



Canvis en els nivells plasmàtics i plaquetaris del BDNF i en els paràmetres de coagulació en pacients amb trastorn depressiu major tractats amb ISRSs

Montserrat Serra Millàs



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència [Reconeixement- NoComercial – Compartir Igual 3.0. Espanya de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/es/).

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia [Reconocimiento - NoComercial – Compartir Igual 3.0. España de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/es/).

This doctoral thesis is licensed under the *Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0. Spain License*.

**CANVIS EN ELS NIVELLS PLASMÀTICS I PLAQUETARIS DEL
BDNF I EN ELS PARÀMETRES DE COAGULACIÓ EN PACIENTS
AMB TRASTORN DEPRESSIU MAJOR TRACTATS AMB ISRSs**

Tesi presentada per:

Montserrat Serra Millàs

Per a obtenir el títol de Doctor per la Universitat de Barcelona

Directors de tesi:

Professor Cristobal Gastó Ferrer

Dr. Víctor Navarro Odriozola

Programa Doctorat Medicina

Departament de Psiquiatria i Psicobiologia Clínica

Facultat de Medicina

Universitat de Barcelona

Línia de recerca en neurociències clíniques i experimentals

Grup de recerca: Bases biològiques del trastorn psíquic i psiquiatria nuclear

A la Balbina i a la Dolors.

Al Ramon.

AGRAÏMENTS

Gràcies a

Tots aquells que heu fet possible els estudis, l'especialització, la investigació i la finalització de la tesi.

En primer lloc agrair la confiança i l'ajuda que m'han ofert els meus directors de tesi. El Professor Cristòbal Gastó perquè aquesta tesi no seria possible sense tu i no solament t'he d'agradir això, sinó que has estat un bon mestre, un bon amic i t'he de donar les gràcies per tots els consells que han facilitat la meva tasca laboral. Al Dr. Víctor Navarro pel teu suport emocional i la teva supervisió més directa.

Als meus companys de la Unitat d'Hemostàsia i Coagulació de l'Hospital Clínic de Barcelona per haver-me ajudat en el processament de mostres i haver-me facilitat la comprensió dels processos hemostàsia que quedaven tan lluny pel mi. També agrair-vos totes les facilitats que em vàreu oferir per poder compaginar assistència i recerca.

A tot l'equip del CSM Esquerra de l'Eixample i de Psiquiatria de l'Hospital Clínic pels anys de formació, les hores compartides, la introducció en la recerca, el suport logístic i emocional i l'estímul intel·lectual que heu representat. Als companys de la residència.

Als companys de Vic per haver-me acompanyat els darrers nou anys en el dia a dia, haver-me acollit i pel suport ofert quan aquesta empresa que és la tesi semblava inassolible.

Als pacients, tant els que vàreu participar en els estudis com als d'Osona, perquè sense vosaltres res d'això seria possible i perquè sou el motor per continuar estudiant i fent recerca.

A la família, tiets i cosins, pel vostre suport al llarg de tota la meua vida. Un record especial per tots aquells que ja no estan entre nosaltres però que resten en el record per sempre.

Un agraïment especial a la Dolors per ser-hi sempre, per ensenyar-me a llegir, a pensar, pels viatges, els concerts,... A la meua mare, la Balbina, per haver estat un exemple d'esforç, perseverança i humilitat. Al Ramon, que ens va deixar massa d'hora, però resta en el pensament i va fer-me estimar la ciència i la música.

ÍNDEX

ÍNDEX	7
ABREVIATURES TESI	11
JUSTIFICACIÓ DE LA TESI	13
INTRODUCCIÓ	15
DEPRESSIÓ	19
NEUROBIOLOGIA	21
FACTOR NEUROTRÒFIC DERIVAT DEL CERVELL (BDNF)	25
BDNF en la depressió.....	30
Efecte dels antidepressius sobre el BDNF	32
SEROTONINA	35
Implicació serotonina en la depressió.....	37
Serotonina i fàrmacs:.....	38
Serotonina i BDNF.....	39
Serotonina i hemostàsia	43
Relació entre serotonina plaquetària i cerebral. La plaqueta com model neuronal	48
RELACIÓ ENTRE PATOLOGIA CARDIOVASCULAR I DEPRESSIÓ.	51
HIPÒTESIS I OBJECTIUS	55
Hipòtesis:	57
Objectius:	59
RESULTATS.....	60
Resposta clínica:.....	63
Resultats bdnf	63
Resultats paràmetres de coagulació	66
PUBLICACIONS.....	63
□ ESTUDI 1:	71
□ ESTUDI 2:	81
DISCUSSIÓ	88
Alteracions agregació i coagulació en la depressió i efectes dels ISRS	91
BDNF	96
BDNF i activació plaquetària:	97
BDNF i altres paràmetres de la coagulació	100
El BDNF està relacionat amb la patologia cardiovascular?	101
El BDNF és un bon marcador biològic?	105
LIMITACIONS:	111
CONCLUSIONS	113
BIBLIOGRAFIA.....	119

ABREVIATURES TESI

BDNF (Brain derived neurotrophic factor) : factor neurotròfic derivat cervell.

ISRS: Inhibidor selectiu de la recaptació de serotonina

DSM-IV-TR: Manual de Diagnòstic en Psiquiatria IV

GABA: àcid gamma-aminobutíric

Receptor CB1: Receptor cannabinoide de tipus I

CP: caudat-putamen

DMT: tàlem dorsomedial

SC: superior colliculus

IC: inferior colliculus

VP: ventral pàl·lidum

SNr: substància negra

PAG: substància gris periaqüeductal

DR: rafe dorsal

LC: locus coeruleus.

NGF: Factor de creixement neural

SNC: Sistema Nerviós Central.

LTP (Long term potentiation): Potenciació a llarg termini.

TrkB (Neurotrophic tyrosine kinase receptor, type 2): Receptor de tirosina quinasa tipus 2.

preproBDNF: Pre proproteïna del factor neurotròfic derivat cervell

proBDNF: Pro proteïna del factor neurotròfic derivat del cervell, la seva proteïna immadura.

mBDNF: Factor neurotròfic derivat del cervell, la seva proteïna madura.

P75NTR: Receptor de neurotrofina p75

CPE: Carboxipeptidasa E.

PC1: Proteïnes convertases.

ER: Reticle endoplàsmic.

PI3K: Fosfatidilinositol 4,5 bifosfat 3 quinases.

MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases): Proteïnes quinases activades per mitògens

PLC- γ : Fosfolipasa C - γ .

CREB (cAMP response element-binding protein): Proteïna d'unió al element de resposta al AMPc

Ca²⁺: Calci

NMDA: N-metil-D-aspartat

LTD (Long Term Depression): Depressió a llarg termini.

NT3: Neurotrofina 3

NT4: Neurotrofina 4

Neurones CA3: Neurones piramidals CA3

VTA: àrea tegmental ventral

SERT: Transportador de la serotonina

5-HT: Serotonina
5-HTTLPR: Polimorfisme del transportador de la serotonina
FVW: Factor von Willebrand
PAI: inhibidor de l'activador del plasminogen.
ADP: Adenosina difosfonat
ATP: Adenosina trifosfonat
PF4: Factor 4 de les plaquetes
GP IIb-IIIa: glicoproteïna IIb-IIIa
FT: Factor Tissular
 β TG: β -Tromboglobulina
COX: Enzim ciclooxigenasa.
NO: òxid nítric
P- Sel: P- selectina.
TXA₂: Tromboxà A₂.
AA: Àcid araquidònic.
tPA: Activador tissular del plasminogen.
 α -2-AP: α -2-Antiplasmina
TAFI: Inhibidor de la fibrinòlisi activat per trombina.
P2Y₁₂: Receptor purinèrgic P2Y acoplat a proteïna G, 12
Plt-BDNF: BDNF plaquetari
ppp-BDNF: BDNF en plasma pobre en plaquetes
ANV: Anexina V
PAR1-AP: Agonista del receptor específic de trombina 1.
PAR4-AP: Agonista del receptor específic de trombina 4.
IL-6: Interleuquina 6
TNF- α (Tumor necrosis factor alpha): Factor de necrosis tumoral alfa.
ISRN: Inhibidor de la recaptació de noradrenalina.
HDL: Lipoproteïnes d'alta densitat

JUSTIFICACIÓ DE LA TESI

La malaltia depressiva és un dels trastorns psiquiàtrics més comuns amb una prevalença al llarg de la vida del 15-20%. Comporta un elevat cost econòmic i social, alhora que una disminució de la qualitat de vida de les persones que la pateixen. El diagnòstic de depressió és clínic i es base en valoracions subjectives, comportant desavantatges com la inexactitud del diagnòstic o la influència de l'estat del pacient en la valoració. La malaltia depressiva presenta alteracions en paràmetres biològics que s'han estudiat buscant marcadors de malaltia i de resposta al tractament. La troballa d'un marcador biològic objectiu permetria millorar el procés diagnòstic, reduir l'heterogeneïtat en la classificació delimitant un nombre determinat de subtipus i ajudar a elegir un tractament específic per cada pacient.

Un altre factor a considerar és que la presència de símptomes depressius complica el tractament d'altres malalties mèdiques cròniques com la diabetis i s'associa a taxes de suïcidi altes, major morbimortalitat i pitjor qualitat de vida. Una patologia relacionada amb la depressió és la cardiovascular, observant-se que la clínica depressiva posteriorment a una síndrome coronària aguda afecta 2 de cada 5 pacients i és un dels predictors més importants de pobre pronòstic cardiovascular. Però la depressió també és un factor de risc independent de malaltia cardiovascular, mostrant que els malalts depressius tenen més risc de patir malalties cardiovasculars. Una possible via de relació entre la depressió i la malaltia cardiovascular és l'alteració en els paràmetres de l'hemostàsia i la coagulació. En els darrers anys també s'ha iniciat l'estudi dels canvis observats en les neurotrofines en aquestes malalties, substàncies molt relacionades amb la malaltia depressiva. Tot i la relació entre aquestes dues malalties, hi ha pocs estudis sobre eficàcia i resposta al tractament antidepressiu respecte als paràmetres vasculars i cardíacs. També manquen marcadors que connectin les dues malalties i que puguin ser utilitzats pel diagnòstic, tractament i tinguin una indicació pronòstica. També seria útil trobar alteracions biològiques que ens indiquessin en quins pacients hi ha risc de presentar la comorbiditat i opcions de tractament prèvies a què es presentin.

La molècula més estudiada en la depressió és la serotonina, però a finals del segle XX es va qüestionar la hipòtesi monoaminèrgica de la depressió i es va orientar com a alteracions en la neuroplasticitat, essent un dels principals components el factor neurotròfic derivat del cervell (BDNF). En els darrers anys s'ha vist que aquestes teories són complementàries i no excloents i que no hi ha una teoria única per explicar la depressió. Els articles presentats en aquesta tesi han estudiat els efectes de la depressió en dos aspectes molt relacionats amb aquestes teories i amb la serotonina com són el BDNF i l'alteració en l'agregació plaquetària i en la coagulació. També s'han avaluat els canvis que es produeixen amb un inhibidor de la recaptació de serotonina (ISRS), l'escitalopram, que intervé principalment a través de la serotonina i que pertany al grup dels antidepressius més utilitzats en l'actualitat.

En els estudis s'ha avaluat els paràmetres d'hemostàsia i coagulació dels pacients en fase basal i durant el tractament, essent les troballes més representatives que els estudis *in vitro*. Les alteracions observades en aquests paràmetres poden ser un punt de connexió entre la malaltia cardiovascular i la depressió, alhora que el tractament antidepressiu pot modificar aquesta relació. L'avaluació de la neurotrofina, el BDNF, s'ha realitzat a nivell plasmàtic i plaquetari, cercant les relacions que s'observen entre les dues mostres perifèriques i a causa de les dificultats per estudiar els nivells de BDNF cerebral directament. En aquest sentit cal destacar que les plaquetes presenten múltiples similituds amb les neurones respecte al sistema serotoninèrgic pel que han estat àmpliament utilitzades com a model neuronal i són el magatzem principal de BDNF.

INTRODUCCIÓ

DEPRESSIÓ

La malaltia depressiva és un dels trastorns psiquiàtrics més comuns amb una incidència de 4% i una prevalença al llarg de la vida del 15-20%. Comporten un elevat cost econòmic i social, alhora que una disminució de la qualitat de vida de les persones que la pateixen (1). Aquest trastorn tendeix a la recurrència i a la cronicitat, mostrant xifres de cronicitat del 20% i taxes de recurrència del 50% en el primer episodi i superior al 70% en més d'un episodi (2). Les evidències fisiològiques i bioquímiques de l'existència d'un episodi depressiu són escasses i falten marcadors biològics vàlids que avaluin la resposta al tractament i la necessitat de mantenir tractament preventiu de forma prolongada. Respecte al sexe, la prevalença de la depressió és aproximadament dues vegades més gran en dones que en homes. Els tractaments actuals tenen limitacions importants (taxes de resposta baixes, alta incidència de recaigudes i temps de latència de resposta de setmanes a mesos), el que dificulta el tractament de la malaltia i els seus trastorns comòrbids. La presència de símptomes depressius complica el tractament d'altres malalties mèdiques cròniques com la diabetis i s'associa a taxes de suïcidi altes, major morbimortalitat i pitjor qualitat de vida.

En la **taula 1** es presenten els criteris que cal complir per rebre el diagnòstic de depressió major segons el DSM-IV-TR que és l'utilitzat durant els nostres estudis (3). Els símptomes que conformen la depressió major són descriptius i no estan destinats a proporcionar un model etiològic de la malaltia. Això es deu en gran part perquè l'etiologia exacta de la depressió és desconeguda, encara que es reconeix que la predisposició genètica i l'exposició a l'estrès tenen un paper important (4). Un dels principals objectius de la investigació psiquiàtrica actual és anar més enllà de la simple descripció i passar a un model mèdic on es té en compte els mecanismes etiològics de la malaltia (4).

TAULA 1:

CRITERIS DSM-IV-TR PEL DIAGNÒSTIC D'EPISODI DEPRESSIU MAJOR

- A. Presència de cinc (o més) dels següents símptomes durant un període de 2 setmanes, que representen un canvi respecte a l'activitat prèvia. Un dels símptomes ha de ser (1) estat d'ànim depressiu o (2) pèrdua d'interès o plaer.
- (1) Estat d'ànim depressiu la major part del dia, quasi cada dia, indicat per la pròpia persona o observat per altres.
 - (2) Marcada disminució de l'interès o el plaer en totes, o gairebé totes, les activitats durant la major part del dia, gairebé cada dia.
 - (3) Pèrdua o augment significatiu de pes sense estar fent dieta o disminució o augment de la gana quasi cada dia.
 - (4) Insomni o hipersòmia gairebé cada dia.
 - (5) Agitació o retard psicomotor gairebé cada dia.
 - (6) Astènia o pèrdua d'energia quasi cada dia .
 - (7) Sentiments d'inutilitat o de culpa excessius o inapropiats gairebé tots els dies.
 - (8) Menor capacitat de pensar o concentrar-se o indecisió gairebé cada dia (indicada per la persona o per observació dels altres).
 - (9) Pensaments recurrents de mort (no solament por a morir), ideació suïcida recurrent sense planificació específica, intent de suïcidi o un pla de suïcidi específic
- B. Els símptomes no compleixen els criteris d'un episodi mixta.
- C. Els símptomes provoquen malestar clínicament significatiu o deteriorament social, laboral o d'altres àrees importants de l'activitat de l'individu.
- D. Els símptomes no són deguts als efectes fisiològics directes d'una substància o d'una malaltia mèdica.
- E. Els símptomes no s'expliquen millor per la presència d'un dol, els símptomes persisteixen més de 2 mesos o es caracteritzen per una marcada incapacitat funcional, preocupacions mòrbides d'inutilitat, ideació suïcida, símptomes psicòtics o alentiment psicomotor.

NEUROBIOLOGIA

Múltiples línies d'evidència demostren que el trastorn depressiu mostra alteracions en l'estructura i en la funció cerebral en certes regions del cervell, explicant-se la depressió bàsicament a través de dues teories, la teoria de la deficiència monoaminèrgica i la teoria de la neuroplasticitat. No obstant això, no està clar si els canvis observats són etiològic i condueixen a la depressió, o si són la conseqüència de la depressió (5). A continuació s'intenta fer un resum general de la neurobiologia de la depressió per centrar-nos posteriorment en els dos temes tractats en els articles de la tesi, la serotonina i el BDNF.

La plasticitat neuronal o neuroplasticitat es considera com la capacitat que té el teixit neuronal de reorganitzar-se, assimilar i modificar els mecanismes biològics, bioquímics i fisiològics implicats en la comunicació intercel·lular i fer les respostes als estímuls apropiades i adaptatives. Això implica la formació de noves connexions nervioses al llarg de tota la vida en resposta a la informació nova, l'estimulació sensorial, el desenvolupament, la disfunció o el dany. Les manifestacions de la neuroplasticitat en el sistema nerviós de l'adult inclouen alteracions en la funció dendrítica, remodelació sinàptica, potenciació a llarg terme, esporga axonal, extensió neuronal, sinaptogènesi i neurogènesi (6). Això permet que les neurones de cervell puguin compensar les lesions i les malalties i ajustin les seves activitats en resposta a les noves situacions o als canvis del seu entorn, alhora que explica la capacitat d'aprenentatge i de memòria. Les alteracions en la plasticitat neuronal han estat la base pel desenvolupament de la teoria neurotròfica de la depressió. Un component important de la neuroplasticitat és el factor neurotròfic derivat del cervell (BDNF). Un factor molt relacionat amb la depressió és l'estrès i estudis preclínics mostren que una exposició repetida a l'estrès causa inhibició sobre les ramificacions dendrítiques, atròfia de les neurones en l'hipocamp i en el còrtex prefrontal, alhora que pèrdua de glia (7–9).

Els estudis de neuroimatge estructural en pacients depressius mostren una reducció del volum de les regions límbiques implicades en la depressió, principalment de l'hipocamp i del còrtex prefrontal que controlen l'emoció, l'humor i la cognició. La reducció del volum de l'hipocamp

observada en imatges cerebrals i en estudis post-mortem es relaciona amb la durada de la malaltia però també pot precedir l'inici de la depressió en alguns pacients (10–12). Respecte a aquestes alteracions, cal tenir en compte que les reduccions en el volum regional del cervell observades en la depressió no han de ser necessàriament permanents i poden ser revertides de manera efectiva amb un tractament antidepressiu que assoleixi la remissió (13,14), el que subratlla la importància de la intervenció primerenca per evitar el dany cerebral permanent. Els canvis volumètrics de la substància grisa o blanca general també proporcionen un biomarcador útil per l'estat estructural del cervell, la durada de la malaltia depressiva i el risc de recaigudes, ja que les reduccions volumètriques podrien donar lloc a una elaboració deficient dels estímuls emocionals indicant la necessitat de tractament continuat (13,15).

El model de circuits cerebrals que intervenen en la depressió es basa en els estudis d'imatges estructurals i funcionals i els estudis cerebrals post-mortem (16) (Figura 1). En aquest model, el circuit que es veu afectat en la depressió implica projeccions bidireccionals de l'escorça prefrontal orbital i medial, dorsolateral i cingulat anterior (inclosa l'escorça subgenual), a l'amígdala, el nucli accumbens i els nuclis del tronc cerebral. S'observa una connexió reduïda entre l'hipocamp i el còrtex prefrontal, però també un increment de la connectivitat en altres regions, el que indica més una desregulació dels circuits que no un increment o una reducció global de la connectivitat. S'ha especulat una neuroplasticitat defectuosa en la comunicació entre l'escorça cingulada anterior, la prefrontal, hipocamp i amígdala, donant així origen a un processament alterat de la informació emocional (17,18).

