relationship between decreased BDNF levels and the pathophysiology of depression is supported by several reports [21–25]. Pandey et al. [26] showed that gene expression of BDNF in lymphocytes and its protein expression in platelets from adult and pediatric depressed patients were significantly decreased, and the authors proposed that it could be a target for antidepressant drugs. In fact, some antidepressants increase BDNF expression [27] and also may evoke BDNF release from platelets, in a dose-dependent manner after direct treatment *in vitro* [15]. The BDNF concentration in the serum increases after intravenous treatment with an antidepressant, and the effect

of these drugs on BDNF release from platelets was related to the level of this neurotrophin in the peripheral blood [15].

Recently, glutamatergic modulators have been proposed as a strategy for the treatment of mood disorders [28]. Among the drugs proposed is riluzole (2-amino-6-trifluoromethoxy benzothiazole), which was originally developed as an anti-convulsant [29] but has been used in a number of trials for psychiatric conditions in which glutamate excess has been proposed as part of the pathologic mechanism [30–33]. Different mechanisms of action have been reported for riluzole [32], which probably explains its complex pharmacological effects. For instance, a stimulatory effect on glutamate uptake was observed at low glutamate concentration [34], and this ability to lower extracellular glutamate levels was suggested as its mechanism of antidepressant action, at least partially [32]. However, other mechanisms cannot be ruled out, since riluzole also increases the BDNF expression [35, 36], which could also contribute to its antidepressant action [32]. Treatment with riluzole significantly increases serum levels of BDNF in patients [37]. Considering that BDNF in the blood is thought to originate from platelets and is evoked by antidepressant drugs, we decided to investigate if riluzole could stimulate the release of this neurotrophin from human platelets.

2. Methods

2.1. Subjects. Human blood was collected from 27 healthy male volunteers registered as donors in the Hemotherapy Service of the Clinical Hospital of Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. The study was carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. Informed consent was obtained from the donors and their privacy rights were observed.

2.2. Procedures. Two samples of 4 mL were taken from the antecubital vein of each donor and placed in vacutainers (BD Franklin Lakes, USA) containing K_3 -EDTA. Immediately, they were gently inverted 10 times and placed in an ABX Micros ES 60 hematology analyzer (HORIBA ABX SAS, Japan) to determine the number of platelets in each blood sample. Platelets were isolated as previously described by Mangano and Schwarcz [38]. The vacutainers were then centrifuged at $300 \times g$ for 5 min at $4^\circ C$ and the platelet-rich plasma (PRP) was obtained. The supernatant (PRP) was carefully removed with a plastic pipette tip, with care not to disturb the leukocyte layer. The volume of PRP collected from each sample was recorded and the PRP was transferred to a microcentrifuge tube. The PRP was then centrifuged at $7000 \times g$ for 10 min at $4^\circ C$. The plasma was discarded and the pellet was resuspended in 0.5 mL of 0.32 M phosphate-buffered sucrose (pH 7.4 at $4^\circ C$). The suspension, hereafter referred to as the platelet concentrate (PC), was repeatedly passed through a plastic pipette tip of 1 mL until the visible platelet aggregates were eliminated. An additional 0.5 mL of buffered sucrose was added to the suspension and the solution was mixed with 5 gentle inversions. The PC was again

centrifuged at $7000 \times g$ for 5 min at $4^\circ C$. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in a volume of 0.32 M phosphate-buffered sucrose (pH 7.4 at $4^\circ C$), equal to one-fifth of the initial volume of PRP obtained. After that, the two PC suspensions obtained from each subject were blended and the number of platelets was determined again. As previously observed by our group, the platelets should be counted in the PC, after the platelets are washed [39]. The mean platelet volume (MPV) and platelet distribution width (PDW) were also determined in both the whole blood and the PC to evaluate potential variations in the platelets during the processing. The incubation was performed in a 96-well plate; to each well were added 20×10^6 platelets in 130 μL of Tris-citrate buffer (112.8 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 1.1 mM KH_2PO_4 , 1.1 mM $MgSO_4$, 11 mM Na_3 -citrate, 25 mM Tris-HCl, and 10.2 mM glucose), pH 6.5. Drugs were diluted in Tris-citrate buffer, and the final volume in the well was 150 μL .