No solament una disminució de la neuroplasticitat dóna alteracions, un augment de la neuroplasticitat pot contribuir a la simptomatologia depressiva i la presentació de nous episodis. L'amígdala mostra un augment de l'arborització dendrítica en resposta a factors d'estrès en lloc de les reduccions observades en l'escorça prefrontal i l'hipocamp (19). Un increment de la plasticitat dels nuclis de l'amígdala podria augmentar la vulnerabilitat a la depressió degut a un increment en la por o en el processament de l'amenaça. Això seria especialment important en el context de la recaiguda atès que els individus deprimits en remissió sovint mostren una major vigilància, el que provoca que fins i tot estressos modestos provoquin recaigudes.

Un altre factor a considerar és la neurogènesi que es defineix com la generació de noves neurones en certes regions del cervell adult (20). Un dels nínxols neurogènics és la zona subgranular del gir dentat que es troba dins de l'hipocamp. Les reduccions de la neurogènesi i la seva correcció amb el tractament antidepressiu podria ser un mecanisme per explicar les variacions en el volum de l'hipocamp (21,22), tot i que estudis posteriors mostren que l'ablació de la neurogènesi no sempre causa depressió, l'estrès no sempre disminueix la neurogènesi i hi ha efectes dels antidepressius independents d'aquest fenomen (20). També es va suposar que el nombre relativament baix de noves cèl·lules neurogèniques produïdes normalment en l'edat adulta seria una limitació, però un estudi de Spalding et al. 2013 mostra que un terç de les neurones de l'hipocamp està subjecta a canvi i hi ha un turn-over de l'1,75% de les neurones anualment, amb un lleuger descens durant la vellesa (23).

L'altra model teòric de la depressió postula que la depressió es deu a una disminució de la neurotransmissió de monoamines, especialment la serotonina i la norepinefrina. La depressió implica un funcionament anormal de molts neurotransmissors, entre ells les monoamines (serotonina, norepinefrina i dopamina), l'àcid gamma-aminobutíric (GABA) i el glutamat. Actualment es postula unes dinàmiques més complexes, incloses cascades intracel·lulars activades per les monoamines, que són les implicades en l'aparició de la depressió i de la resposta als medicaments antidepressius, alhora que altres factors en un context de vulnerabilitat individual (24). El sistema serotoninèrgic s'ha relacionat amb la neurobiologia de la depressió i serà tractat posteriorment de forma més àmplia. La disminució de la transmissió de dopamina i norepinefrina en la depressió s'ha observat en estudis animals, genètics, neuroquímics, de neuroimatge i post-mortem (25). Nombrosos estudis impliquen canvis del GABA i el glutamat, mostrant nivells elevats de glutamat, menors nivells de GABA en l'escorça occipital i reduccions anormals en les concentracions de glutamat/glutamina i GABA en l'escorça prefrontal dels pacients deprimits (26,27). Altres neurotransmissors i neuromoduladors com els endocannabinoides, el receptor CB1, l'acetilcolina, proteïna p11, i la substància P intervenen en la depressió (28,29).

L'atròfia neuronal, la disminució de la neurogènesi i l'alteració en la regulació de les monoamines produïdes per l'estrès poden ajudar a entendre la patofisiologia de la depressió (30,31). Una hipòtesi sobre el tractament de la depressió és que els antidepressius, que actuen a través de les monoamines, indueixen gradualment plasticitat en xarxes neuronals corticals i remodelació, produint-se un increment en l'expressió de factors neurotròfics, principalment del BDNF. La recuperació clínica estaria associada a la inducció d'una apropiada plasticitat i a la recuperació dels circuits que funcionen malament (32). El BDNF sembla estar implicat en la depressió mitjançant la vinculació d'estrès, neurogènesi, i atròfia de l'hipocamp (33,34).

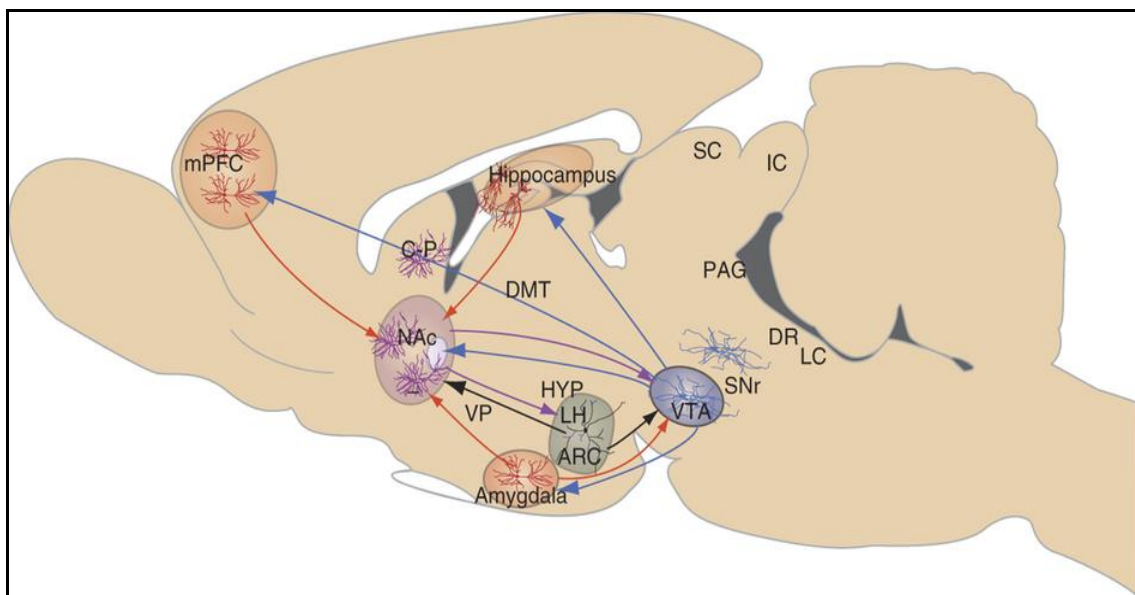


Figura 1: Estructures cerebrals implicades en la depressió Tipus de neurones i vies cerebrals: glutamatèrgiques (vermelles), GABAèrgiques (lil·les), peptídiques (negres) i dopaminèrgiques (blaves).

Llegenda: CP, caudate-putamen; DMT: tàlem dorsomedial; SC: superior colliculus; IC, inferior colliculus; VP, ventral pallidum; SNr, substantia nigra; PAG substància gris periaqueductal; DR: rafe dorsal; LC: locus coeruleus. Adaptació Scott J Russo 2012.

FACTOR NEUOTRÒFIC DERIVAT DEL CERVELL (BDNF)

El factor neurotròfic derivat del cervell (BDNF), és una proteïna dimèrica bàsica que forma part de la família de les neurotrofines i està relacionada estructuralment amb el factor de creixement neural (NGF), conservant la seva estructura i funció durant l'evolució. És la neurotrofina més abundant i àmpliament distribuïda en el sistema nerviós central (SNC) dels mamífers, estant present en el SNC central i en el perifèric i és expressada en grans quantitats en estructures límbiques. També és sintetitzat i alliberat pels astròcits (35). És essencial pel desenvolupament del SNC i per la plasticitat neuronal. El BDNF és secretat per les neurones en resposta a l'activitat neuronal, principalment a través de la via regulada o constitutiva i pot modular l'activitat neuronal espontània i l'estimulada (36). L'acció del BDNF en la senyalització de la sinapsi es produeix als segons de l'estimulació o alliberament del factor (37) i pot donar suport a processos de potenciació a llarg termini (LTP) a través de l'activació sostinguda de TrkB com a resultat de la traducció de proteïnes dendrítiques o la transcripció de BDNF. El BDNF facilita la LTP mitjançant la conversió LTP inicial a LTP final i potenciant l'activació subllindar per provocar la LTP (38,39). La LTP és la millora de la fortalesa sinàptica entre neurones que és iniciada mitjançant despolarització sincronitzada i aquest fenomen és considerat un model cel·lular dels processos d'aprenentatge i memòria associativa.

El gen de BDNF codifica un precursor de la proteïna (preproBDNF) que és escindit en el reticle endoplasmàtic a la proteïna precursora (ProBDNF) i posteriorment és processada proteolíticament per generar una proteïna madura més petita (mBDNF) (Figura 2). La pro-BDNF (35 kDa) és secretada de forma dependent de l'activitat juntament amb l'enzim activador del plasminogen tissular que escindeix pro-BDNF en BDNF madur (14 kDa) (40) però, pro-BDNF no és un precursor inactiu i ha demostrat tenir efectes en el sistema nerviós central que són independents del BDNF madur. Ambdues substàncies són actives via dos sistemes de receptors diferents: els receptors selectius Trk que contenen un domini citoplasmàtic per activitat tirosina kinasa i els receptors p75NTR que no són selectius i no discriminen entre les diferents neurotrofines (41). L'acció biològica de les neurotrofines pot ser regulada per l'acció proteolítica, amb les proformes activant preferentment p75NTR per intervenir en l'apoptosi i les

formes madures activant selectivament receptors Trk per promoure la supervivència. Si la neurotrofina no pot activar els receptors Trk, hi ha eliminació cel·lular a través del procés de mort activa per p75NTR (41).

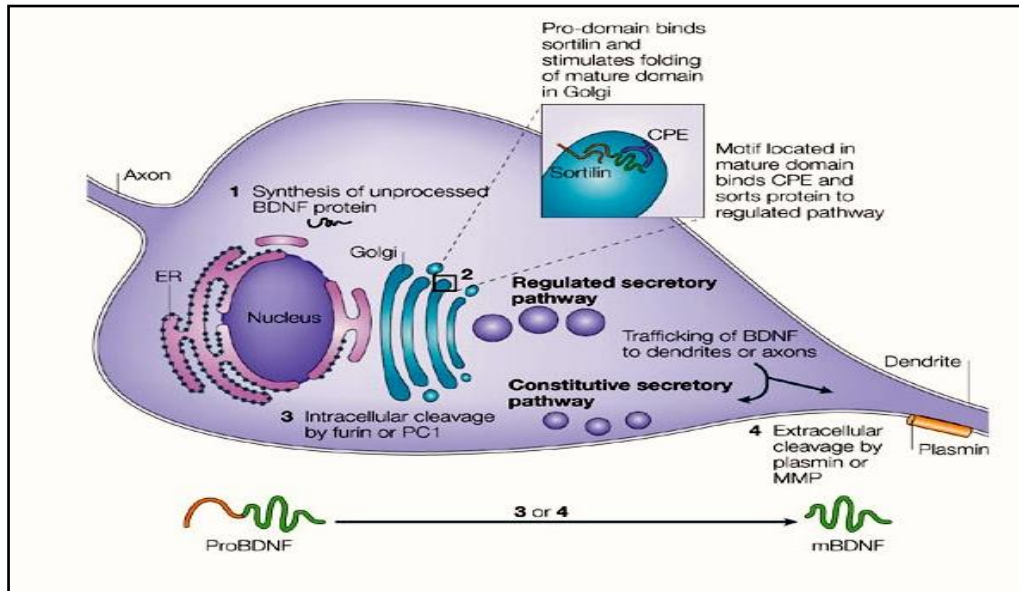
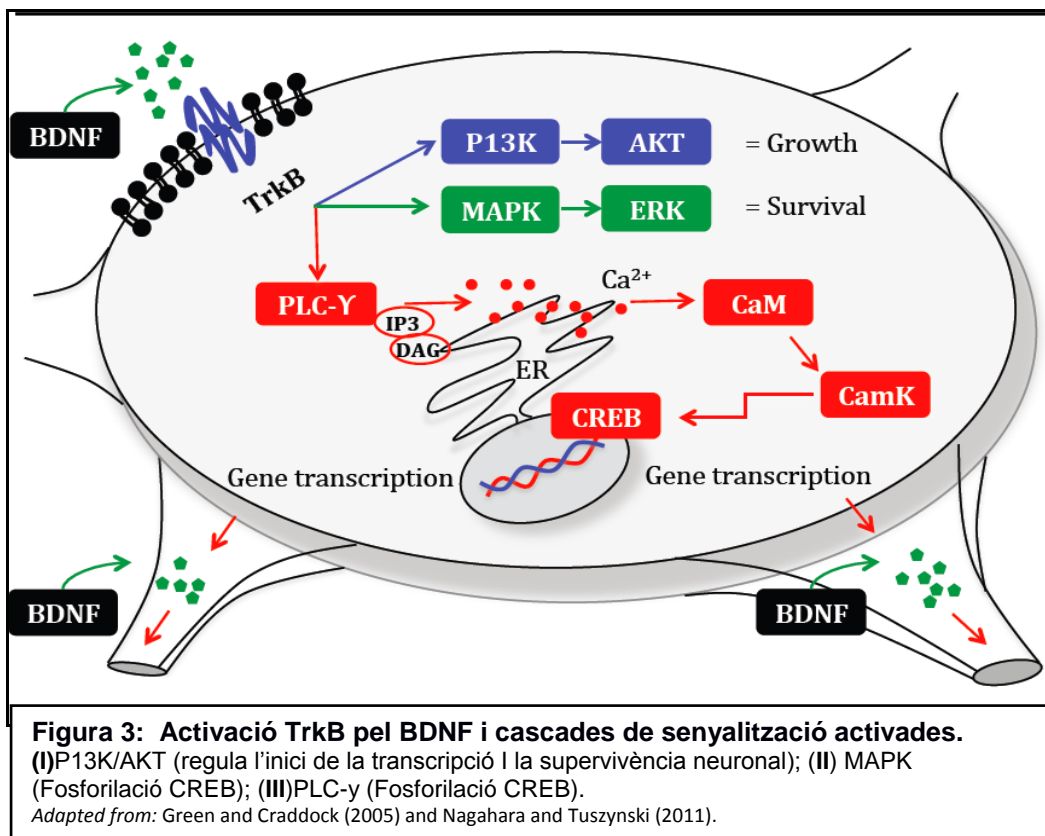


Figura 2: Síntesi i emmagatzematge del BDNF en una neurona.

Inicialment es sintetitza en el reticle endoplàsmic (ER) (1), el proBDNF s'uneix a la sortilina intracel·lular del Golgi per facilitar el futur plegament de la proteïna madura (2). Un motiu en el domini madur de BDNF s'uneix a la carboxipeptidasa E (CPE), una interacció que emmagatzema el BDNF en grans vesícules denses, que són un component de la via secretora regulada. En absència d'aquest motiu, el BDNF es classifica en la via constitutiva. Després de la decisió respecte emmagatzematge, el BDNF és transportat cap al lloc apropiat per l'alliberació, siguin dendrites o axons. En alguns casos, el prodomini no és escindit intracel·lularment mitjançant les furines o proteïnes convertases (PC1) (3), pel que el proBDNF pot ser alliberat per les neurones. Proteïnes extracel·lular, tals com la metaloproteïnes o la plasmina, poden escindir la pro regió per formar BDNF madur. Lu et al., 2005

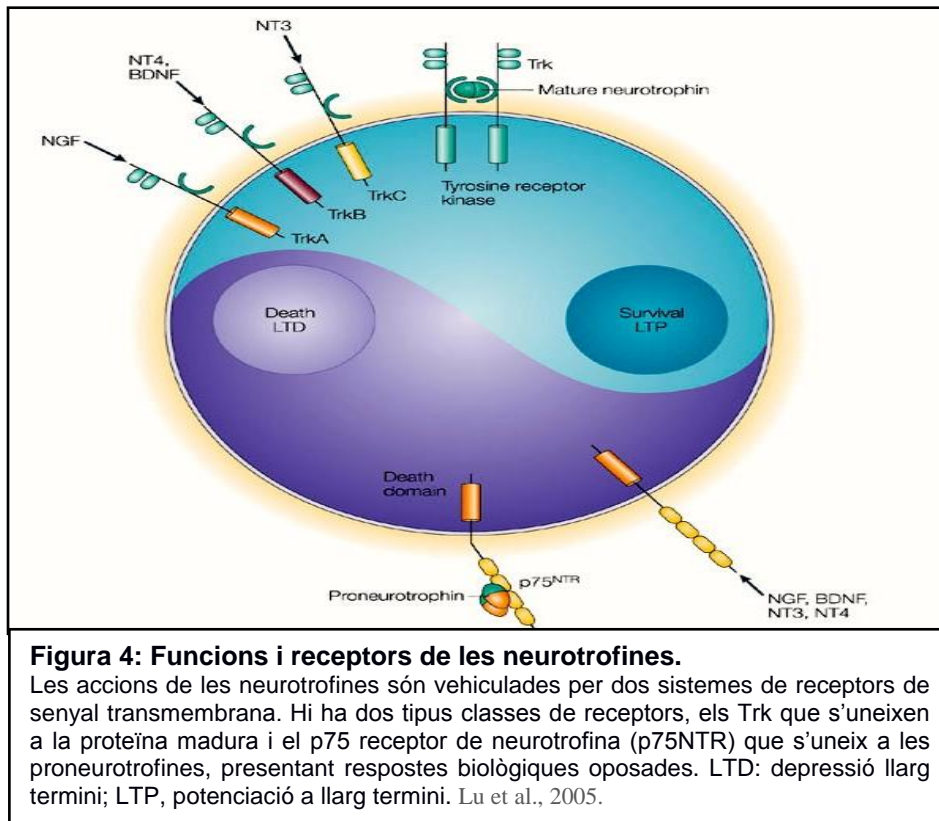
Els efectes més estudiats del BDNF són els intervinguts a través de la unió del mBDNF a TrkB. Ambdós són altament expressats en el cervell adult. Quan el BDNF s'uneix a TrkB, hi ha almenys tres vies de transducció de senyals que es poden activar (Figura 3) (42,43). En estadis prenatals intervenen en la supervivència i diferenciació de subpoblacions neuronals. En neurones immadures el BDNF està implicat en el creixement, diferenciació, maduració i supervivència de neurones dopaminèrgiques, GABAèrgiques, colinèrgiques i serotoninèrgiques (44). En les neurones madures, el BDNF juga un paper important en la plasticitat sinàptica, mitjançant el creixement i remodelació axonal i dendrítica, la formació i funció de les sinapsis (45), l'increment de la neurotransmissió i la regulació de la sensibilitat del receptor (35). La pèrdua experimental de la senyalització de BDNF a través de models genètics o la manipulació

farmacològica condueix a l'alteració de la LTP (46) i a la disminució d'aprenentatge i de la memòria (47). El BDNF intervé en l'adaptació de les xarxes neural que són responsables de diferents aspectes de la regulació emocional (48,49) mitjançant modificacions estructurals i funcionals que permeten la seva reorganització en resposta a estímuls de l'entorn (45,50).



Els altres efectes del BDNF són via ProBDNF, la qual s'uneix preferentment a p75NTR, que activa diferents cascades de senyalització intracel·lular que estan relacionades amb l'activació del senyal apoptòtic i la iniciació de la depressió a llarg termini de la transmissió sinàptica dependent del receptor NMDA a l'hipocamp (51), fent una disminució de la complexitat dendrítica i de la densitat d'espines en les neurones de l'hipocamp. Les neurotrofines utilitzen el receptor mortal per podar les neurones eficientment durant els períodes de mort cel·lular que

es produeixen durant el desenvolupament. La mort provocada per efecte proapoptòtic de p75NTR s'ha observat durant l'estrès, la inflamació i les lesions(52) (Figura 4).



En els períodes crítics de la plasticitat cerebral que es produeixen durant el desenvolupament, el cervell presenta elevada sensibilitat als efectes ambientals provocant modificacions a llarg termini que impliquen aspectes estructurals i funcionals de l'activitat cerebral. L'expressió de BDNF es veu afectada tant per estrès agut com crònic. S'ha proposat que els canvis cerebrals poden resultar de les modificacions epigenètiques causades per les condicions de vida adverses en fases inicials de la vida (53). Aquestes modificacions dels gens clau són un mecanisme mitjançant el qual les primeres experiències poden tenir un efecte a llarg termini- potencialment tota la vida- sobre l'expressió gènica i, en conseqüència, sobre la funció cerebral i el comportament. Respecte als canvis provocats per experiències adverses inicials de la vida s'ha observat metilació del gen BDNF i alteracions en l'expressió del gen BDNF cortical amb efectes al llarg de la vida però també transgeneracionals (54). L'acció farmacològica que impedeix aquesta metilació modifica aquestes alteracions.