2.3. BDNF Protein Assay. BDNF levels in the supernatants were measured using a ChemiKine Brain Derived Neurotrophic Factor Sandwich ELISA kit (Millipore, USA) following the manufacturer's instructions. All BDNF measurements were performed in triplicate on 96-well plates, and a standard curve was calculated for each experiment. Samples from the supernatants were diluted 1:16 in phosphate buffer solution (pH 7.4) for BDNF measurement. The platelet BDNF content was calculated by dividing the result for BDNF obtained by the total platelet count from the same individual and was expressed as pg BDNF 10^{-6} platelets. The optical density of each well was measured using a microplate reader (EZ Read 400, Biochrom, UK) set to 450 nm; the optical densitometry data were analyzed with the software Galapagos (Biochrom, UK). The sensitivity was 7.8 pg BDNF mL^{-1} and the assay exhibited no cross-reactivity with other members of the nerve growth factor family.

2.4. MTT Assay. The MTT assay was utilized to determine the effect of riluzole or sertraline on platelet viability after 4 or 24 h of drug exposure. For shorter incubation times (4 h), 20 μL MTT (5 mg mL^{-1}) was added to each well at the time that the platelets were plated, and it was maintained at room temperature by 4 h. For longer incubation times (24 h), 20 μL MTT (5 mg mL^{-1}) was added to each well 20 h after plating and maintained at room temperature for an additional 4 h. Subsequently, 150 μL of DMSO was added to dissolve the formazan, which was detected using a microplate reader (EZ Read 400, Biochrom, UK). The absorption was read at 570 nm; the value obtained (UAbs) was expressed as UAbs $20 \cdot 10^{-6}$ platelets.

2.5. Statistical Methods. Values are reported as mean \pm SEM, and the statistical analysis was conducted using SPSS. The data were normally distributed, as determined by the Shapiro-Wilk normality test, and were analyzed through one-way ANOVA (for BDNF) or two-way ANOVA (for MTT) followed by Tukey's multiple comparisons test (alpha at 0.05).

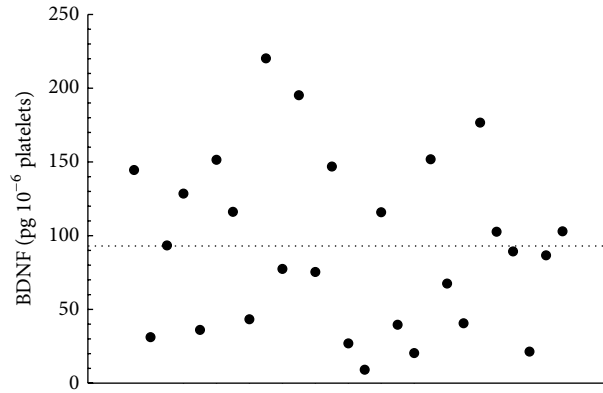


FIGURE 1: Scatter plot of BDNF released from human platelets. The mean of BDNF values (92.9 ± 11.1 pg 10^{-6} platelets) is indicated by the dotted bar ($n = 27$).

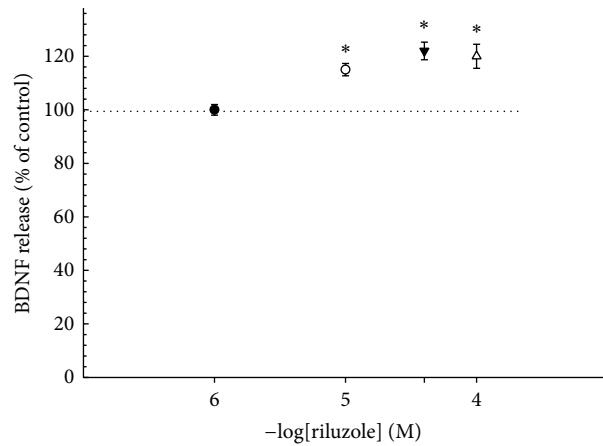


FIGURE 2: Stimulatory effect of riluzole on BDNF release. Platelets obtained from healthy donors were incubated with different concentrations of riluzole (1, 10, 40, or $100 \mu\text{M}$) for 4 h. Control is represented by the dotted line. Data are presented as mean \pm SEM. * Different from control ($n = 27$, $P < 0.05$).

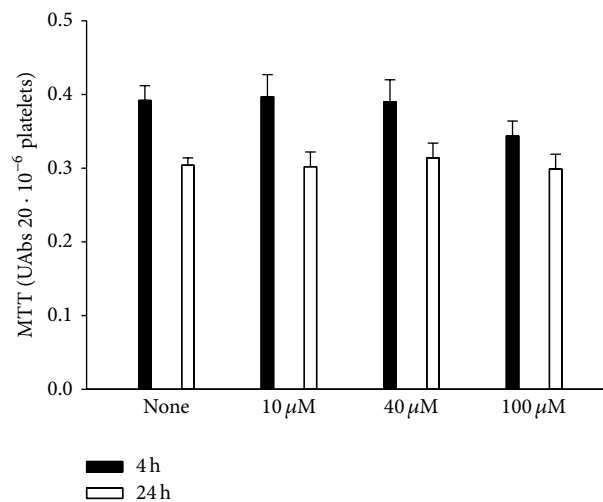


FIGURE 3: Platelet viability during the incubation period. The effect of different concentrations of riluzole on platelet viability was determined at 4 or 24 h of incubation. No significant differences were observed among the groups. Data are presented as mean \pm SEM ($n = 27$).

3. Results

We used washed platelets to test if riluzole could stimulate BDNF release, acting directly on these cells. Initially, the platelet indices (cell count, MPV, and PDW) were measured in whole blood and again after obtaining the PC, to evaluate if these parameters changed during the processing. Then, the platelet number quantified in each PC was used to normalize the BDNF quantity in the respective experiment. Our data showed that the platelet count should be determined after the PC is obtained, since the cell number was reduced during the process (yield of $42 \pm 8\%$). Analysis of PC showed an absence of contaminant cells; and despite the loss of platelets, the MPV and PDW indices were not changed after the cells were obtained. The platelet indices MPV and PDW in the whole blood were $8.1 \pm 0.6 \mu\text{m}^3$ and $14.9 \pm 1.0\%$, respectively. When compared with PC, we did not observe significant differences for MPV and PDW, which showed levels of $8.2 \pm 0.6 \mu\text{m}^3$ and $15.5 \pm 1.2\%$, respectively. In our analysis, the platelet number achieved in the PC was $1545 \pm 338 \times 10^3 \text{mm}^{-3}$.

In our experimental conditions, the basal values of BDNF released from platelets of donors ranged from 9.0 to 220.2 pg 10^{-6} platelets. The wide distribution of BDNF quantified in the study group is depicted in Figure 1.

Given the recent evidence that riluzole treatment causes a significant increase of BDNF in the serum of patients [37], the effect of this drug on BDNF release from human platelets was tested. Platelets from healthy volunteers were treated with different concentrations of riluzole for 4 or 24 h at room temperature. When platelets were incubated with riluzole for 4 h, the basal value of BDNF as quantified from the controls ($92.9 \pm 11.1 \text{pg } 10^{-6}$ platelets) was significantly increased ($P < 0.05$). Even for platelets from donors who showed lower basal levels of BDNF, treatment with riluzole stimulated the release of this neurotrophin. The increase mediated by riluzole was significant beginning with $10 \mu\text{M}$ (15%) and was maintained up to $40 \mu\text{M}$ (22%) and $100 \mu\text{M}$ (20%). We also tested the effect of $1 \mu\text{M}$ riluzole, which did not differ from the control (Figure 2).