S'ha trobat un polimorfisme del BDNF localitzat en el nucleòtid de la posició 196 que implica el canvi d'una valina per metionina. El polimorfisme Val66Met s'ha associat amb una reducció en el processament i secreció de la proteïna BDNF a través de les vies de secreció regulades i amb alteracions en el trànsit intracel·lular del BDNF en neurones de l'hipocamp (55). Aquest polimorfisme està associat a alteracions en l'anatomia cerebral i en la memòria i pot jugar un paper important en la resposta individual a la teràpia antidepressiva. Els individus amb l'al·lel met tenen una activació hipocampal anormal, pitjor memòria episòdica i de reconeixement verbal, volums hipocampals més petits, però també de tàlem, gir parahipocampal i amígdala, encara que hi ha estudis que no mostren aquesta correlació (56). En els darrers anys s'ha relacionat aquests individus amb major susceptibilitat als efectes ambientals negatius i als diversos estressos al llarg de la vida, presentant un major risc de depressió en aquestes situacions (57). Els individus amb l'al·lel met mostren uns nivells de BDNF en sèrum reduïts, independentment del sexe i clínica depressiva (58). L'al·lel Met incrementa el risc de depressió en homes però no en dones, tot i que estan distribuïts de la mateixa manera entre sexes i que no s'observen diferències en el BDNF plasmàtic ni sèric entre dones i homes (59).

El BDNF no solament es produeix a nivell cerebral i hi ha diverses fonts cel·lulars potencials de BDNF incloent les cèl·lules endotelials vasculares, les del múscul llis, els macròfags i els limfòcits activats (60–62). Les taxes de BDNF sèriques són 100 més elevades que els valors plasmàtics suggerint un emmagatzematge tissular d'aquest marcador (63). El BDNF és emmagatzemat en grans quantitats dins dels grànuls alfa de les plaquetes sanguínies a través d'un procés d'internalització del BDNF plasmàtic i alliberats posteriorment a l'activació plaquetària induïda per diferents agonistes (Trombina i col·lagen) (64). S'ha demostrat que la quantitat de BDNF en sèrum és quasi idèntic a la quantitat de BDNF trobat en plaquetes lisades (64) i la diferència entre els nivells en plasma i en sèrum semblen reflectir les quantitats de BDNF emmagatzemades en les plaquetes circulants. Una part substancial del BDNF circulants podria originar-se a les neurones i a les cèl·lules gials del sistema nerviós central (65,66). L'explicació podria ser l'existència d'un transport bidireccional de BDNF que creua la barrera hematoencefàlica, consistent en un sistema de transport actiu saturable d'alta capacitat de

BDNF que passa de la sang al cervell i que es reabsorbeix des del líquid cefaloraquídi a la sang (66,67) i la quantitat de BDNF plasmàtic podria ser considerada un reflex parcial de la secreció de BDNF pel sistema nerviós central (68). També cal tenir en compte que hi ha factors endògens i exògens susceptibles de modificar les taxes de neurotrofines circulants i tissulars, alhora que hi ha una variació circadiana dels nivells circulants en sang de neurotrofines. S'ha considerat com a factors que influeixen en la dinàmica de formació i alliberació de neurotrofines la llum, l'activitat física, la glucosa en sang, l'edat, l'obesitat i alguns tractaments (68).

La seva presència i abundància en el cor, la melsa, la pell, l'endoteli vascular, les plaquetes i el plasma suggereixen un paper fisiològic en la biologia dels teixits no cerebrals. L'emmagatzematge de BDNF plaquetàriament pot jugar un paper durant el traumatisme tissular o lesió del nervi mitjançant l'alliberació del seu contingut en el lloc de la lesió. El BDNF també podria actuar com un enllaç entre el sistema nerviós i l'immunològic, ja que la neurotrofina biològicament activa és produïda per les cèl·lules immunes en diversos processos inflamatoris (69). A més d'això, una regulació a l'alça de l'expressió de BDNF de forma aguda s'ha demostrat en un model experimental de lesió nerviosa (70), juntament amb un paper funcional en l'autoimmunitat neuroprotectora (71). Una altra funció en la qual està implicat el BDNF és en el creixement de les cèl·lules tumorals (72). En l'àmbit cardiovascular, la participació del BDNF es discutirà més endavant

BDNF EN LA DEPRESSIÓ

Hi ha evidències sòlides de la importància de les neurotrofines en la regulació de l'humor (73,74). L'etiologia de la depressió seria causada per una alteració en el balanç entre la mort neuronal i la neurogènesi (75). L'estrès, que és un factor de risc per depressió major, s'ha relacionat repetidament amb baixos nivells d'expressió de BDNF en models animals i reducció en la llargada i nombre de branques de les neurones CA3 de l'hipocamp (56). En estudis postmortem de pacients depressius i víctimes de suïcidi s'observa una disminució del BDNF a l'hipocamp (8,76). Aquesta zona és on es produeix el procés de neurogènesi adulta, el que implica una relació entre el BDNF i la neurogènesi. Però no tots els estudis han trobat una

reducció del BDNF en l'hipocamp i una possible explicació per aquest fet és que els estudis utilitzen diferents protocols d'estrès i es conclou que els efectes de l'estrès en el BDNFmRNA de l'hipocamp són dependents de diversos factors: a) el tipus d'estressor: la seva intensitat, duració, freqüència, nombre d'exposicions, ...; b) el procediment utilitzat per mesurar els nivells de BDNF i c) les isoformes mesurades en cada estudi (56). Altres àrees com el còrtex prefrontal també mostren canvis en l'expressió del BDNF enfront de l'estrès (56).

Els estudis clínics han trobat nivells de BDNF més baixos en pacients depressius que en subjectes sans mentre que els tractaments antidepressius promouen un increment d'aquests nivells (77). En alguns estudis aquests nivells de BDNF disminuïts s'han correlacionat amb puntuacions superiors en les escales d'avaluació de la depressió (78), encara que hi ha estudis que no han trobat aquesta correlació (79,80). Cal destacar que alguns estudis han suggerit una especificitat de gènere respecte als nivells de BDNF durant la depressió, mostrant que els homes mostren nivells en sèrum superiors als de les dones (58).

La darrera metanàlisi publicada (81) conclou que hi ha concentracions de BDNF en sèrum baixes en els pacients depressius sense tractament respecte als controls sans i als pacients en depressió tractats. No obstant això, quan es tenen en compte els biaixos de publicació, la mida de l'efecte esdevé substancialment més petit que en els estudis anteriors (78,82,83), alhora que no troba associacions consistents entre les concentracions de BDNF sèric i la gravetat de la simptomatologia depressiva. Aquestes diferències respecte a estudis anteriors es poden deure a característiques no avaluades en els estudis com el consum d'alcohol, consum de tabac, problemes d'insomni, estacionalitat o exposició al trauma, ... a l'heterogeneïtat de la malaltia depressiva o al fet que els dissenys tenen baixa potència i hi ha biaixos de publicació que fan que calgui fer una interpretació crítica dels resultats. Els autors finalitzen l'article destacant que les menors concentracions perifèriques de BDNF en la depressió i la regulació a l'alça en el curs del tractament antidepressiu poden ser un epifenomen resultant de l'expressió alterada del BDNF o del seu metabolisme en els òrgans perifèrics.

Hi ha pocs estudis que avaluen els nivells de BDNF intraplaquetaris. Els dos estudis que avaluen els nivells de BDNF en plaquetes de forma directa mostren reduccions en els nivells de BDNF en plaquetes, però aquests dos estudis no han avaluat els efectes del tractament (84,85). La resta d'estudis avaluen els nivells en plaquetes a partir de la diferència entre sèrum i plasma, ja que les plaquetes és el principal magatzem de BDNF.

EFFECTE DELS ANTIDEPRESSIUS SOBRE EL BDNF

La infusió de BDNF a regions de l'hipocamp i del cervell mitjà mostren un efecte similar als antidepressius en models animals en situacions d'estrès. També s'ha demostrat que la infusió del BDNF promou la funció, poda i creixement de neurones serotoninèrgiques en el cervell adult de rates i incrementa els nivells de noradrenalina a l'hipocamp (63,86–88). No obstant això, aquest efecte és específic de certes àrees cerebrals, ja que la infusió de BDNF en l'àrea tegmental ventral (VTA) o en nucli acumbent incrementa els comportaments depressius i aquests efectes són contrarestats per inhibidors del BDNF que fan una funció antidepressiva (89).

L'administració de fàrmacs antidepressius ha demostrat un augment en els nivells de BDNF en models animals (7), tant a escala circulant com un augment de l'expressió de BDNF en l'hipocamp (48). El bloqueig del SERT pels ISRSs incrementen els nivells de BDNF mitjançant l'increment de la serotonina extracel·lular i la fosforilació de CREB (cAMP response element-binding), un factor de transcripció nuclear que regula la transcripció de BDNF (90) (Figura 5). De la mateixa manera, els entorns d'exercicis aeròbics i enriquits solen augmentar el BDNF hipocampal i els seus efectes de tipus antidepressiu depenen d'una neurogènesi intacta (91,92). Aquests canvis s'observen durant els tractaments prolongats i no en fase aguda i la durada del tractament antidepressiu que porta als efectes terapèutics inicials presenta una bona correlació amb els dies de tractament repetit que es requereixen per observar un augment en l'expressió de BDNF i TrkB (93). El BDNF és necessari per a una resposta al tractament

antidepressiu però una deleció parcial del BDNF no és suficient per provocar un fenotip depressiu (56). Per tant, es pot considerar que la neuroplasticitat, la neurogènesi i la sinaptogènesi induïda per la teràpia antidepressiva poden ser realitzades, almenys en part però no totalment, a través de BDNF (94).

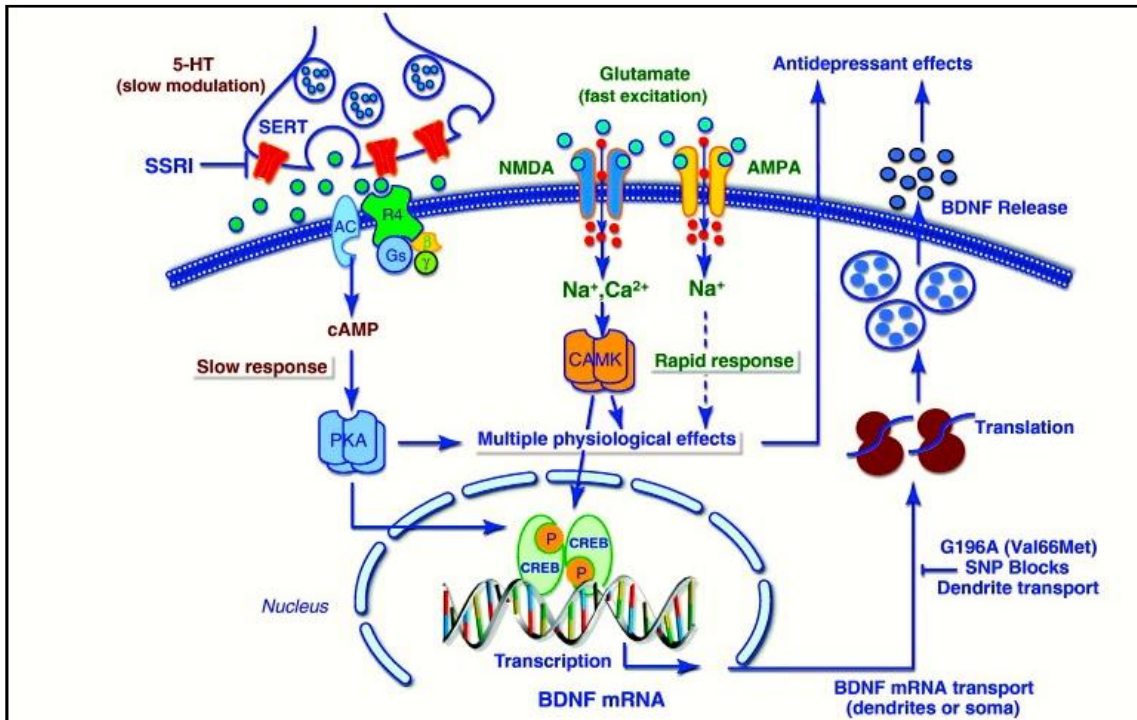


Figura 5: Vies de senyalització regulades pel tractament crònic amb antidepressius.

Els antidepressius inhibidors de la recaptació de la 5-HT (SSRI), inhibeixen la recaptació de 5-HT pel bloqueig del transportador de 5-HT (SERT). Això provoca la regulació dels receptors postsinàptics acomplats a proteïna G, els quals s'uneixen a una sèrie de sistemes de segons missatge, incloent la proteïna quinasa A-cAMP i la via CREB. Aquests efectes requereixen el tractament crònic amb SSRI, provocant la desensibilització dels autoreceptors 5-HT. Contràriament, el glutamat produeix una ràpida excitació de les neurones via estimulació dels receptors ionotròfics, incloent receptors AMPA i NMDA, resultant en una ràpida despolarització i de senyalització intracel·lular, com la inducció de proteïna quinasa dependent de Ca²⁺-calmodulin (CaMK). Aquests dos neurotransmissors provoquen la regulació de múltiples respostes fisiològiques, incloent la regulació de la plasticitat sinàptica i l'expressió gènica. Una de les substàncies regulades per aquestes vies és el BDNF. El polimorfisme genètic Val66Met evita el transport dins de la dendrita, empitjorant l'alliberació de BDNF.

SNP, single nucleotide polymorphism. Sternberg, 2012

Els ratolins amb mutacions del BDNF amb la variació met del gen del BDNF exhibeixen nivells d'ansietat superiors que no poden revertir-se amb l'antidepressiu fluoxetina, implicant que es requereix el BDNF en l'eficàcia terapèutica de l'antidepressiu (95). Els ratolins amb receptors TrkB sobreexpressats i una millor senyalització de BDNF i els ratolins salvatges que se'ls va administrar fluoxetina van mostrar resistència en models animals de depressió (96). Els efectes

antidepressius de la ketamina estan bloquejats en rates BDNF-knockout (95,97). Per tant, el BDNF també regula la funció de receptors NMDA i la maduració sinàptica (98) i l'efecte de la ketamina pot ser més ràpid perquè actua sobre l'alliberació de BDNF dependent d'activitat, mentre els altres antidepressius no actuen sobre l'alliberació. En resum, els antidepressius provoquen un increment i un manteniment adequat de la connectivitat sinàptica, permetent que es reinstauri el funcionament òptim dels circuits implicats en l'afecte (30).

Malgrat que hi ha prou evidència de la resposta del BDNF al tractament antidepressiu, altres treballs han descobert diverses excepcions notables (99,100). Algunes de les discrepàncies entre els resultats dels estudis de BDNF podria estar relacionat amb el fet que la proteïna es processa enzimàticament de manera complexa. La proteïna BDNF madura sembla ser induïda més ràpidament que mRNA, el que pot tenir diverses explicacions: estar elevades per mecanismes posttranscripcionals o per canvis en el processament de pro-BDNF mitjançant els enzims proteolítics (101) o altres mecanismes no descoberts. En última instància, les diferències en el moment de l'exposició i la naturalesa dels antidepressius o estímul probablement influeixen de forma única en el processament posttraduccional de BDNF, així com la maquinària transcripcional del promotor de BDNF i altres regions reguladores.

Els estudis en humans, una metanàlisi de 8 estudis clínics va estudiar la concentració mitjana de BDNF en sèrum abans i després del tractament antidepressiu, mostrant un increment del BDNF durant el tractament antidepressiu, assolint-se nivells de BDNF similars als del grup control sa (82). Una segona metaanàlisi (78) va confirmar aquests resultats i va reportar una correlació significativa entre els canvis en la concentració de BDNF sèric i els canvis en la gravetat de la depressió.

Hi ha menys estudis sobre la relació entre BDNF plasmàtic i resposta al tractament antidepressiu en la depressió. La concentració mitjana de BDNF plasmàtic és significativament inferior en els pacients depressius en fase aguda comparat amb els controls sans i s'incrementa durant la teràpia antidepressiva eficaç (80,102,103), mentre que no s'observaven canvis estadísticament significatius en els nivells de BDNF plasmàtic en el grup de no

responedors (103). Els estudis que han investigat el BDNF en sèrum i en plasma suggereixen que aquestes molècules són marcadors de resposta al tractament independents i que el plasma podria ser un marcador d'estat de depressió, el qual s'incrementa amb el tractament antidepressiu efectiu (83,104). Dell'Osso et al. 2010 mostra que el BDNF plasmàtic està associat amb la gravetat de la malaltia, la recurrència i els símptomes en pacients depressius (102). L'estudi de Dreimüller 2012 troba que hi ha un increment del BDNF plasmàtic que pot produir-se ràpidament després d'iniciar-se el tractament antidepressiu, en 7 dies (105).

SEROTONINA

La serotonina (5-HT) és derivada de l'aminoàcid essencial L-triptòfan. El sistema serotoninèrgic és filogenèticament antic i està implicat en múltiples funcions que inclouen el control de l'humor, el son, la ingesta, funcions cognitives com l'aprenentatge i la memòria i els comportaments relacionats amb la recompensa i la predicció de càstig. Respecte a la localització, la trobem en un 90% en el tracte gastrointestinal amb la funció de contracció del múscul llis, en un 8% en els grànuls densos de les plaquetes i en el plasma, implicada en l'agregació plaquetària i exercint un efecte vasoconstrictor, i al voltant de l'1% en les terminacions nervioses actuant com a neurotransmissor (106). Aquest sistema ha de respondre ràpidament als senyals, mentre assegura l'homeòstasi. Una visió més recent indica que la serotonina incrementa la sensibilitat als estímuls ambientals, fent de medidora de les respostes adaptatives als canvis ambientals i assenyalant la disponibilitat de recursos o la presència d'amenaça (107).

El sistema serotoninèrgic consta de 14 receptors de 5-HT, agrupats en 7 subfamílies, que posseeixen una estructura heptahelicoidal i estan units a proteïnes G, excepte els receptors 5-HT_{3A} i 5-HT_{3B} que s'uneixen a canals d'ions i un transportador de la recaptació de serotonina. Els receptors de serotonina estan presents en múltiples localitzacions i amb funcions pleiotròpiques (108). De tots els receptors, el 5-HT_{2A} és d'especial interès en la clínica perquè

intervé en diverses de les funcions fisiològiques de la 5-HT. Aquests receptors s'han trobat en diferents parts del sistema nerviós central i perifèric, inclosos el còrtex cerebral, ganglis basals, hipocamp, tàlem, cerebel i hipotàlem (Figura 6). En la perifèria es localitza en les plaquetes i en el múscul llis (108). S'ha implicat en la contracció del múscul llis vascular i extravascular i en l'agregació plaquetària (109). El receptor 5-HT_{2A} s'ha vist implicat en l'activació de la fosfolipasa C (mobilització de calci intracel·lular) i de la fosfolipasa A₂ (alliberació d'àcid araquidònic).