The effect of riluzole on the BDNF release determined in our model was reproducible in repeated runs, even though it varied from individual to individual. Considering this variability in the basal levels of BDNF among different donors (Figure 1), in each set of experiments, the drug effect was compared with the respective control. We also used sertraline ($0.3 \mu\text{M}$) as a positive control, since it was recently reported to be a potent inducer of BDNF release from platelets [15]. However, contrary to expectations, in our experiments, the sertraline did not significantly stimulate BDNF release (data not shown).

The increase in the release of BDNF evoked by riluzole was not observed when platelets were incubated with the drug for 24 h. In order to determine if platelet viability was affected by riluzole during the exposure, we used the MTT assay. Hence, the activity of NAD(P)H-dependent cellular oxidoreductase enzymes was evaluated after 4 and 24 h incubation. The viability of the untreated platelets did not differ after the two incubation periods, although slightly less formazan was produced after 24 h (Figure 3).

4. Discussion

We evaluated the platelet parameters MPV and PDW, since these indices have been reported to correlate with platelet function [40]. MPV is a measurement that is commonly used to describe platelet size and is an indicator of activated platelets [41, 42], while PDW represents the range of variability in platelet volume [43]. Taking into account that MPV and PDW did not change before the platelets were obtained and after they were processed, we can state that the platelets used in this study were not activated at the time of exposure to riluzole. Importantly, we did not select a subpopulation of these cells, since no significant difference was observed in the PDW. Another important point is that our protocol used only platelets, and, consequently, the BDNF quantified cannot be attributed to contaminant cells such as leukocytes.

In our study, we observed a direct action of riluzole, evoking BDNF release from human platelets. The stimulatory effect was achieved at low concentrations (from $10 \mu\text{M}$), which could be important information for the clinical use of riluzole. Although this increase was not as large as found for another antidepressant [15], the stimulatory effect was reproducible when compared with the respective controls, despite the variations among different donors. The absence of a sertraline effect on BDNF release might be due to our use of human cells, whereas Watanabe et al. [15] used rat platelets. Unfortunately, Watanabe and coauthors did not report the basal values of BDNF that they obtained, which would allow comparison with our data.

Riluzole evoked an acute effect on the platelets, which was not observed after longer incubation times. The release of BDNF in response to riluzole acutely (4 h) and not later (24 h) suggests that its effect derived from evoking neurotrophin release from the platelet pool and is not related to a stimulatory effect on neurotrophin synthesis. This is in accordance with data showing that mRNA expression of BDNF in human platelets is extremely low [5, 10].

The novel finding that riluzole elicits BDNF release from human platelets is important, since this situation may occur peripherally and also in deep regions of the CNS, where platelets and astrocytes are very close and where this neurotrophin is able to pass through the BBB. Beyond the peripheral consequences of this release mediated by riluzole, the effects of this neurotrophin on the CNS may be complex and significant, especially regarding the glutamatergic system. It has been shown that BDNF exerts acute effects on glutamatergic synaptic transmission and plasticity, that is, enhancing excitatory synaptic transmission through pre- and postsynaptic mechanisms [44]. On the other hand, its stimulatory effect on the expression of astroglial glutamate transporters and the consequent increase in glutamate uptake capacity has also been described [45]. More recently, it was demonstrated that BDNF upregulates the protein expression of the vesicular glutamate transporters (VGLUT1 and VGLUT2) in hippocampal neurons [46], which reinforces the participation of BDNF as a modulator of the glutamatergic synapse.

Clinically, riluzole has been used in trials for psychiatric conditions where glutamate excess is proposed as part of the

pathologic mechanism [47]. It is also suggested that it produces antidepressant and anxiolytic effects in the treatment of resistant depression [32]. Its effect in these conditions is associated with the ability to reduce extracellular glutamate levels and also may involve its stimulatory action on BDNF expression [32]. Therefore, the demonstration that riluzole causes BDNF release at low concentrations is significant *in vivo* and shows the importance of studying platelets from patients treated with this drug. Studies to clarify the mechanisms related to BDNF release in human platelets are currently in progress in our laboratory.

5. Conclusions

The new effect described for riluzole may contribute to the understanding of the mechanisms involved with its therapeutic action, reinforcing the suggestion for its use in psychiatry, such as in the treatment of depression.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publishing of this paper.

Acknowledgment

This research was supported by grants from the Brazilian National Research Council (CNPq).

References

- [1] G. R. Lewin and Y.-A. Barde, "Physiology of the neurotrophins," *Annual Review of Neuroscience*, vol. 19, pp. 289–317, 1996.
- [2] S. D. Croll, N. Y. Ip, R. M. Lindsay, and S. J. Wiegand, "Expression of BDNF and trkB as a function of age and cognitive performance," *Brain Research*, vol. 812, no. 1-2, pp. 200–208, 1998.
- [3] E. Castrén, M. Pitkänen, J. Sirviö et al., "The induction of LTP increases BDNF and NGF mRNA but decreases NT-3 mRNA in the dentate gyrus," *NeuroReport*, vol. 4, no. 7, pp. 895–898, 1993.
- [4] J. L. Jankowsky and P. H. Patterson, "Cytokine and growth factor involvement in long-term potentiation," *Molecular and Cellular Neurosciences*, vol. 14, no. 6, pp. 273–286, 1999.
- [5] H. Yamamoto and M. E. Gurney, "Human platelets contain brain-derived neurotrophic factor," *Journal of Neuroscience*, vol. 10, no. 11, pp. 3469–3478, 1990.
- [6] S. F. Radka, P. A. Holst, M. Fritsche, and C. A. Altar, "Presence of brain-derived neurotrophic factor in brain and human and rat but not mouse serum detected by a sensitive and specific immunoassay," *Brain Research*, vol. 709, no. 1, pp. 122–301, 1996.
- [7] T. Mori, K. Shimizu, and M. Hayashi, "Levels of serum brain-derived neurotrophic factor in primates," *Primates*, vol. 44, no. 2, pp. 167–169, 2003.
- [8] R. Katoh-Semba, R. Wakako, T. Komori et al., "Age-related changes in BDNF protein levels in human serum: differences between autism cases and normal controls," *International Journal of Developmental Neuroscience*, vol. 25, no. 6, pp. 367–372, 2007.
- [9] W. Pan, W. A. Banks, M. B. Fasold, J. Bluth, and A. J. Kastin, "Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier," *Neuropharmacology*, vol. 37, no. 12, pp. 1553–1561, 1998.
- [10] F. Karege, M. Schwald, and M. Cisse, "Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets," *Neuroscience Letters*, vol. 328, no. 3, pp. 261–264, 2002.
- [11] M. Lommatzsch, A. Braun, A. Mannsfeldt et al., "Abundant production of brain-derived neurotrophic factor by adult visceral epithelia: implications for paracrine and target-derived neurotrophic functions," *The American Journal of Pathology*, vol. 155, no. 4, pp. 1183–1193, 1999.
- [12] A. Braun, M. Lommatzsch, A. Mannsfeldt et al., "Cellular sources of enhanced brain-derived neurotrophic factor production in a mouse model of allergic inflammation," *The American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 21, no. 4, pp. 537–546, 1999.
- [13] A. Gielen, M. Khademi, S. Muhallab, T. Olsson, and F. Piehl, "Increased brain-derived neurotrophic factor expression in white blood cells of relapsing-remitting multiple sclerosis patients," *Scandinavian Journal of Immunology*, vol. 57, no. 5, pp. 493–497, 2003.
- [14] M. Kerschensteiner, E. Gallmeier, L. Behrens et al., "Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation?" *Journal of Experimental Medicine*, vol. 189, no. 5, pp. 865–870, 1999.
- [15] K. Watanabe, E. Hashimoto, W. Ukai et al., "Effect of antidepressants on brain-derived neurotrophic factor (BDNF) release from platelets in the rats," *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, vol. 34, no. 8, pp. 1450–1454, 2010.
- [16] P. Stoll, A. Plessow, K. Bratke, J. C. Virchow, and M. Lommatzsch, "Differential effect of clopidogrel and aspirin on the release of BDNF from platelets," *Journal of Neuroimmunology*, vol. 238, no. 1-2, pp. 104–106, 2011.
- [17] K. Toyooka, K. Asama, Y. Watanabe et al., "Decreased levels of brain-derived neurotrophic factor in serum of chronic schizophrenic patients," *Psychiatry Research*, vol. 110, no. 3, pp. 249–257, 2002.
- [18] K. B. Nelson, J. K. Grether, J. M. Dambrosia et al., "Neuropeptides and neurotrophins in neonatal blood of children with autism or mental retardation," *Annals of Neurology*, vol. 49, no. 5, pp. 597–606, 2001.
- [19] K. Miyazaki, N. Narita, R. Sakuta et al., "Serum neurotrophin concentrations in autism and mental retardation: a pilot study," *Brain & Development*, vol. 26, no. 5, pp. 292–295, 2004.
- [20] K. Hashimoto, Y. Iwata, K. Nakamura et al., "Reduced serum levels of brain-derived neurotrophic factor in adult male patients with autism," *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, vol. 30, no. 8, pp. 1529–1531, 2006.
- [21] E. Shimizu, K. Hashimoto, N. Okamura et al., "Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants," *Biological Psychiatry*, vol. 54, no. 1, pp. 70–75, 2003.
- [22] F. Karege, G. Perret, G. Bondolfi, M. Schwald, G. Bertschy, and J.-M. Aubry, "Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients," *Psychiatry Research*, vol. 109, no. 2, pp. 143–148, 2002.
- [23] F. Karege, G. Bondolfi, N. Gervasoni, M. Schwald, J.-M. Aubry, and G. Bertschy, "Low Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity," *Biological Psychiatry*, vol. 57, no. 9, pp. 1068–1072, 2005.