La disponibilitat de 5-HT està estrictament limitada per un mecanisme selectiu i actiu de recaptació que actua a través d'una proteïna específica, el transportador de 5-HT. S'ha trobat un únic transportador de la recaptació de la serotonina (SERT), que és el mecanisme principal de regulació dels nivells de serotonina a la sinapsi i de finalitzar l'activitat del neurotransmissor. L'activitat del SERT està regulada pels receptors 5-HT_{2B} (110) que operen en les neurones primàries del nucli de rafe i controlen el sistema de transport de la serotonina global. En absència de serotonina externa, el receptor 5-HT_{2B} s'acobla a la producció d'òxid nítric que assegura la fosforilació del transportador de serotonina a nivells basals i la recaptació màxima de serotonina. Si hi ha presència de 5-HT, el receptor 5-HT_{2B} s'acobla a proteïna kinasa C per promoure fosforilacions addicionals del transportador de serotonina i de la subunitat Na⁺, K⁺-ATPase, empitjorant el gradient electroquímic necessari per a la recaptació de serotonina. Aquest mecanisme està inhibit per diferents substàncies (antidepressius, cocaïna, amfetamines, ...). El SERT es troba a les terminals presinàptiques i en els axons i cossos cel·lulars serotoninèrgics del nucli del rafe, seguit per hipotàlem, amígdala, putamen, caudat, hipocamp, ínsula i còrtex prefrontal i cerebel·lós (111) i a nivell perifèric també s'ha trobat en les cèl·lules epitelials de l'intestí (112), en el cor, en la glàndula suprarenal, en els vasos sanguinis, en plaquetes (113) i en limfòcits (114).

Existeix una variació genètica del transportador de serotonina en el cromosoma 17q11.2-q12 que inclou un polimorfisme del promotor d'aquest gen (5-HTTLPR). És un polimorfisme per inserció/deleció, on un segment del parell de bases 44 és present (L al·lel) o absent (S al·lel). Aquest gen afecta la velocitat de recaptació de serotonina, disminuint l'expressió de SERT i la seva activitat de recaptació. Les dades de funcionalitat indiquen que l'al·lel S redueix la

transcripció (115) i aquest al·lel s'ha associat amb susceptibilitat amb la depressió major, tot i que aquesta troballa no és universal (116,117) i està relacionada amb la presència d'estrès o estímuls negatius perquè es presenti aquesta associació. L'al·lel S també s'ha relacionat amb un fenotip d'ansietat incrementada i major resposta a estímuls de por, alhora que a una menor resposta a ISRS (118).

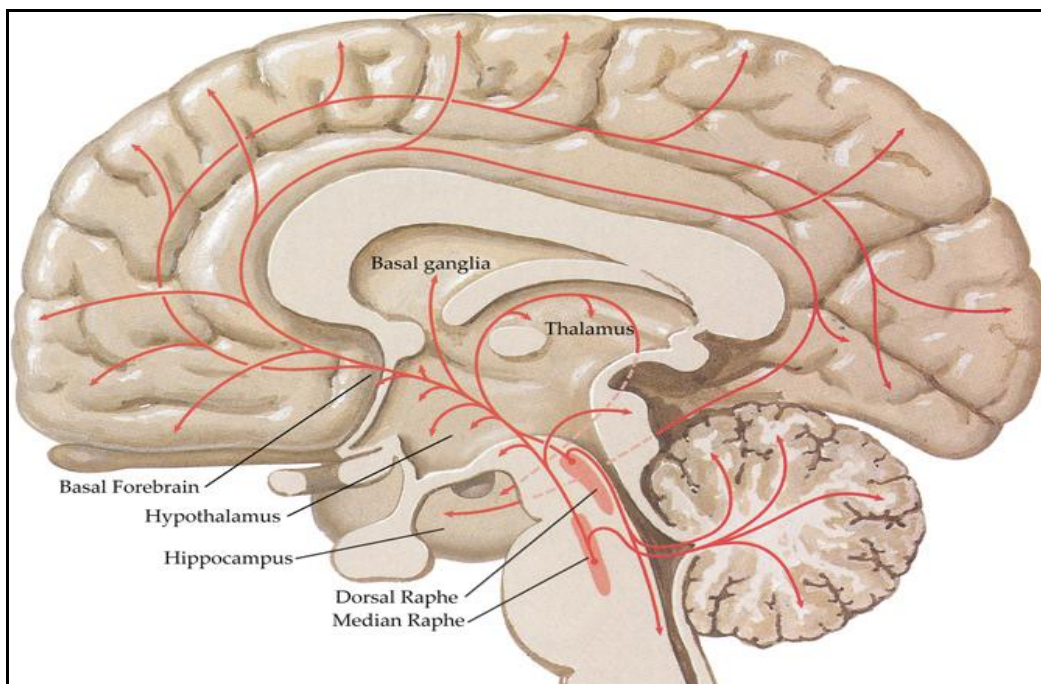


Figura 6: Representació esquemàtica dels sistema serotoninèrgic central humà.

Adaptació de Feltenand and Shetty, 2010

IMPLICACIÓ SEROTONINA EN LA DEPRESSIÓ

No hi ha una anomalia única en el sistema serotoninèrgic que sigui comú a la majoria de pacients amb depressió major i cal destacar que hi ha molts factors de control neuronal sobre la concentració sinàptica de 5-HT i sobre la resposta postsinàptica d'aquesta com serien: la disponibilitat de triptòfan, les variants genètiques de la hidroxilasa 2 triptòfans, els receptors 5-HT_{1A} del cos neuronal, els autorreceptors 5-HT_{1B} terminals, el SERT, les monoamines oxidases

que inactiven 5-HT i els polimorfismes dels diferents receptors 5-HT postsinàptics. Si hi ha una anomalia única, aquesta pot conferir solament un lleuger increment del risc de desenvolupar depressió. És possible que examinant diversos factors que controlen la transmissió serotoninèrgica s'enfortiria el vincle directe entre la deficiència del sistema 5-HT i la depressió major (119).

Algunes de les troballes en pacients deprimits són una disminució de la concentració del metabòlit de la serotonina, baixa densitat de receptors SERT principalment en el còrtex prefrontal ventral (120), increment del nombre de receptors postsinàptics 5-HT_{1A} (121) i una baixa concentració de triptòfan que s'utilitza per a la síntesi de serotonina. Un model experimental de depleció de triptòfan, l'aminoàcid precursor requerit per a la síntesi central de la serotonina, provoca una recaiguda greu aguda en els pacients en remissió de la depressió major tractament amb inhibidors selectius de la recaptació de serotonina (122).

SEROTONINA I FÀRMACS:

La recaptació de serotonina per la sinapsi es pot manipular mitjançant fàrmacs i les vies de la serotonina (5-HT) continuen essent una diana important dels fàrmacs psicotròpics. Els antidepressius ISRSs i alguns tricíclics incrementen la neurotransmissió serotoninèrgica, almenys en part, per bloqueig dels llocs d'unió de la serotonina amb el SERT. Els diferents ISRSs s'uneixen al transportador de serotonina amb una taxa d'ocupació similar però diferent durada i potència. Aquesta inhibició prevé la recaptació de la 5-HT dintre de la neurona (123) i incrementa la quantitat de serotonina en l'esclètxa sinàptica, on està lliure per viatjar a receptors més distants i continuar reaccionant amb receptors propers. L'increment inicial en la serotonina es produeix sobretot en el cos cel·lular i en les dendrites localitzades en el rafe mesencefàlic a causa del bloqueig del SERT en aquella regió però no tant en l'axó terminal. Quan els nivells de serotonina s'incrementen en l'àrea somatodendrítica, estimulen els autorreceptors 5-HT_{1A} d'aquesta regió i la freqüència d'alliberació de les neurones serotoninèrgiques està inhibida. Aquests efectes farmacològics immediats no expliquen les

accions terapèutiques però si els efectes secundaris inicials. L'estimulació prolongada dels autoreceptors 5-HT_{1A} somatodendrífics produeix una regulació a la baixa d'aquests autoreceptors i la seva desensibilització, provocant una desinhibició de l'alliberació de serotonina als axons terminals i un increment del flux d'impuls neuronal, que correspondria a l'inici de l'acció terapèutica. L'increment d'alliberació de la serotonina als terminals, en presència d'una bomba de recaptació de serotonina inhibida, incrementa la disponibilitat de serotonina en la sinapsi i provoca que els receptors postsinàptics serotoninèrgics també es desensibilitzin. Per tant, la millora clínica amb ISRS no es deu a la mera inhibició de la recaptació, perquè la injecció aguda d'antidepressiu no produeix aquest efecte, sinó que cal que l'autoreceptor del terminal que controla l'alliberament de 5-HT a la sinapsi es desensibilitzi igual que el seu company del cos cel·lular que controla l'activitat d'alliberació (119,124).

Respecte a altres tractaments no selectius de la serotonina, l'administració a llarg termini dels antidepressius tricíclics (ADT) sensibilitzen la resposta dels receptors 5-HT postsinàptics en les estructures del cervell anterior (125) i la teràpia electroconvulsiva de forma repetida causa una millora de la neurotransmissió serotoninèrgica. Altres fàrmacs que inicialment no actuen sobre la serotonina però que són efectius per la depressió, com el pramiprexol, l'agomelatina i alguns antipsicòtics, també mostren un increment de la transmissió de serotonina (119).

SEROTONINA I BDNF

La serotonina i el BDNF modulen les respostes conductuals a l'estrès i intervenen en l'eficàcia terapèutica dels antidepressius a través de mecanismes neuroplàstics i epigenètics. La comunicació entre aquests dos sistemes és bidireccional i pot ser crucial per controlar la funció cerebral, el manteniment de la neuroplasticitat i la seva resposta a estímuls ambientals (Figura 7). Modificacions negatives en aquestes dues substàncies durant els períodes crítics del desenvolupament poden afectar el desenvolupament cerebral, reduir la resiliència als canvis ambientals i provocar alteracions fenotípiques que s'observen tota la vida. Conèixer les

relacions entre 5-HT i BDNF pot incrementar el coneixement de l'etiologia de les malalties mentals i portar a la identificació de noves dianes moleculars útils pel tractament (126). Una regió en què els dos sistemes convergeixen és l'hipocamp, també implicat en la depressió i en el tractament antidepressiu.

El BDNF influeix en el fenotip, la maduració, la plasticitat estructural i la funció de les neurones serotoninèrgiques. El BDNF i el seu receptor TrkB estan expressats en les neurones serotoninèrgiques en el nucli del rafe (90,127) i el BDNF de l'hipocamp és transportat retrògradament a les neurones del nucli del rafe (128). L'exposició prolongada de BDNF en l'hipocamp disminueix els nivells de receptors 5-HT_{2A}, però no s'observen canvis en els nivells del receptor 5-HT_{1A} (129). La regulació del fenotip serotoninèrgic s'observa a través d'un bucle auto/paracrí en què l'activació dels autoreceptors 5-HT_{1A} per la 5-HT provoca una regulació a l'alça de BDNF i una activació de TrkB que, al seu torn, promou la maduració del fenotip serotoninèrgic. El tractament antidepressiu pot engegar el circuit de feedback positiu que porta a un increment en el BDNF, millorant el funcionament del sistema serotoninèrgic que condueix a més BDNF (126). El BDNF també pot influir indirectament el desenvolupament del sistema serotoninèrgic a través de les cèl·lules glials. La infusió local de BDNF en rates mostra un efecte protector per l'increment de brotació regenerativa dels axons 5-HT, alhora que s'incrementen els nivells del metabòlit de la serotonina en l'hipocamp, estriat, còrtex i substància negra i un increment del turn-over de 5-HT. L'activació de TrkB incrementa la funció del receptor 5-HT_{1A} en hipocamp (130). La injecció de BDNF a l'hipocamp mostra una reducció del comportament de desesperació, però un increment de l'ansietat aguda i el bloqueig dels receptors 5-HT_{1A} reverteix els efectes ansiogènics del BDNF (126,131,132).

La disminució de l'expressió de BDNF comporta canvis funcionals en el sistema serotoninèrgic, expressats com una reducció de la funció dels receptors 5-HT_{1A} i del SERT en l'hipocamp i un dèficit greu del receptor 5-HT_{2A} en el còrtex prefrontal i en el nucli dorsal del rafe (126). Estudis en animals BDNF^{+/-} no mostren lesions estructurals dels axons serotoninèrgics i mostren nivells normals de 5-HT, però s'observa una alteració dels nivells de SERT i una insensibilitat a ISRS. En mutacions Val66Met del BDNF s'observa una reducció del 30% en l'alliberació de BDNF

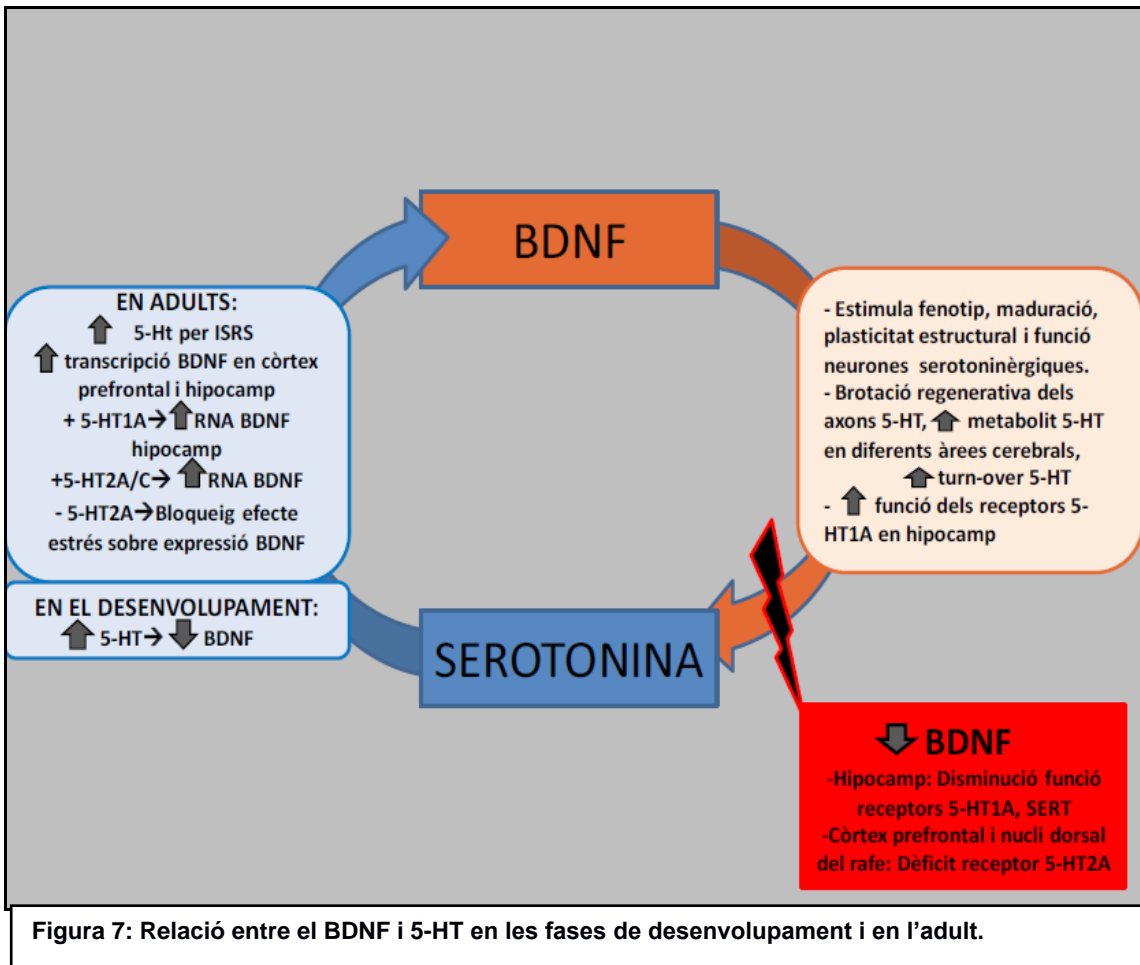
depenent d'activitat des de les neurones el que provoca un empitjorament de la resposta als ISRS (133,134).

En la relació inversa, els increments dels nivells de la serotonina indueixen increments o reduccions en els nivells de BDNF depenent de la regió o dosis. L'exposició crònica (135) a ISRS s'ha associat a una regulació a l'alça de la transcripció de BDNF en el còrtex prefrontal i hipocamp, però la magnitud i l'especificitat anatòmica d'aquests canvis depenen de variables com la durada del tractament, la dosis i el tipus de drogues, i és dependent de la regió cerebral i del context ambiental, requerint la presència d'ambients enriquits (136). Aquests canvis suggereixen que una millora dels nivells sinàptics de 5-HT provoquen una regulació a l'alça de la transcripció de BDNF que contribueix o manté l'activitat antidepressiva (31,137,138). L'administració prolongada de ISRS pot reinstaurar una forma juvenil de plasticitat en estructures cerebrals seleccionades a través de la modulació dels circuits relacionats amb BDNF, ja que la inhibició del senyal de BDNF via bloqueig del TrkB porta a un retrocés dels efectes de millora de la fluoxetina en la plasticitat neuronal.

La relació entre els receptors de 5-HT i els nivells d'expressió de BDNF són complexos. L'estimulació dels receptors 5-HT_{1A} regula a l'alça els nivells de mRNA BDNF i estimula la neurogènesi en l'hipocamp (90), però els canvis en l'expressió de BDNF provocats per fluoxetina no poden ser bloquejats per inhibidors específics del receptor 5-HT_{1A}, indicant que altres receptors 5-HT podent estar involucrats en la regulació de l'expressió de BDNF (139). L'estimulació dels receptors 5-HT_{2A/C} regula a l'alça els nivells de mRNA de BDNF i l'antagonisme de 5-HT_{2A} mitjançant ketanserina bloqueja parcialment l'efecte de l'estrès sobre l'expressió de BDNF i indicant que l'activitat d'aquest receptor també està involucrat en els canvis en l'expressió de BDNF en situacions d'estrès.

Respecte al transportador de serotonina, s'observa que delecions genètiques del SERT provoquen fenotips d'ansietat i depressió. Delecions parcials de SERT, que simulen la situació que es dona en els portadors de la variant curta del transportador de serotonina (5-HTTLPR), mostren una reducció de l'expressió de BDNF en l'hipocamp i en el còrtex prefrontal, nivells

reduïts de BDNF en sèrum (140,141), alteracions en el sistema gabaèrgic (142) i provoquen que el cervell sigui més vulnerable a les situacions difícils. L'al·lel S de 5-HTTLPR i l'al·lel Met de BDNF s'influeixen sinèrgicament en els fenotips relacionats amb depressió, exhibint major ansietat, nivell superiors de glucocorticoides i major reducció en el nombre de dendrites i d'espines dendrítiques en l'hipocamp quan s'exposen a l'estrès. El SERT també influeix en els canvis epigenètics del BDNF que poden produir-se durant el desenvolupament però manifestar-se en fases més tardanes quan altres factors contribueixen a canvis en la transcripció (143). Una reducció de la funció de SERT i un increment dels nivells de 5-HT en fases inicials del desenvolupament, porta a una disminució de l'expressió gènica de BDNF que es manté per un increment de la metilació del DNA i una reducció en l'expressió dels factors de transcripció. La serotonina pot desenvolupar els seus mecanismes epigenètics via el receptor 5-HT_{1A} i aquest receptor està unit positivament amb l'expressió gènica de BDNF i està regulat a la baixa en rates SERT^{-/-} (144). Com el BDNF és protector de l'estrès en fases inicials de la vida, els efectes adversos o condicions ambientals negatives que es produeixen durant el període crític del desenvolupament poden portar gradualment a alteracions fenotípiques que perdurin al llarg de la vida per metilació del BDNF. Un bloqueig del SERT en l'adult incrementa els nivells de 5-HT que té efectes oposats provocant un augment de l'expressió de BDNF el que normalitza els defectes associats amb les condicions patològiques (126).