- [24] A. B. M. Cunha, B. N. Frey, A. C. Andreazza et al., "Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes," *Neuroscience Letters*, vol. 398, no. 3, pp. 215–219, 2006.
- [25] R. Machado-Vieira, M. O. Dietrich, R. Leke et al., "Decreased plasma brain derived neurotrophic factor levels in unmedicated bipolar patients during manic episode," *Biological Psychiatry*, vol. 61, no. 2, pp. 142–144, 2007.
- [26] G. N. Pandey, Y. Dwivedi, H. S. Rizavi, X. Ren, H. Zhang, and M. N. Pavuluri, "Brain-derived neurotrophic factor gene and protein expression in pediatric and adult depressed subjects," *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, vol. 34, no. 4, pp. 645–651, 2010.
- [27] C. Pittenger and R. S. Duman, "Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms," *Neuropsychopharmacology*, vol. 33, no. 1, pp. 88–109, 2008.
- [28] C. Zarate Jr., R. MacHado-Vieira, I. Henter, L. Ibrahim, N. Diazgranados, and G. Salvadore, "Glutamatergic modulators: the future of treating mood disorders?" *Harvard Review of Psychiatry*, vol. 18, no. 5, pp. 293–303, 2010.
- [29] J. Mizoule, B. Meldrum, M. Mazadier et al., "2-Amino-6-trifluoromethoxy benzothiazole, a possible antagonist of excitatory amino acid neurotransmission—I: anticonvulsant properties," *Neuropharmacology*, vol. 24, no. 8, pp. 767–773, 1985.
- [30] S. J. Mathew, K. Keegan, and L. Smith, "Glutamate modulators as novel interventions for mood disorders," *Revista Brasileira de Psiquiatria*, vol. 27, no. 3, pp. 243–248, 2005.
- [31] S. J. Mathew, J. W. Murrough, M. Aan Het Rot, K. A. Collins, D. L. Reich, and D. S. Charney, "Riluzole for relapse prevention following intravenous ketamine in treatment-resistant depression: A pilot randomized, placebo-controlled continuation trial," *International Journal of Neuropsychopharmacology*, vol. 13, no. 1, pp. 71–82, 2010.
- [32] G. Sanacora, S. F. Kendell, Y. Levin et al., "Preliminary evidence of riluzole efficacy in antidepressant-treated patients with residual depressive symptoms," *Biological Psychiatry*, vol. 61, no. 6, pp. 822–825, 2007.
- [33] C. A. Zarate Jr., J. L. Payne, J. Quiroz et al., "An open-label trial of riluzole in patients with treatment-resistant major depression," *The American Journal of Psychiatry*, vol. 161, no. 1, pp. 171–174, 2004.
- [34] M. E. Frizzo, L. P. Dall'Onder, K. B. Dalcin, and D. O. Souza, "Riluzole enhances glutamate uptake in rat astrocyte cultures," *Cellular and Molecular Neurobiology*, vol. 24, no. 1, pp. 123–128, 2004.
- [35] R. Katoh-Semba, T. Asano, H. Ueda et al., "Riluzole enhances expression of brain-derived neurotrophic factor with consequent proliferation of granule precursor cells in the rat hippocampus," *The FASEB Journal*, vol. 16, no. 10, pp. 1328–1330, 2002.
- [36] I. Mizuta, M. Ohta, K. Ohta, M. Nishimura, E. Mizuta, and S. Kuno, "Riluzole stimulates nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor synthesis in cultured mouse astrocytes," *Neuroscience Letters*, vol. 310, no. 2–3, pp. 117–120, 2001.
- [37] F. Squitieri, S. Orobello, M. Cannella et al., "Riluzole protects Huntington disease patients from brain glucose hypometabolism and grey matter volume loss and increases production of neurotrophins," *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, vol. 36, no. 7, pp. 1113–1120, 2009.
- [38] R. M. Mangano and R. Schwarcz, "The human platelet as a model for the glutamatergic neuron: platelet uptake of L-glutamate," *Journal of Neurochemistry*, vol. 36, no. 3, pp. 1067–1076, 1981.
- [39] D. S. Rocha, S. K. Souza, T. G. H. Onsten, R. S. M. Silva, and M. E. Frizzo, "A simple method to quantify glycogen from human platelets," *Journal of Cytology & Histology*, vol. 5, article 217, 2014.
- [40] Q. Niu, R. Zhang, M. Zhao et al., "Differences in platelet indices between healthy Han population and Tibetans in China," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 6, Article ID e67203, 2013.
- [41] A. Arıkanoglu, Y. Yucel, A. Acar et al., "The relationship of the mean platelet volume and C-reactive protein levels with mortality in ischemic stroke patients," *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, vol. 17, no. 13, pp. 1774–1777, 2013.
- [42] G. De Luca, G. G. Secco, M. Verdoia et al., "Combination between mean platelet volume and platelet distribution width to predict the prevalence and extent of coronary artery disease: results from a large cohort study," *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, vol. 25, no. 1, pp. 86–91, 2014.
- [43] R. Ozdemir, C. Karadeniz, O. Doksoz et al., "Are mean platelet volume and platelet distribution width useful parameters in children with acute rheumatic carditis?" *Pediatric Cardiology*, vol. 35, no. 1, pp. 53–56, 2014.
- [44] J.-L. Martin and C. Finsterwald, "Cooperation between BDNF and glutamate in the regulation of synaptic transmission and neuronal development," *Communicative & Integrative Biology*, vol. 4, no. 1, pp. 14–16, 2011.
- [45] A. Rodriguez-Kern, M. Gegelashvili, A. Schousboe, J. Zhang, L. Sung, and G. Gegelashvili, "Beta-amyloid and brain-derived neurotrophic factor, BDNF, up-regulate the expression of glutamate transporter GLT-1/EAAT2 via different signaling pathways utilizing transcription factor NF- κ B," *Neurochemistry International*, vol. 43, no. 4–5, pp. 363–370, 2003.
- [46] C. V. Melo, M. Mele, M. Curcio, D. Comprido, C. G. Silva, and C. B. Duarte, "BDNF regulates the expression and distribution of vesicular glutamate transporters in cultured hippocampal neurons," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 1, Article ID e53793, 2013.
- [47] P. Grant, J. Y. Song, and S. E. Swedo, "Review of the use of the glutamate antagonist riluzole in psychiatric disorders and a description of recent use in childhood obsessive-compulsive disorder," *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology*, vol. 20, no. 4, pp. 309–315, 2010.