SEROTONINA I HEMOSTÀSIA

L'hemostàsia és el conjunt de processos que té l'organisme que permet que la sang circuli en estat fluid pels vasos. L'hemostàsia també actua quan es produeix un dany vascular provocant la formació d'un tap hemostàtic que deté l'hemorràgia i posteriorment repara la lesió. Si hi ha un defecte en l'hemostàsia es poden donar complicacions de tipus hemorràgic i si hi ha un excés, les complicacions són de tipus trombòtic. Les plaquetes estan implicades en el manteniment de l'hemostàsia fisiològica a través de la formació d'un tap plaquetari, en el procés conegut com a hemostàsia primària. Les plaquetes no contenen nucli, però posseeixen en el seu interior grànuls alfa on s'emmagatzema factor von Willebrand (FVW), factor V de la

coagulació, factor XIII, fibrinogen i inhibidor de l'activador del plasminògen (PAI). També s'hi troben grànuls densos en els quals s'emmagatzema ADP, calci i 5-HT (145). Les plaquetes posseeixen diversos receptors de serotonina, el 5-HT_{2A}, el 5-HT₃ i el SERT, en les seves membranes equivalents als que es troben en les neurones serotoninèrgiques (108,146) i la serotonina és incorporada ràpidament dintre de les plaquetes, emmagatzemada en els grànuls densos i secretada durant l'estimulació (147). La 5-HT no és un agonista dèbil per les plaquetes humanes i actua accentuant l'activació plaquetària, potenciant les respostes procoagulants i incrementant la trombogènesi sobre les superfícies vasculars danyades (148,149).

L'activació de les plaquetes provoca canvis en la forma, assemblatge del citosquelet, fusió de grànuls plaquetaris amb el sistema canalicular obert, contracció interna i alliberació del contingut dels grànuls a la circulació (150) (Figura 8). També es produeix àcid araquidònic dins de la plaqueta que és transformat en tromboxà A₂ a través de la ciclooxigenasa (151). El tromboxà A₂ és un vasoconstrictor, a l'igual que la 5-HT i estimula l'alliberació d'ADP promovent l'agregació plaquetària. Durant l'activació plaquetària també s'exposen fosfolípids aniònics en la superfície plaquetària que faran de catalitzadors de la coagulació, ja que proporcionen la superfície adequada sobre la que s'uneixen els complexos enzimàtics de la coagulació. L'exposició d'aquests fosfolípids és coneguda com a expressió d'activitat procoagulant (152). Les plaquetes activades utilitzen la 5-HT per incrementar l'expressió i la retenció de proteïnes procoagulants a la seva superfície tals com el fibrinogen i el factor de coagulació V, que juntament amb fosfolípids actius poden incrementar els mecanismes de la coagulació (153). Aquestes plaquetes interaccionen amb les cèl·lules endotelials provocant l'alliberació de factors solubles, inclosos β-thromboglobulin (βTG) i factor plaquetari 4 (PF4), a la circulació general. Posteriorment a la reacció d'alliberació s'expressa en la superfície de la plaqueta activada glicoproteïna (GP) IIb-IIIa activa que permet l'agregació de les plaquetes entre si, utilitzant com a pont molecular fibrinogen i FVW. Quan es produeix una lesió en la paret vascular queden exposats a la circulació elements del subendoteli com el factor tissular (FT), el col·lagen i el FVW, responsables de l'activació de les plaquetes i dels mecanismes de la coagulació. Aquesta interacció permet a les plaquetes circulants detectar les zones lesionar-se, activar-se i adherir-se per cobrir el màxim de superfície. El resultat és la formació d'un tap hemostàtic primari que

posteriorment, després de l'activació dels mecanismes de la coagulació, es consolidarà per una malla de fibrina que es coneix com hemostàsia secundària (Figura 9).

L'exposició de factor tissular (FT) en les zones lesionades és el principal iniciador de la coagulació i juga un paper crític en l'hemostàsia (154). En un primer pas el FT forma un complex amb el FVII que requereix calci i posteriorment s'inicia una cascada d'activacions successives de diferents factors. Aquesta cascada de la coagulació té com a catalitzador els fosfolípids aniònics de la superfície de les plaquetes activades. L'objectiu és la generació de trombina (155) que permet formar una malla de fibrina que estableix el tap hemostàtic i l'activació de noves plaquetes. També es coneix que l'exposició de FT en els llocs de ruptura de les plaques arterioscleròtiques juga un paper crític en les complicacions isquèmiques causades per les plaquetes, encara que no s'ha demostrat una interacció directa del FT amb les plaquetes.

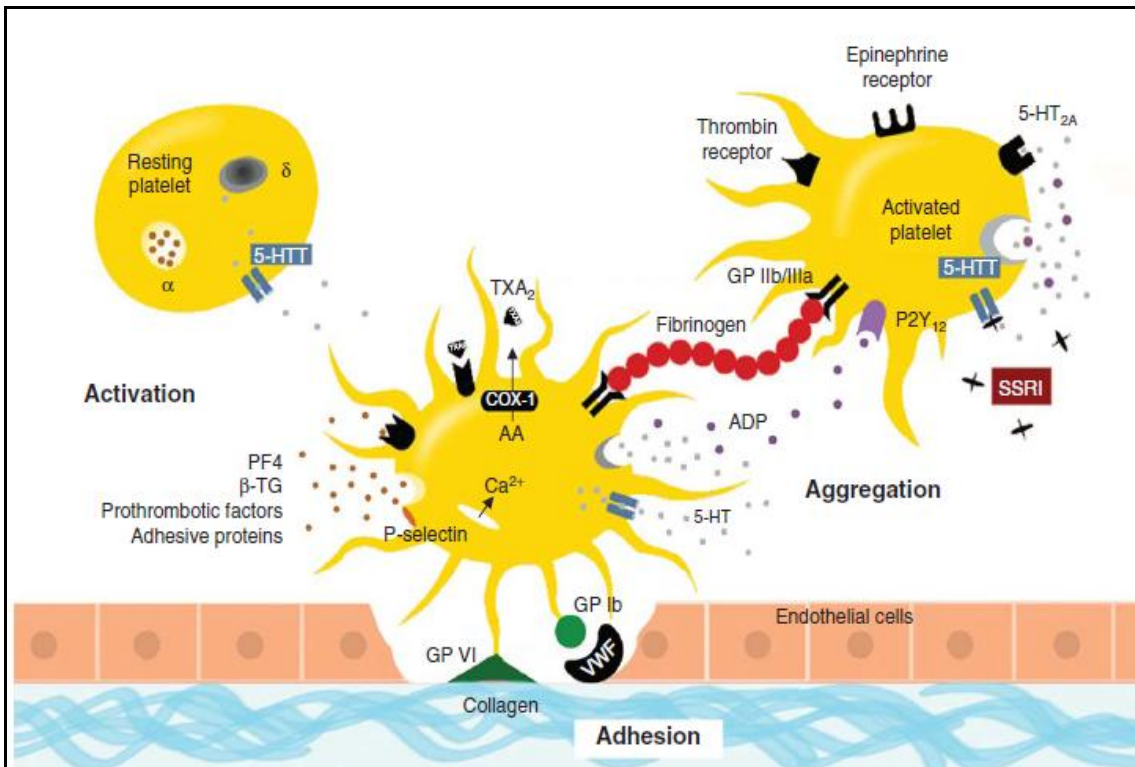


Figura 8: Activació plaquetària i funció de la serotonina.

El col·lagen exposat després del dany de l'endoteli, entre altres factors, estimula l'activació plaquetària i l'adhesió a la paret vascular. Després de l'activació s'observa un canvi en la forma de les plaquetes i el contingut dels grànuls intraplaquetaris s'allibera, incloent serotonina (5-HT) a partir dels grànuls densos i tromboxà A₂ (TXA₂) produïts a partir d'àcid araquidònic (AA). Tots aquests fenòmens són calci-dependents i amplifiquen l'activació plaquetària. Els receptors de GP IIb/IIIa s'expressen en la membrana de les plaquetes i s'uneixen a fibrinogen, la via comú per a l'agregació plaquetària. La serotonina actua sobre els receptors 5-HT_{2A} localitzats a la paret vascular i a les plaquetes i és capturada per un transportador específic de la recaptació de la serotonina (5-HTT o SERT) de la membrana cel·lular. Els inhibidors selectius de la recaptació de serotonina (ISRS) bloquegen SERT el que condueix a un esgotament del contingut de la serotonina de les plaquetes amb el temps, perjudicant parcialment la seva funcionalitat. La GP Ib és el receptor de plaquetari per al factor de von Willebrand (vWF). GP VI és el receptor per al col·lagen de les plaquetes. El P2Y₁₂ és el receptor plaquetari de difosfat d'adenosina (ADP).

De Abajo, 2011

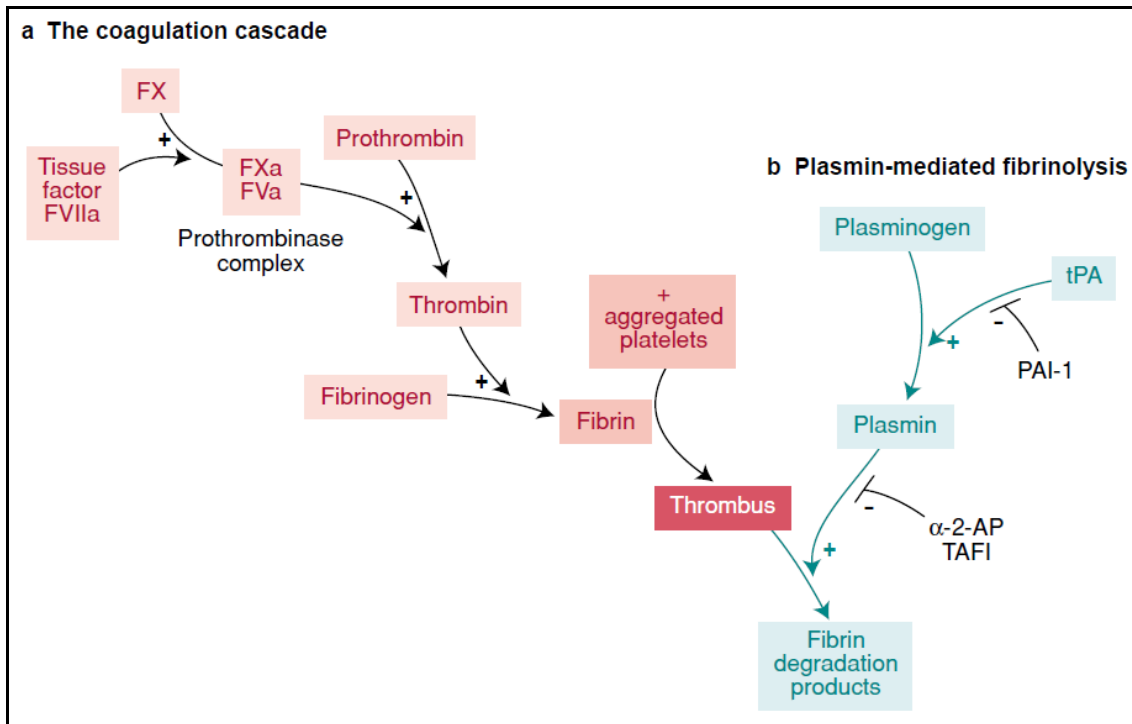


Figura 9: Resum de les cascades de la coagulació i la fibrinòlisi.

(A) La cascada de la coagulació, que afavoreix la formació de coàguls, s'inicia *in vivo* pel factor tissular i el factor VIIa (FVIIa) i condueix a la conversió de protrombina en trombina pel complex de protrombinasa (FXa i FVa). L'escissió posterior de fibrinogen per la trombina, juntament amb l'agregació de plaquetes, pot resultar en la formació d'un trombus. El coàgul de fibrina s'estabilitza addicionalment per FXIII, que també és activat per la trombina, i el procés de coagulació es veu magnificat per altres bucles de retroalimentació positiva.

(B) La fibrinòlisi mediada per la plasmina, resultant en productes de degradació de fibrina i la lisi del coàgul, es produeix després de la conversió de plasminogen en plasmina per l'activador de plasminogen de tipus tissular (tPA). L'inhibidor de l'activador del plasminogen 1 (PAI-1) inhibeix ràpidament tPA. α -2-antiplasmina (α -2-AP) inactiva la plasmina mitjançant la formació d'un complex 1:1 inhibitori amb la plasmina circulant. L'inhibidor de la fibrinòlisi activat per trombina (TAFI) escindeix els residus de lisina C-terminals de la fibrina, prevenint la co-activació de plasminogen per fibrina. Bodary et al., 2002

S'ha descrit una sub població de plaquetes anomenades plaquetes coated (156) les característiques principals de les quals són: 1) la presència de proteïnes procoagulants dels grànuls alfa intraplaquetaris units a la membrana externa de les plaquetes activades, 2) exposició de fosfolípids aniónics i 3) presentar permeabilitat a la calceïna (157). Les proteïnes implicades, el factor V, el fibrinogen i la trombospondina posseeixen zones d'unió a 5-HT (158). El mecanisme pel qual proteïnes amb caràcter procoagulant queden unides a la membrana plaquetària implica un procés de derivatització de les proteïnes amb 5-HT, conegut com a serotonilació. La importància d'aquestes plaquetes es deu a què poden intensificar els mecanismes de la coagulació. A més, solament es formen sota condicions especials d'activació. Aquest mecanisme a través de la 5-HT podria representar un factor de risc

protrombòtic en pacients amb depressió. La majoria dels vasos sanguinis presenta un flux sanguini que pot ser considerat un flux laminar, en el que les capes circulants del centre ho fan a una velocitat major que les capes de la perifèria més propera a la paret vascular. La majoria de les plaquetes circulen per la zona externa, prop de la paret vascular que és on hauran de realitzar la seva funció. Un paràmetre clau en el flux laminar que té un impacte important en la trombosi és l'índex de cisallament (159) i es defineix com l'índex de canvi de la velocitat a la qual una capa de fluid passa sobre una altra cada adjacent paral·lela. En l'arbre vascular, l'índex de cisallament és variable en funció del diàmetre del vas i de la seva localització. Aquesta variable té la seva repercussió en el tipus de fenòmens que es poden observar en cada zona (160). En el recorregut arterial, on es troben els majors índexs de cisallament, predominen els esdeveniments influïts per les plaquetes, provocant complicacions de tipus isquèmic. En el territori venós, on es troben els índexs de cisallament menors, predominaran els mecanismes de la coagulació, afavorint la deposició i formació de la malla de fibrina i provocant complicacions en forma de trombes (161). En condicions patològiques on hi ha una disminució del lumen del vas, com en presència d'una placa d'ateroma, l'índex de cisallament és molt elevat i podria donar lloc a una síndrome coronària aguda (160).

RELACIÓ ENTRE SEROTONINA PLAQUETÀRIA I CEREBRAL. LA PLAQUETA COM MODEL NEURONAL

Les plaquetes han estat usades experimentalment com a models neuronals en la recerca dels mecanismes de la depressió. La serotonina es troba en les neurones i en les plaquetes però la seva formació, regulació presenta semblances i diferències que seran analitzades a continuació (162) (Figura 10).

L'expressió de la proteïna SERT en plaquetes es considera idèntica a la trobada en neurones, mostrant en els dos casos una afinitat alta per 5-HT i essent inhibida pels mateixos components (163). El gen humà del SERT i el polimorfisme que afecta la seva expressió influencien la

funció en plaquetes i en cervell d'igual manera, mostrant que la variant al·lèlica llarga mostra un increment de la densitat de SERT i una major capacitat de recaptació de serotonina. En els pacients depressius s'ha observat una disminució de la densitat de SERT en diferents àrees cerebrals (164) i una disminució significativa en la unió de les plaquetes a imipramina i paroxetina i una disminució de la densitat de SERT en pacients depressius (165). La membrana de la plaqueta humana conté receptors 5-HT_{2A} similars als que es troben en les neurones serotoninèrgiques centrals (166). S'ha observat un increment en la unió a receptor plaquetari 5-HT_{2A} en pacients depressius (167,168). Respecte a la densitat i a l'índex de funcionalitat dels receptors 5-HT_{2A} de les plaquetes després del tractament antidepressiu en pacients depressius, estudis preliminars del nostre grup no van mostrar canvis significatius en la resposta agregant de les plaquetes a la 5-HT en pacients amb depressió (169). No obstant això, en estudis més recents s'ha observat una disminució de la resposta plaquetària provocada per receptors 5-HT_{2A} després del tractament amb imipramina (170). Aquestes dades confirmarien que l'efecte terapèutic d'alguns antidepressius podria estar relacionat amb la desensibilització dels receptors 5-HT_{2A} o amb una disminució de l'expressió dels mateixos. Hi ha estudis que comparen els mecanismes de secreció de les plaquetes amb el trànsit de vesícules en les neurones (171). La 5-HT no travessa la barrera hematoencefàlica, però sí alguns dels seus metabòlits o precursors, el que provoca un cert grau de correlació entre els nivells perifèrics i centrals de 5-HT (172). Estudis recents mostren la correlació entre el transport de serotonina plaquetària i cerebral (173).

Respecte a les diferències cal destacar que les neurones sintetitzen la 5-HT, mentre que les plaquetes no sintetitzen 5-HT i aquesta és recaptada del plasma per SERT i produïda principalment per les cèl·lules enterocromafines. També cal tenir en compte que les plaquetes emmagatzemen el 99 % de la 5-HT circulant. La regulació del magatzem i degradació de la 5-HT presenta components comuns en plaquetes i neurones, però les neurones presenten mecanismes que no estan present en les plaquetes. L'intercanvi fisiològic de 5-HT de les plaquetes és bastant baix i és alliberada per exocitosis a través de l'activació amb la trombina, ADP, col·lagen i adrenalina o en resposta a senyals que inclouen el contacte amb l'endoteli lesionat, isquèmia o agonistes dels receptors 5-HT₂ i 5-HT₃. En les neurones, la 5-HT és

alliberada a les terminals sinàptiques per un potencial d'acció que despolaritza la cèl·lula, i allibera el neurotransmissor a l'esquerda sinàptica (174). També cal considerar que el cervell conté diversos receptors pre i postsinàptics i les plaquetes solament expressen 5-HT_{2A}, 5-HT₃ i SERT. Les plaquetes tampoc presenten els elements reguladors presents en la neurona el que pot ser una limitació pel seu ús com a model d'estudi de la transmissió serotoninèrgica central. No es coneix si els mecanismes i els estímuls implicats en la internalització i el reciclatge de la SERT són els mateixos en els dos teixits.

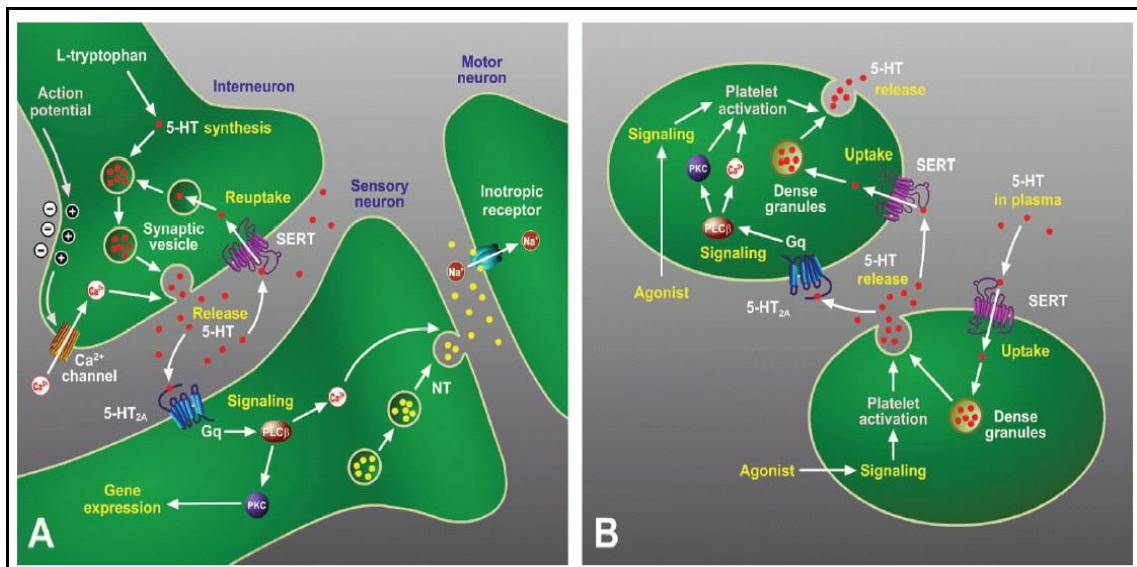


Figura 10: El sistema serotoninèrgic en neurones (A) i en plaquetes (B).

Es pot apreciar l'homologia en quan al receptor de la 5-HT (5-HT_{2A}) i el transportador de la 5-HT (SERT) entre neurones i plaquetes.

Escolar G. Et al. Drugs Today 2005

RELACIÓ ENTRE PATOLOGIA CARDIOVASCULAR I DEPRESSIÓ.

La malaltia cardiovascular i la depressió major són malalties molt prevalents en la nostra societat. S'han trobat evidències clíniques que confirmen una relació recíproca entre els mecanismes de la depressió i els de la patologia cardiovascular (175–177), principalment en fases agudes (178). Els esdeveniments vitals adversos juguen un paper causal en les depressions i en precipitar episodis cardiovasculars, associant-se al primer episodi d'infart de miocardi. El 20 % dels pacients ingressats per una síndrome coronària aguda compleixen criteris DSM per trastorn depressiu major i un percentatge superior mostra símptomes subclínic de depressió (179,180). La depressió major és aproximadament tres vegades més freqüent en pacients després d'un infart agut de miocardi (181). S'ha descrit que el fet de desenvolupar una depressió greu en les setmanes següents a un ingrés hospitalari per una síndrome coronària aguda o una inadequada resposta al tractament de la depressió, pot duplicar la mortalitat cardíaca durant el seguiment als 6-7 anys (182) i s'ha associat a una major limitació física, presència de símptomes i a una disminució de la qualitat de vida i de la salut en general (183). Estudis que examinen la depressió i l'ansietat com a predictors d'esdeveniments cardíacs al cap de 2 anys en pacients amb malaltia coronària estable han mostrat una alta probabilitat d'esdeveniments cardíacs adversos majors en aquells amb depressió (184). Una revisió d'aquest any conclou que la depressió posteriorment a una síndrome coronària aguda està associada a major risc de mortalitat general i cardíaca, pel que la depressió s'hauria d'eleva al nivell de factor de risc de pitjor pronòstic i ser avaluada de forma rutinària després d'una síndrome coronària aguda (185).

La depressió major també s'ha considerat un factor de risc independent per complicacions cardiovasculars (176,186). En els pacients amb trastorn depressiu no tractat, el risc de desenvolupar malaltia cardiovascular és significativament més alt que en els pacients amb depressió que són tractats amb antidepressius. Els símptomes depressius prediuen una major incidència de malaltia coronària o de mortalitat cardíaca en subjectes sense evidència de malaltia cardiovascular quan la depressió es va iniciar (187,188). S'han indicat diversos mecanismes per explicar aquesta associació: desregulació neuroendocrina, alteracions en el

control cardíac produït pel sistema autonòmic, inflamació i alteració de la funció immune, disminució en cèl·lules progenitores endotelials circulants, fatiga, inactivitat física, alteració de la funció plaquetària i conductes de risc com el sedentarisme, el no compliment de la medicació, el retard en buscar assistència (187,189,190) (Figura 10).

Els mecanismes serotoninèrgics podrien ser l'enllaç potencial entre els trastorns afectius i el risc cardiovascular (149). Les plaquetes juguen un rol crític en el desenvolupament de complicacions isquèmiques en la malaltia cardiovascular. Les plaquetes poden contribuir a la remodelació arterial i a la formació d'ateroma mitjançant el reclutament de cèl·lules inflamatòries que indueixen l'apoptosi de cèl·lules arterials i mitjançant la producció de factors de creixement que promouen la proliferació de cèl·lules del múscul en l'ateroma. La 5-HT segregada per les plaquetes indueix l'agregació plaquetària i la vasoconstricció coronària. La 5-HT per si mateixa és un agonista plaquetari dèbil en estudis d'agregometria estàndards (145) però incrementa la reacció plaquetària de forma important si s'associa a altres agonistes i no es pot considerar agonista dèbil. També actua accentuant l'activació plaquetària, potenciant les respostes procoagulants i incrementant la trombogènesi sobre les superfícies vasculars danyades (148,149). La serotonina afavoreix l'expressió de CD62-P i de molècules procoagulants en la membrana de la plaqueta. La resposta agregant d'agonistes dèbils depèn de la concentració d'ions de calci, pel que la potenciació de l'agregació plaquetària induïda per 5HT és més evident quan s'utilitza heparina de baix pes molecular com anticoagulant.

La depressió s'ha associat a alteracions en múltiples esglaons de l'activació plaquetària, l'agregació plaquetària i la cascada de coagulació. Els pacients amb depressió major tenen un increment significatiu en l'activació del complex $\alpha IIb-\beta 3$ integrina del receptor de fibrinogen plaquetari (final comú de l'activació plaquetària) comparat amb controls sans (191,192). Addicionalment, l'expressió de P-selectina en la superfície, un marcador de l'activació plaquetària, estava significativament incrementat en els pacients depressius i també mostren més agregats circulants de leucòcits-plaquetes ($P < 0.001$). Estudis *in vitro* mostren una millora de la reactivitat plaquetària a ADP en pacients deprimits (193,194). La proteïna anexina V unida a plaquetes està incrementada (191,195). Un increment en la sensibilitat dels receptors 5-

HT_{2A} i una regulació a la baixa dels receptors SERT en la perifèria podria explicar la relació entre tromboembolisme i depressió (196). Per contra, altres estudis no han mostrat un increment o una disminució en els nivells d'activació plaquetària en pacients amb depressió (197). Aquestes troballes discordants podrien ser explicades per diferències en els mètodes per detectar l'activació plaquetària o en diferents poblacions de pacients respecte gravetat clínica o edat.

En els darrers anys hi ha estudis que la depressió i la patologia cardíaca poden ser, almenys en part, expressions de fenotips diferents del mateix substrat genètic. Els gens relacionats amb la inflamació, l'agregació plaquetària i el sistema serotoninèrgic poden ser predictors d'ambdues patologies (178,198). Respecte al polimorfisme de SERT, el genotip // s'ha associat a un major risc d'infart de miocardi pel fet que afecta l'activació plaquetària provocada per 5-HT i la proliferació de les cèl·lules del múscul llis que es produeix durant l'aterosclerosi (199) i el genotip ss s'ha relacionat amb símptomes depressius, provocant un increment del risc cardiovascular en pacients amb símptomes depressius posteriorment a patir un infart agut de miocardi (200). L'ús d'estratègies antiplaquetàries va disminuir els infarts de miocardi en els pacients amb l'al·lel //, mentre que en els pacients amb l'al·lel ss l'efecte es relacionava més amb els símptomes depressius.

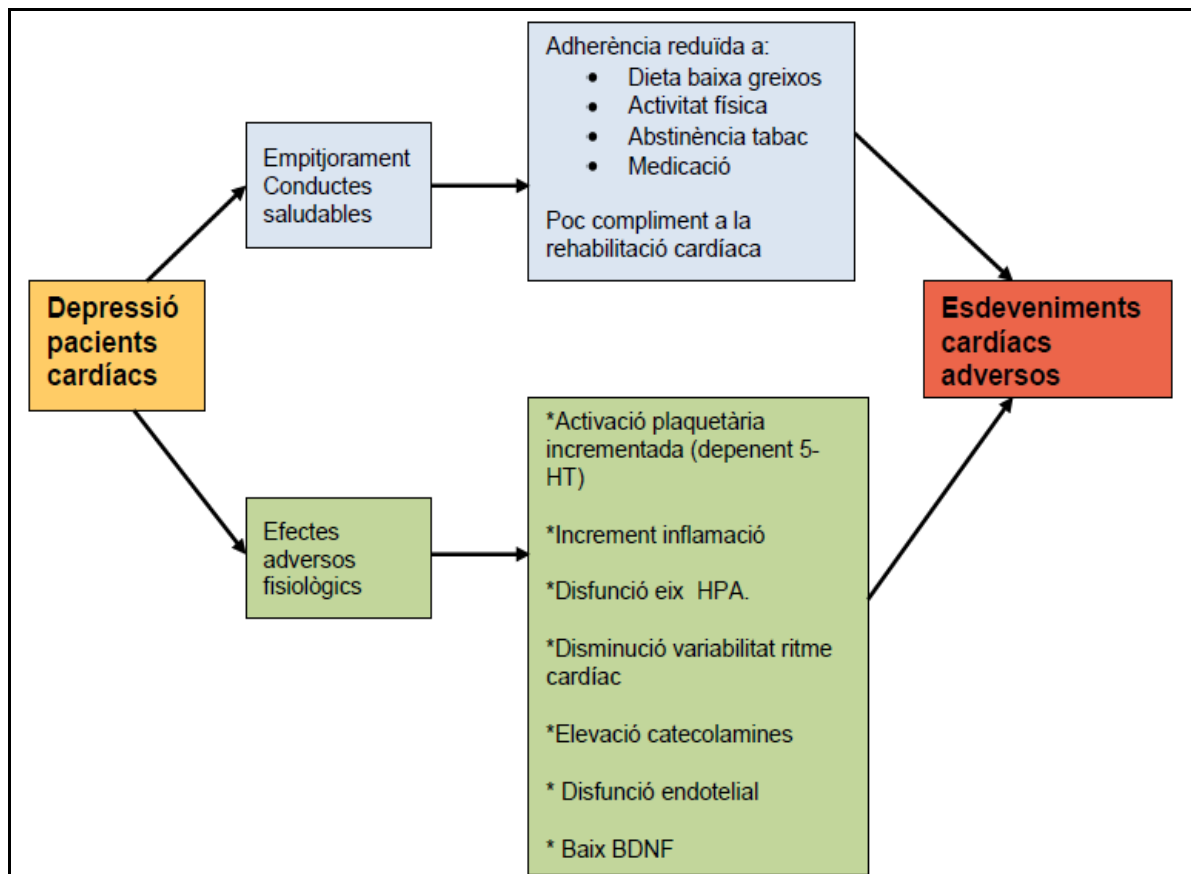


Figura 11: Mecanismes mitjançants els quals la depressió afecta en el pronòstic de la malaltia cardíaca. HPA: Hipotàlam-hipofisi-adrenal; BDNF: Factor de creixement derivat del cervell. Adaptat de Huffmann et al., 2013.

HIPÒTESIS I OBJECTIUS

HIPÒTESIS:

La depressió s'ha associat a múltiples alteracions biològiques. En el nostre estudi volem analitzar les alteracions que es presenten en els pacients depressius respecte a subjectes controls i els canvis que s'observen durant el tractament amb un antidepressiu inhibidor de la recaptació de la serotonina. Les neurotrofines s'han relacionat amb la regulació de l'humor i la neurotrofina més estudiada ha estat el BDNF. S'ha suposat que els pacients amb clínica depressiva presentarien uns nivells de neurotrofines inferiors als subjectes sans que implicaria una disminució de la neuroplasticitat cerebral i que el tractament corregiria aquestes alteracions. Una altra alteració que s'observa en pacients depressius és una major activació plaquetària i alteracions en els paràmetres hemostàtics. Aquestes alteracions poden predisposar a la presència d'esdeveniments cardiovasculars en pacients depressius. Les nostres hipòtesis són:

1. Els pacients depressius en fase aguda presentaran uns nivells de BDNF inferiors als subjectes sans tant en plasma com en plaquetes.
2. La millora clínica associada al tractament amb ISRS normalitzaran aquests nivells, assolint valors similars als controls tant en plasma com en plaquetes.
3. Els pacients amb depressiu major presenten unes funcions adhesives, cohesives i procoagulants de les plaquetes que indiquen un fenotip protrombòtic respecte als subjectes sans.
4. Els antidepressius inhibidors selectius de la recaptació de serotonina modifiquen l'estat protrombòtic observat en els pacients depressius, assolint uns nivells d'activació plaquetaris i de coagulació similar als subjectes sans.

OBJECTIUS:

Avaluar el BDNF i els paràmetres d'hemostàsia i coagulació en fase depressiva sense tractament i en diferents fases del tractament amb ISRS i comparar-los amb controls sans:

1. Comparar els nivells de BDNF en plasma pobre en plaquetes i en plaquetes en pacients amb episodis depressius major i en controls sans.
2. Observar els canvis en els nivells de BDNF en plasma i en plaquetes en relació amb la millora clínica produïda pel tractament crònic amb escitalopram en diferents fases del tractament. Estudiar si existeix una relació temporal entre la resposta terapèutica al tractament i els canvis neuroquímics detectats. Valorar correlacions entre BDNF i gravetat clínica.
3. Valorar la relació entre els nivells de BDNF plasmàtic i el plaquetaris i estudiar la seva correlació.
4. Avaluar el perfil trombòtic en pacients amb depressió major posant especial èmfasi en els biomarcadors plaquetaris i d'activació de la coagulació.
5. Avaluar les modificacions en els símptomes depressius i els efectes sobre les funcions adhesives, cohesives i procoagulants de les plaquetes en pacients sotmesos a tractament amb fàrmacs inhibidors de la recaptació de serotonina (escitalopram durant 24 setmanes). Avaluar les propietats antitrombòtiques de l'escitalopram sobre l'acció procoagulant de les plaquetes en experiments sota condicions de flux, utilitzant models de perfusió a diferents índexs de cisallament

RESULTATS

RESPOSTA CLÍNICA:

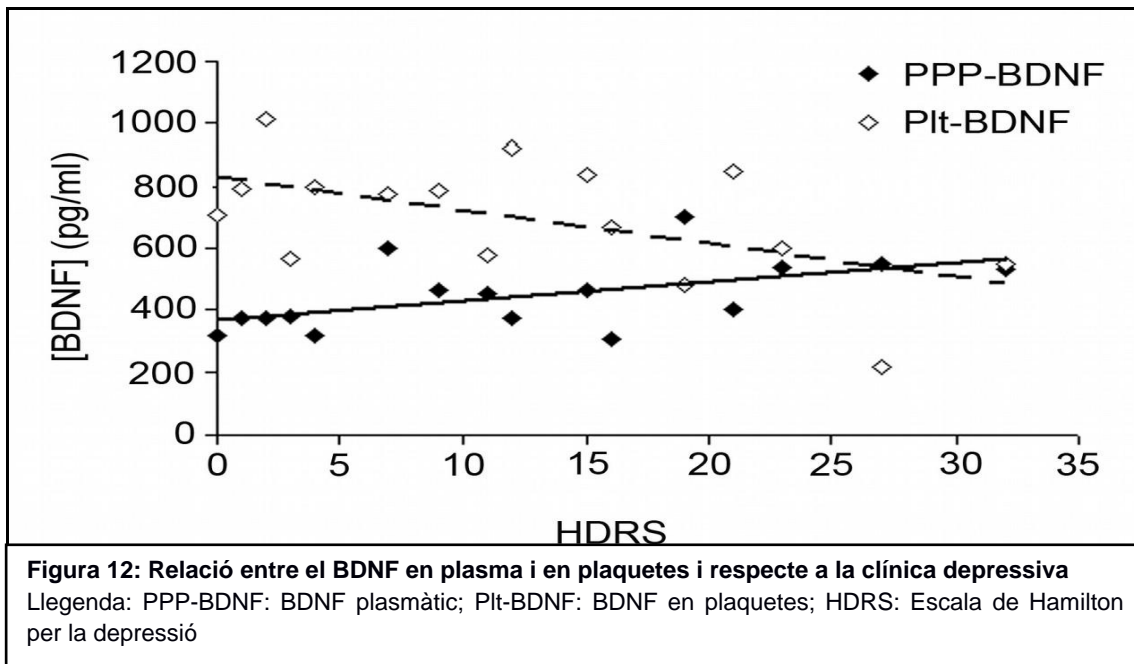
- Les puntuacions de l'Escala de Hamilton per Depressió (HDRS) utilitzades com a mesura de la clínica depressiva van mostrar una diferència estadística significativa entre les puntuacions en pacients en fase inicial respecte als controls ($24 \pm 4,35$ vs $0,62 \pm 1,19$; $p < 0.001$).
- A partir de la quarta setmana de tractament es va detectar una millora significativa en les puntuacions mitjanes de HDRS. Al cap de vuit setmanes, tots els pacients van respondre al tractament i al cap de 12 setmanes estaven en remissió, considerada com a HDRS inferior a 8 punts. No obstant això, s'observa una diferència significativa entre les puntuacions de HDRS dels pacients al final de l'estudi i les puntuacions dels controls ($3,93 \pm 3,95$ vs $0,62 \pm 1,19$, respectivament; $p < 0,01$).
- S'observa una diferència significativa en la HDRS al final de l'estudi entre els pacients amb un primer episodi i els pacients recurrents ($p < 0,05$), no observant-se diferències significatives entre els subjectes control i els pacients amb un primer episodi 24 setmanes després d'iniciar el tractament. En les mesures HDRS, els pacients recurrents mostraven puntuacions superiors als pacients amb un primer episodi excepte en la fase inicial. No es van observar diferències entre homes i dones respecte a la simptomatologia.

RESULTATS BDNF

- Pel que fa a l'objectiu 1 que era comparar els nivells de BDNF en plasma pobre en plaquetes i en plaquetes en pacients amb episodis depressius major i en controls sans, els resultats obtinguts indiquen que els nivells de BDNF en plasma pobre en plaquetes (PPP-BDNF) en pacient no tractats mostraven un augment significatiu en comparació

amb els subjectes sans ($496,8 \pm 132,3$ vs $311,5 \pm 90,6$ pg / ml; $p < 0,01$). Respecte als nivells de BDNF en plaquetes (Plt-BDNF) dels pacients en fase inicial eren significativament menors als subjectes sans ($458,5 \pm 163,9$ vs $793,8 \pm 232,7$ pg/ml; $p < 0,05$). Aquests resultats van en contra de la nostra hipòtesi inicial en què esperàvem una disminució dels nivells de BDNF plasmàtics dels pacients respecte als controls, però va a favor d'una disminució en els nivells de BDNF plaquetari.

- Pel que fa a l'objectiu 2 d'observar els canvis en els nivells de BDNF en plasma i en plaquetes en relació amb la millora clínica produïda pel tractament crònic amb escitalopram en diferents fases del tractament els resultats indiquen que el tractament disminueix de forma significativa els nivells de PPP-BDNF, observant-se a partir de la 8^o setmana ($454,39 \pm 167,65$ vs $311,5 \pm 90,6$ pg / ml; $p < 0,05$) i es van assolir nivells similars als subjectes controls després de 24 setmanes de tractament ($369,9 \pm 151,5$ pg/ml) i també es va observar una normalització dels nivells de Plt-BDNF a valors similars als controls. Aquests resultats semblen anar a favor de la nostra hipòtesi inicial en què indicàvem una normalització dels valors amb el tractament. També es mostra una correlació entre la millora de la clínica i els nivells de BDNF en plasma i en plaquetes.
- L'objectiu 3 d'avaluar la relació entre els nivells de BDNF plasmàtic i el plaquetari mostra un paral·lelisme invers entre els nivells de BDNF plaquetari i plasmàtic. Aquests resultats van en contra de la hipòtesi segons la qual hi hauria una correlació positiva entre els nivells en plasma i en plaquetes.



ALTRES RESULTATS DEL BDNF:

- No s'observa diferències en els nivells de BDNF en plaquetes ni en plasma entre els pacients amb un primer episodi o en pacients recurrents, alhora que no es van trobar diferències significatives respecte a l'edat.
- Es van analitzar els nivells de BDNF de forma separada segons sexe. En els nivells de Plt-BDNF en fase inicial s'observa uns nivells disminuïts en plaquetes tant en homes com en dones (homes 213 ± 56 vs $640 \pm 13,2$ pg / ml , $p < 0,05$; dones $540,3 \pm 12$ vs $788,1 \pm 261,7$ pg / ml , $p < 0,05$), però els nivells de PPP-BDNF estaven augmentats significativament a l'inici de l'estudi en dones però no en homes (dones $486,6 \pm 145,2$ pg/ml, $p < 0,01$). Al cap de 24 setmanes no s'observaven diferències entre pacients i controls.

RESULTATS PARÀMETRES DE COAGULACIÓ

Respecte a l'objectiu 4 que avalua el perfil trombòtic en pacients amb depressió major s'observa un increment en els paràmetres d'activació plaquetària i una tendència a la coagulació incrementada i alterada respecte als controls sans. Aquests resultats van a favor de la nostra hipòtesi de què els pacients amb depressió major presenten unes funcions adhesives, cohesives i procoagulants de les plaquetes que indiquen un estat protrombòtic respecte als subjectes sans.

Pel que fa a l'objectiu 5 que avalua els efectes del tractament amb ISRS sobre aquests paràmetres, s'observa una normalització de tots els paràmetres excepte una persistència de la fermesa del coàgul màxima incrementada i una disminució del temps de formació del coàgul. Aquests resultats van a favor de la nostra hipòtesi segons la qual el tractament amb ISRS retorna els paràmetres de l'hemostàsia a nivells similars als dels subjectes sans, excepte respecte als paràmetres tromboelastomètrics que es mantenen alterats o empitjoren.

Mostrant les dades més concretes obtenim:

- Increment del volum plaquetari mitjà en els pacients depressius en el moment del diagnòstic (P0) ($P0 = 10.0 \pm 0.1$ fL vs. controls = 8.3 ± 0.2 fL; $p < 0.01$) i disminueix durant el tractament amb ISRS, tot i que continua significativament incrementat després de 24 setmanes de tractament ($P24 = 9.4 \pm 0.3$ fL vs. controls = 8.3 ± 0.2 fL; $p < 0.01$). No s'observen canvis significatius respecte als recomptes plaquetaris en les diferents determinacions.
- **ESTUDIS D'AGREGACIÓ:** Les plaquetes dels pacients en el moment del diagnòstic mostren un major resposta a l'àcid araquidònic ($p < 0.05$ vs controls), acompanyat d'una disminució de l'agregació a 5-HT + ADP ($p < 0.01$ vs controls). El tractament amb escitalopram durant 24 setmanes restableix la resposta a àcid araquidònic i 5-HT +

ADP als nivells observats en els controls sang, però presenten una disminució de l'agregació plaquetària a epinefrina respecte als controls ($p < 0.05$).

- **ESTUDIS DE CITOMETRIA DE FLUX:** Les plaquetes dels pacients amb depressió major sense tractament mostren signes d'activació lleu i un endofenotip procoagulant quan es comparen amb les plaquetes dels controls sans. Els nivells de GPIIb estaven augmentats en P0 respecte controls ($69,7 \pm 6,6$ vs $51,2 \pm 4,9$; $p < 0,05$), acompanyat per una major expressió de marcadors procoagulants, Annexin V unida a plaquetes (ANV-binding) (8.5 ± 2.6 en P0 vs $3,2 \pm 0,3$ en controls, $p < 0,05$), i Factor V (FV / Va) ($8,8 \pm 2,2$ en P0 vs $4,0 \pm 0,5\%$ en els controls, $p < 0,05$). El tractament amb ISRSs durant 24 setmanes va restaurar aquestes diferències a valors similars als trobats en controls sans, però les plaquetes dels pacients al cap de 24 setmanes de tractament encara mostraven un increment en l'expressió de GPIIb-IIIa respecte als controls ($105,3 \pm 6,0$ vs $87,4 \pm 2,5$, respectivament, $p < 0,05$).
- **L'ACTIVITAT PROCOAGULANT DEL FACTOR TISSULAR (TF) EN SANG SENCERA I EN PLAQUETES:** L'activitat procoagulant del TF- va ser major en les plaquetes dels pacients en fase inicial (P0) respecte als controls (14.0 ± 3.3 vs 61.4 ± 23.5 ; $p < 0,05$), encara que no es van observar diferències en la sang sencera. El tractament amb l'escitalopram va reduir els nivells d'activitat procoagulant del factor tissular en ambdós, en les mostres de plaquetes i les de sang sencera, mostrant-se una disminució significativa en els pacients després del tractament respecte als controls (27.0 ± 3.9 vs 42.2 ± 5.9 ; $p < 0.05$).
- **MODIFICACIONS EN LES PROPIETATS VISCOELÀSTIQUES DELS COÀGULS:** Els estudis de tromboelastometria mitjançant EXTEM no va mostrar canvis significatius en la dinàmica de la formació de coàguls entre els pacients en fase inicials i els controls. Tot i això, el temps de formació de coàgul es va reduir durant el tractament aconseguint significació estadística al cap de 24 setmanes de tractament ($72,1 \pm 3,9$ en P24 vs $88,3 \pm 6,4$ s en P0, $p < 0,05$). També es va observar un augment significatiu mantingut en

la fermesa de coàgul màxima (MCF) en pacients en fase inicial ($65,1 \pm 1,2$ mm en P0 vs $60,8 \pm 6,4$ en controls; $p < 0.05$) que en es mantenir significativament elevat durant el tractament amb escitalopram, persistint valors superiors en els pacients a les 24 setmanes respecte als controls ($65,3 \pm 1,1$ mm en P24 vs $60,8 \pm 6,4$ en controls; $p < 0.05$).

- **ESTUDIS DE PERFUSIÓ:** Els estudis de perfusió van revelar un fenotip procoagulant incrementat en la sang dels pacients en fase inicial com es confirma per un augment estadísticament significatiu en la cobertura de fibrina en els pacients P0 vs controls (% Fibrina: $58,8 \pm 8,6$ vs $38,0 \pm 5,1$, $p < 0,05$). Per contra, la cobertura de plaquetes va aparèixer lleugerament disminuïda respecte als controls (% Plaquetes: $25,2 \pm 1,3$ vs $29,5 \pm 2,9$; respectivament). Després del tractament continuat amb escitalopram durant 24 setmanes es va observar una important reducció de la formació de fibrina en el subendoteli respecte a la situació inicial P0 ($26,0 \pm 6,2\%$ enfront de $58,8 \pm 8,6\%$, respectivament, $p < 0,01$) i una disminució en la grandària dels agregats en comparació amb controls.
- **L'ACTIVACIÓ DELS MECANISMES DE LA COAGULACIÓ DURANT ELS ESTUDIS DE PERFUSIÓ:** La generació de trombina durant la perfusió es va mesurar indirectament amb els fragments de protrombina F1 + 2 que es van obtenir de forma paral·lela a les dades obtingudes en els experiments de perfusió. Els nivells de F1 + 2 nivells es van incrementar en els experiments realitzats en P0 revelant un estat més protrombòtic vs controls ($1,1 \pm 0,4$ nM vs $0,7 \pm 0,2$ nM, respectivament). Es va observar una disminució progressiva dels nivells de F1 + 2 generats durant els experiments de perfusió a través del tractament amb escitalopram ($0,9 \pm 0,2$ nM en P8), aconseguint una significació estadística en P24 com s'indica per una marcada reducció de nivells de F1 + 2 ($0,4 \pm 0,1$ nM a P24, $p < 0,05$).

PUBLICACIONES

- **ESTUDI 1:** Serra-Millàs M, López-Vílchez I, Navarro V, Galán AM, 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* 2011; 216 (1):1-8.
<http://rd.springer.com/article/10.1007/s00213-011-2180-0>
- **ESTUDI 2:** Lopez-Vilchez I, **Serra-Millas M**, Navarro V, Hernandez RM, Villalta J, Diaz-Ricart M, Gasto C, Escolar G, Galan AM. Prothrombotic platelet phenotype in major depression: Downregulation by antidepressant treatment. *Journal of Affective Disorders* 2014; 159:30-45.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165032714000603>

Es dona les gràcies a les editorials dels articles el permís per poder incloure l'article complet en la publicació de la tesi.

Changes in plasma and platelet BDNF levels induced by *S*-citalopram in major depression

Montserrat Serra-Millàs · Irene López-Vilchez · Víctor Navarro · Ana-María Galán · Ginés Escolar · Rafael Penadés · Rosa Catalán · Lourdes Fañanás · Bárbara Arias · Cristóbal Gastó

Received: 19 July 2010 / Accepted: 13 January 2011 / Published online: 11 February 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract

Background Neuroplastic processes are thought to be involved in the pathophysiology of major depression. It has been reported that serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is decreased in depressed patients.

Objectives Compare BDNF levels in depressed patients and healthy controls in platelet poor plasma and in washed platelets. Observe the effects of 8- and 24-week treatment with *S*-citalopram on these levels.

Methods We assessed the levels of BDNF in platelet poor plasma and in washed platelets from 18 major depression patients, and compared them with 14 healthy controls. Blood samples were obtained from patients before and during treatment (8 and 24 weeks) with a selective serotonin reuptake inhibitor, *S*-citalopram.

Results A significant decrease in severity of depressive symptoms was observed from the first month of treatment

with *S*-citalopram, and symptoms continued decreasing until the 6th month. Plasma BDNF levels in untreated patients appeared significantly increased ($p < 0.01$) but reached values similar to those of controls at the 24th week. In contrast, levels of platelet BDNF appeared significantly decreased ($p < 0.05$), but treatment also normalized levels so that values obtained were equivalent to those of controls.

Conclusions Untreated depressed patients showed increased plasma BDNF levels and decreased platelet BDNF levels, as compared with control subjects, and tend to normalize during treatment with *S*-citalopram for 24 weeks, with BDNF reaching levels similar to those in healthy controls at the 24th week in both samples. We observed that improvement in depressive symptoms was accompanied by normalization of plasma and platelet BDNF levels.

Keywords Major depression · Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) · Serum · Plasma · Platelets · *S*-citalopram · Antidepressant

M. Serra-Millàs (✉)

Servei de Salut Mental, Consorci Hospitalari de Vic,
Francesc Pla, el Vigatà n°1,
08500 Vic Barcelona, Spain
e-mail: serra2mont@yahoo.es

I. López-Vilchez · A.-M. Galán · G. Escolar

Servei d'Hemoteràpia i Hemostàsia, Hospital Clínic, Centre de
Diagnòstic Biomèdic, IDIBAPS, Universitat de Barcelona,
Barcelona, Spain

V. Navarro · R. Penadés · R. Catalán · C. Gastó

Institut de Neurociències, Hospital Clínic, Universitat de
Barcelona, IDIBAPS, CIBERSAM,
Barcelona, Spain

L. Fañanás · B. Arias

Unitat d'Antropologia, Departament de Biologia Animal, Facultat
de Biologia i Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de
Barcelona, CIBERSAM, Instituto de Salud Carlos III,
Barcelona, Spain

Abbreviation

BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
HDRS	Hamilton Depression Rating Scale
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assays
PPP-BDNF	BDNF in platelet poor plasma
Plt-BDNF	BDNF in washed platelets

Introduction

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a member of the neurotrophin family, present in both the central and the peripheral nervous system (Lindsay et al. 1994; Lommatzsch et al. 1999), has been implicated in the pathophysiology of

depression (Duman and Monteggia 2006; Duman et al. 1997). Low levels of serum BDNF have been described in patients with major depressive disorder who were antidepressant-free (Karege et al. 2002a, b) or naïve (Shimizu et al. 2003). Moreover, BDNF levels increased with chronic antidepressant treatment (Shimizu et al. 2003; Aydemir et al. 2005, 2006; Gervasoni et al. 2005; Gonul et al. 2005). Some studies (Shimizu et al. 2003) detected a negative correlation between the severity of depression and serum BDNF levels and that the response to the antidepressant treatment correlated with the increase in BDNF levels.

BDNF is found in both human serum and plasma (Fujimura et al. 2002; Radka et al. 1996; Rosenfeld et al. 1995). Interestingly, serum levels of BDNF have been found to be 100–200-fold higher than plasma levels (Radka et al. 1996; Rosenfeld et al. 1995) and that difference results from BDNF released from platelets during the clotting process (Fujimura et al. 2002) as human platelets contain a large amount of the BDNF in blood (Fujimura et al. 2002; Pliego-Rivero et al. 1997; Yamamoto and Gurney 1990). However, regulation and function of BDNF in peripheral blood is still poorly understood.

Given the difficulty of studying BDNF levels in the brain directly, there has been great interest in the accurate assessment of BDNF activity in the periphery. Serum, plasma and whole blood BDNF content are commonly measured using ELISA with relatively high specificity and sensitivity. Although a few recent studies suggest plasma BDNF content is also decreased in depressed subjects (Grassi-Oliveira et al. 2008; Karege et al. 2005; Lee et al. 2007; Piccinni et al. 2008), most of the studies have been performed with serum, and only two studies (Lee and Kim 2009; Pandey et al. 2010) have investigated differences in BDNF levels in platelets between major depression patients and control subjects. To the best of our knowledge, no studies have analyzed changes due to treatment in platelet BDNF levels.

Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) are one of the most common drugs used in major depression treatment. Interestingly, platelets possess different receptors for serotonin (5-HT_{2A}, 5-HT₃) and also the transporter (SERT) in their membranes (Hoyer et al. 2002; Stratz et al. 2008; Escobar et al. 2005; Blakely et al. 1991; Hoffman et al. 1991; Lesch et al. 1993; Ramamoorthy et al. 1993). Several studies have shown evidence of a link between increased risk of cardiovascular complications in clinically depressed patients (Carney and Freedland 2003) and a possible reduction of this risk after treatment with SSRIs (Schlienger and Meier 2003; Maurer-Spurej et al. 2004; Sauer et al. 2003). Moreover, our group has recently published an *in vitro* study in which the effect of serotonin and the SSRI citalopram was evaluated on platelet function (Galan et al. 2009). Our studies demonstrated that serotonin

accentuates platelet activation and potentiates procoagulant responses so increasing thrombogenesis on damaged vascular surfaces. Surprisingly, inhibition of serotonin reuptake by the SSRI confirmed the implication of serotonergic mechanisms in platelet activation and demonstrated a remarkable antithrombotic action of this drug in our experimental studies, as previously suggested by Atar and colleagues (2006, 2007).

The aims of this study were: firstly, to compare BDNF levels in depressed patients and healthy controls in platelet poor plasma and in washed platelets and, secondly, to observe the effects of 8- and 24-week treatment with *S*-citalopram on BDNF levels with simultaneous control for age.

Methods and materials

Demographic and clinical data

Two groups were established for this study. The first group included major depression patients. Eighteen outpatients recruited at the Department of Psychiatry at Hospital Clínic, Barcelona, were consecutively enrolled in a longitudinal controlled study for 6 months. All patients were suffering from a current major depressive episode, single episode or recurrent, diagnosed according to Diagnostic and Statistical Manual for Mental Disorders Criteria (APA 2003), using the structured clinical interview for DSM IV (First et al. 1999). All patients had a 17-item Hamilton Depression Rating Scale (HDRS) (Hamilton 1960) total score of 18 or higher. Patients' ages ranged between 18 and 65 years. Exclusion criteria consisted of the presence of other major axis I disorders, including schizophrenia, bipolar disorders, anxiety disorders, substance-related disorders and eating disorders, as well as the presence of any acute physical disorders, exposure to any psychotropic drugs in the last month and to drugs known to affect either platelets or the coagulation system taken within the previous 10 days.

The second group was the study control group. Fourteen healthy subjects with no history of chronic physical illness, substance abuse or mental diseases and not taking regular medications in the last month (including drugs known to affect either platelets or the coagulation system within the previous 10 days) were recruited. All subjects were free of acute physical illness during the 2 weeks before the study.

Experimental design

Severity of depression was assessed using the 17-item HDRS, which is valid and reliable for the Spanish population. Clinical assessments were conducted at base-

line, 2nd, 4th, 8th, 12th, 16th, 20th and 24th weeks of treatment. Clinical response was defined as HDRS < 50% and remission was defined as HDRS < 8 points. Blood extraction was conducted at baseline, and at 8 and 24 weeks of treatment.

After the baseline assessments and baseline blood samples were obtained, all patients were orally given *S*-citalopram as antidepressant therapy. Initially, this was 5 mg/day for 4 days and increased to 10 mg/day on the fifth day. In the following visits, the psychiatrist increased the doses as required to a maximum of 40 mg/day. We used elevated doses based on the severity of clinical depression and on personal experience. In the first weeks, lorazepam was permitted in cases of anxiety or insomnia.

Written informed consent was obtained from each participating patient. The study was approved by the Ethics Committee at Hospital Clinic, Barcelona. We included all patients that took at least one dose of the drug.

Obtaining blood samples

Blood samples were drawn from the antecubital vein of major depression patients and of healthy controls and collected into citrate/phosphate/dextrose at a final citrate concentration of 19 mM. Blood extractions were performed between 9 and 10 A.M. to minimize the effects of possible circadian rhythm alterations to BDNF concentrations. Patients and controls had not been exposed to drugs known to affect either platelets or the coagulation system within 10 days prior to blood extraction.

Preparing plasma and platelet BDNF samples

Plasma poor in platelet (PPP-BDNF) samples were obtained by centrifugation of citrated blood at 2200 rpm (15 min, 22°C). Platelets were separated by centrifugation (1100 rpm, 22°C, 15 min) to obtain platelet rich plasma. Platelets were then washed, as previously described (Diaz-Ricart et al. 2002), by washing three times with equal volumes of citrate/citric acid/dextrose (93 mM sodium citrate, 7 mM citric acid and 140 mM dextrose), pH 6.5 and containing 5 mM adenosine and 3 mM theophylline. The final pellet was resuspended at a concentration of 0.8×10^6 platelets/ μ l in a Hanks' balanced salt solution supplemented with dextrose (2.7 mM) and NaHCO₃ (4.1 mM) and maintained for 30 min at 37°C. Platelets were counted in a Beckman/Coulter MD II System Hematology Analyzer (Beckman Coulter, CA, USA).

To obtain the sample with platelet-BDNF (Plt-BDNF), washed platelets were diluted four times with lysis buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2% Triton X-100), containing 10 mM ethylene glycol bis (β -aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, 4 mM ethylenediaminetetraacetic acid,

2 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride, 2 mM benzamidine, 2 μ g/ml leupeptin, 2 μ g/ml pepstatin and 2 mM sodium orthovanadate, as protease and phosphatase inhibitors, leaving a final platelet concentration of 0.2×10^6 platelets/ μ l. Platelet suspensions were treated with lysis buffer for 30 min (at 4°C). Triton-insoluble residues, corresponding to the polymerized cytoskeletal fraction, were kept together with the supernatant containing free BDNF. PPP-BDNF and Plt-BDNF samples were immediately frozen in dry ice and stored at -20°C.

Measurement of PPP- and Plt-BDNF

PPP- and Plt-BDNF was measured with the BDNF Emax[®] ImmunoAssay Kit (Promega, Wallisellen, Switzerland), which is designed for the sensitive and specific detection of BDNF based on the antibody sandwich principle. Before the assay, a further step of acid treatment was performed, according to the manufacturer's instructions, to increase the amount of BDNF by release of the BDNF in the membranes. Insoluble residues were pelleted by centrifugation in a microfuge to avoid being pipetted with the samples.

The assay was performed according to the manufacturer's instructions with washing between steps to remove excess reagents. All assays were performed in duplicate. Briefly, 96-well plates were coated with anti-BDNF monoclonal antibody. After blocking unspecific binding sites, undiluted samples and BDNF standards were incubated in duplicates. The BDNF in the samples was detected in two steps, first with an antihuman BDNF polyclonal antibody, which in turn was detected with an anti-IgY antibody conjugated to horseradish as a tertiary reactant. Subsequently, a chromogenic substrate was added and colour changed in proportion to the amount of BDNF. The reaction was stopped with 1 M HCl and the absorbance measured at 450 nm in a MultiSkan Ascent[®] (Thermo Electron Corporation, Finland). The concentrations of the samples in each plate were calculated according to a standard curve. Results were expressed as picogram per millilitre. In the case of Plt-BDNF, results were always expressed as content of BDNF considering an average physiologic platelet count equivalent to 0.2×10^6 platelets/ μ l.

Statistical analysis

Normality of the variables PPP-BDNF and Plt-BDNF levels have been tested respectively with the Kolmogorov-Smirnov test ($Z=0.851$, $p=0.464$; $Z=0.642$, $p=0.804$). Data are expressed as mean \pm standard error of the mean. The differences among the various conditions were tested by a general linear model for repeated measurements. One-way ANOVA test for independent experiments was applied

when multiple comparisons were required and Student's *t* test for paired data was used for comparisons between two different conditions. The level of statistical significance was established at least with $p < 0.05$.

Results

A total of 18 patients and 14 controls were included in the study. By the 8th week of treatment, two patients had dropped out as they failed to attend follow-up visits, and by the 24th week of treatment, two further patients had dropped out as they did not complete the course of pharmacological treatment. Thus, 14 patients completed the study. As shown in Table 1, both patient and control groups were mainly comprised of women. There was a statistical difference between patients' and controls' HDRS scores ($p < 0.001$), which shows that controls did not have symptoms that could interfere in the analysis of results.

Patients had experienced, on average, 1.9 previous episodes of depression, while this was the first episode for eight subjects. Six patients had had two episodes, three patients had experienced a third episode and one had had more than three episodes.

Effect of treatment with *S*-citalopram on the HDRS score

Average doses of *S*-citalopram were 28 mg/day. One patient was prescribed antipsychotic (aripiprazole) due to psychotic symptoms. A significant improvement in the mean scores of HDRS was detected from the 4th week of treatment with *S*-citalopram, as summarized in Fig. 1. At 8th week of treatment, all patients were responsive, and from the 12th week, all were in remission. However, there was a significant difference between patients' HDRS scores of at the end of study and controls' HDRS scores (3.93 ± 3.95 vs 0.62 ± 1.19 , respectively; $p < 0.01$).

There was a significant difference in HDRS between first-episode patients and recurrent patients ($p < 0.05$) at the

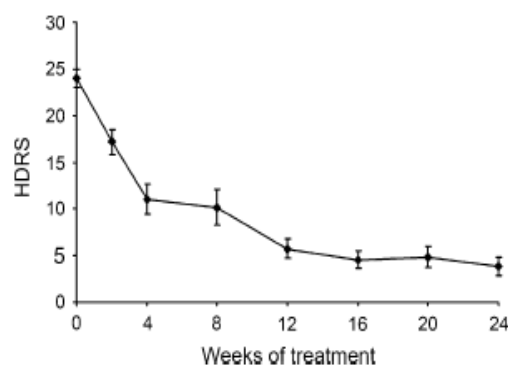


Fig. 1 HDRS total score of the patients at baseline and during treatment with *S*-citalopram for 24 weeks. This figure shows the mean values of HDRS. Clinical response was defined as HDRS $< 50\%$ and remission was defined as HDRS < 8 points. Hamilton Depression Rating Scale (HDRS)

end of study. First-episode patients at the end of study did not show significant differences to control subjects regarding HDRS score. In all HDRS measures, recurrent patients showed increased scores (more symptoms) with respect to the first episode of depression. At baseline measure, there were no significant differences between naïve and recurrent patients. There was no difference in HDRS between male and female participants in any measure.

Assessment of BDNF levels in major depression and healthy subjects

Levels of PPP-BDNF from untreated patients appeared significantly increased versus healthy subjects (496.8 ± 132.3 vs. 311.5 ± 90.6 pg/ml; $p < 0.01$). Levels of PPP-BDNF decreased during the treatment period. This tendency was less evident, but significant, at the 8th week (454.39 ± 167.65 vs. 311.5 ± 90.6 pg/ml; $p < 0.05$) but reached levels similar to control subjects after 24 weeks of treatment (369.9 ± 151.5 pg/ml).

In contrast, Plt-BDNF levels of untreated patients appeared significantly lower than healthy subjects (458.5 ± 163.9 vs. 793.8 ± 232.7 pg/ml; $p < 0.05$). As with the PPP-BDNF, antidepressive treatment SSRI normalized Plt-BDNF levels. All these results are summarized in the Fig. 2.

There were no differences in PPP- and Plt-BDNF levels between first episode and recurrent depressive patients. No significant differences in PPP- and Plt-BDNF were found with respect to age.

We analyzed BDNF levels in male and female subjects separately. Plt-BDNF levels were significantly lower in both male and female untreated depressed patients compared with healthy subjects of both genders (Men 213 ± 56 vs. 640 ± 13.2 pg/ml, $p < 0.05$; women 540.3 ± 12 vs. 788.1 ± 261.7 pg/ml, $p < 0.05$), although PPP-BDNF levels were significantly increased at baseline in female but not in male

Table 1 Sex, age and depression symptoms of depressed patients and control subjects at baseline

	Depressed patients ($n=18$)	Control subjects ($n=14$)	<i>p</i> Value
Sex (female/male)	15/3	11/3	0.84
Age (years)	38.50 ± 16.08	39.07 ± 16.12	0.92
HDRS	24 ± 4.35	0.62 ± 1.19	< 0.001

Control subjects and depressed subjects no showed differences between age and sex, but they showed statistical differences between symptoms. Age and HDRS scores are shown in mean \pm SD

HDRS Hamilton Depression Rating Scale

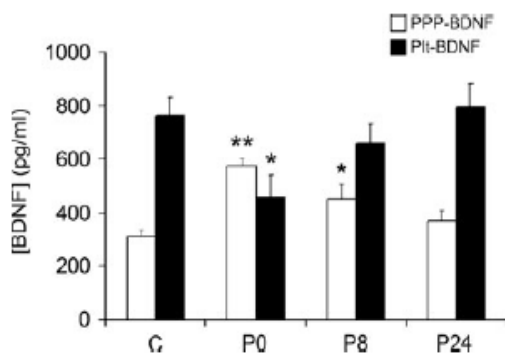


Fig. 2 Plasma BDNF levels and levels of platelet BDNF in depressive patients and controls, at baseline and during treatment. This figure shows the mean values of BDNF in pg/ml. PPP-BDNF: Plasma poor in platelet BDNF. Plt-BDNF: Washed platelets-BDNF. C: Controls; P0: patients at baseline; P8: patients after 8 weeks of treatment; P24: patients after 24 weeks of treatment. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$

depressed patients compared with corresponding controls (women 486.6 ± 145.2 pg/ml; $p < 0.01$). There were no differences in any measure at the 24th week of treatment.

Discussion

One finding of the present study is that we have detected lower levels of Plt-BDNF in acute major depressive patients when compared to healthy subjects. This suggests an involvement of neurotrophic factors in major depression, in line with earlier reports (Shimizu et al. 2003; Aydemir et al. 2005) that proposed decreased neuroplasticity in depression. Two studies (Lee and Kim 2009; Pandey et al. 2010) found the same results before treatment and indicated that reduced platelet BDNF contents circulating as stored BDNF could be associated with lower serum BDNF level in patients with major depression. However, they did not study the effects of treatment in platelet BDNF levels. Our results also show that Plt-BDNF levels in remitted patients were similar to values obtained in healthy controls, which could indicate a relationship between normalization at a biochemical level and clinical improvement due to biological treatment.

Another finding of the present study, although unexpected, is that PPP-BDNF levels appear significantly higher in depressive patients with respect to healthy controls. Furthermore, we have shown that PPP-BDNF levels in remitted patients were equivalent to those measured in healthy controls. These results make our study the first one to demonstrate that antidepressant treatment normalizes both PPP- and Plt-BDNF levels in patients with major depression. However, there are studies that describe lower PPP-BDNF levels in acute depressive patients than in controls (Grassi-Oliveira et al. 2008; Karege et al. 2005; Lee et al. 2007; Piccinni et al. 2008) or even report no

differences between control and acute depressive patients (Lee and Kim 2009; Bocchio-Chiavetto et al. 2010). A recent meta-analysis showed a reduction of BDNF plasma levels in depression (Bocchio-Chiavetto et al. 2010). It is well known that measurements of BDNF levels are highly dependent on the methodology used (Brunoni et al. 2008). The accuracy and the reproducibility of BDNF determination in serum has been validated (Trajkovska et al. 2007) although standardized protocols for plasma collection and BDNF dosage have to be developed. One possible explanation could be related to the methodological differences between this work and previous ones. It is a fact that plasma levels of BDNF present a high variance. Lommatzsch et al. (2005) found that PPP-BDNF levels decreased significantly with increasing age, weight or cholesterol, whereas platelet levels did not. Furthermore, there is evidence for the stability of BDNF levels in platelets or serum (Trajkovska et al. 2007), whereas in plasma, it circulates for less than 1 h (Kishino et al. 2001; Poduslo and Curran 1996).

It has been elegantly demonstrated that the amount of BDNF in serum is nearly identical to the amount of BDNF found in washed lysate platelets (Fujimura et al. 2002). Thus, the difference between serum and plasma BDNF levels seems to reflect the amount of BDNF stored in circulating platelets. Indeed, previous clinical studies calculated the amount of Plt-BDNF by subtracting the BDNF levels in serum and plasma (Lommatzsch et al. 2005, 2007; Trajkovska et al. 2007). Our study would support this equivalence showing the same tendency on Plt-BDNF as other studies had on serum levels of BDNF (Karege et al. 2002a, b; Shimizu et al. 2003; Sen et al. 2008). Platelet BDNF could represent a long-term marker of varying BDNF levels over a period of several days. The precursors of platelet or megakaryocyte cells cannot produce BDNF; however, they can actively take up BDNF from external sources (Fujimura et al. 2002), probably derived from both the circulating plasma pool and from resident cells in the brain (Karege et al. 2002b) or other organs (Lommatzsch et al. 1999; Fujimura et al. 2002; Pan et al. 1998; Nakahashi et al. 2000).

Some studies (Fujimura et al. 2002; Karege et al. 2005) reported an alteration of serum BDNF levels in depression patients that could be related to altered BDNF secretion from platelets. However, our study shows that serum-BDNF could be independent of a defect in platelet release. Increased platelet reactivity in patients with major depression has been described (Carney et al. 2003, 2004; Ataoglu and Canan 2009). This state might result in a partial release of the platelets contents, including BDNF and other platelet activation markers that could consequently be found in the plasma phase. In fact, our results show increased levels of BDNF in plasma and decreased levels inside platelets in

untreated depressed patients compared with healthy subjects. These data would be in agreement with a pre-activation state of platelets in major depression. Treatment with an SSRI would improve this preactivated state and explain the increase of BDNF inside platelets and the parallel decrease in plasma BDNF, even reaching values similar to those of healthy subjects.

One of the major strengths of our study involves the use of a single antidepressant drug. In the Brunoni (2008) meta-analysis, antidepressant type is associated with the magnitude of induced neuroplastic changes and, therefore, contributes to the heterogeneity of observed studies. To the best of our knowledge, only two studies have investigated the changes in BDNF levels related to escitalopram treatment. The recent Matrisciano (2009) study did not find significant changes in BDNF values for escitalopram-treated patients after 5 weeks and 6 months of treatment. This result is in contrast with the one reported by Aydemir (2006), who found an increase in BDNF serum levels in 20 women affected with major depression after 6 weeks of treatment with escitalopram, and there was a concurrent significant decrease in their depressive symptoms. BDNF tendencies found in serum in the latter study are in agreement with our results in platelets.

In addition, the longest follow-up is the Piccinni (2008) study where patients were followed up for 1 year, but they used more than one antidepressant. This work showed that the clinical improvement paralleled the normalization of PPP-BDNF after 1 month of treatment; while, at each moment of evaluation, patients' serum BDNF levels were lower than those of control subjects. We performed a 24-week treatment follow-up at three time-points (baseline, 8th and 24th weeks). Our results show that Plt-BDNF levels in remitted patients reach values similar to those of control subjects and that PPP-BDNF levels in patients tended to normalize along with the treatment, whereas other studies only performed a 6- or 8-week follow-up and, therefore, might underestimate the increase of BDNF levels (Aydemir et al. 2005, 2006; Yoshimura et al. 2007; Basterzi et al. 2009; Huang et al. 2008).

A few limitations should be kept in mind when evaluating our results. First, the sample size was relatively small, which may have limited our ability to determine meaningful differences, and we would consider these results preliminary until replication. Furthermore, the symptom assessments were limited to HDRS and may have missed some components of the depressive syndrome. Further studies are needed to analyze the influence of cyclic changes in hormonal status on BDNF levels, which were not considered in this study. Another consideration is that the best sample for the study of BDNF (plasma, serum or platelets) is not well established. It would be advisable to reach a consensus on standardizing the methodology used

to conduct research on BDNF in blood samples in order to avoid variability.

A potentially interesting application of Plt-BDNF measures could be as a biomarker of antidepressant efficacy. This suggests that the measure may be used to screen for novel antidepressant agents or possibly even predict an individual's response to an antidepressant treatment at an early time point after treatment initiation. This could be used to monitor the treatment. Our results indicate that Plt-BDNF could be more reliable than PPP-BDNF.

Acknowledgements This work was partially supported by a grant from Hospital Clínic, Barcelona, by Ministerio de Ciencia e Innovación [SAF 2008-05674-C03-03 and Red HERACLES RD06/0009/1003], and by Ministerio de Sanidad [FIS CP04-00112, FIS PS09-0664] from the Spanish Government.

Registered in Current Controlled Trials as ISRCTN11216093—Changes in plasma and platelet Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) levels induced by *S*-citalopram in major depression

The authors report no biomedical financial interests or potential conflicts of interest.

References

- American Psychiatric Association (APA) (2003) DSM-IV-TR Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales. Masson, Barcelona
- Ataoglu A, Canan F (2009) Mean platelet volume in patients with major depression: effect of escitalopram treatment. *J Clin Psychopharmacol* 29(4):368–371
- Atar D, Malinin A, Takserman A, Pokov A, van Zyl L, Tanguay JF et al (2006) Escitalopram, but not its major metabolites, exhibits antiplatelet activity in humans. *J Clin Psychopharmacol* 26(2):172–177
- Atar D, Malinin A, Pokov A, van Zyl L, Frasure-Smith N, Lesperance F et al (2007) Antiplatelet properties of escitalopram in patients with the metabolic syndrome: a dose-ranging in vitro study. *Neuropsychopharmacology* 32(11):2369–2374
- Aydemir O, Deveci A, Taneli F (2005) The effect of chronic antidepressant treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients: a preliminary study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29:261–265
- Aydemir C, Yalcin ES, Aksaray S, Kisa C, Yildirim SG, Uzbay T et al (2006) Brain derived neurotrophic factor (BDNF) changes in the serum of depressed women. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30:1256–1260
- Basterzi AD, Yazici K, Aslan E, Delialioğlu N, Tasdelen B, Tot Acar S et al (2009) Effects of fluoxetine and venlafaxine on serum brain derived neurotrophic factor levels in depressed patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33(2):281–285
- Blakely RD, Berson HE, Fremeau RT Jr, Caron MG, Peek MM, Prince HK et al (1991) Cloning and expression of a functional serotonin transporter from rat brain. *Nature* 354(6348):66–70
- Bocchio-Chiavetto L, Bagnardi V, Zanardini R, Monteni R, Nielsen MG, Placentino A et al (2010) Serum and plasma BDNF levels in major depression: a replication study and meta-analyses. *World J Biol Psychiatry* 11(6):763–773
- Brunoni AR, Lopes M, Fregni F (2008) 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* 11:1169–1180

- Camey RM, Freedland KE (2003) Depression, mortality, and medical morbidity in patients with coronary heart disease. *Biol Psychiatry* 54(3):241–247
- Camey RM, Blumenthal JA, Catellier D, Freedland KE, Berkman LF, Watkins LL et al (2003) Depression as a risk factor for mortality after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 92(11):1277–1281
- Camey RM, Freedland KE, Jaffe AS, Frasure-Smith N, Lesperance F, Sheps DS et al (2004) Depression as a risk factor for post-MI mortality. *J Am Coll Cardiol* 44(2):472–474
- Diaz-Ricart M, Arderiu G, Estebanell E, Perez-Pujol S, Lozano M, White JG et al (2002) Inhibition of cytoskeletal assembly by cytochalasin B prevents signaling through tyrosine phosphorylation of Syk cortacin and focal adhesion kinase: studies under flow conditions. *Am J Pathol* 160:329–337
- Duman R, Monteggia LM (2006) A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry* 59:1116–1127
- Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ (1997) A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry* 54:597–606
- Escobar G, Diaz-Ricart M, Gomez-Gil E, Serra M, Gasto C, Bozzo J et al (2005) Serotonergic mechanisms: a potential link between affective disorders and cardiovascular risk. *Drugs Today (Barc)* 41(11):721–743
- First MB, Spitzer RL, Gibbon M, Williams JBW (1999) *Entrevista clínica estructurada para los Trastornos del Eje I del DSM-IV-SCID I*. Masson, Barcelona
- Fujimura H, Altar CA, Chen R, Nakamura T, Nakahashi T, Kambayashi JI et al (2002) Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. *Thromb Haemost* 87:728–734
- Galan AM, Lopez-Vilchez I, Diaz-Ricart M, Navalon F, Gomez E, Gasto C et al (2009) Serotonergic mechanisms enhance platelet-mediated thrombogenicity. *Thromb Haemost* 102(3):511–519
- Gervasoni N, Aubry JM, Bondolfi G, Osiek C, Schwald M, Bertschy G et al (2005) Partial normalization of serum brain-derived neurotrophic factor in remitted patients after a major depressive episode. *Neuropsychobiology* 51:234–238
- Gonul AS, Akdeniz F, Taneli F, Donat O, Eker C, Vahip S (2005) Effect of treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 255:267–268
- Grassi-Oliveira R, Stein LM, Lopes RP, Teixeira AL, Bauer ME (2008) Low plasma brain-derived neurotrophic factor and childhood physical neglect are associated with verbal memory impairment in major depression—a preliminary report. *Biol Psychiatry* 64(4):281–285
- Hamilton M (1960) A rating scale for depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 23:56–62
- Hoffman BJ, Mezey E, Brownstein MJ (1991) Cloning of a serotonin transporter affected by antidepressants. *Science* 254(5031):579–580
- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 71(4):533–554
- Huang TL, Lee CT, Liu YL (2008) Serum brain-derived neurotrophic factor levels in patients with major depression: effects of antidepressants. *J Psychiatr Res* 42(7):521–525
- Karege F, Perret G, Bondolfi G, Schwald M, Bertschy G, Aubry JM (2002a) Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Res* 109(2):143–148
- Karege F, Schwald M, Cisse M (2002b) Postnatal developmental profile of brain derived neurotrophic factor in rat brain and platelets. *Neurosci Lett* 328(3):261–264
- Karege F, Bondolfi G, Gervasoni N, Schwald M, Aubry JM, Bertschy G (2005) 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* 57:1068–1072
- Kishino A, Katayama N, Ishige Y, Yamamoto Y, Ogo H, Tatsuno T et al (2001) Analysis of effects and pharmacokinetics of subcutaneously administered BDNF. *NeuroReport* 12(5):1067–1072
- Lee BH, Kim YK (2009) Reduced platelet BDNF level in patients with major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33(5):849–853
- Lee BH, Kim H, Park SH, Kim YK (2007) Decreased plasma BDNF level in depressive patients. *J Affect Disord* 101:239–244
- Lesch KP, Wolozin BL, Murphy DL, Reiderer P (1993) Primary structure of the human platelet serotonin uptake site: identity with the brain serotonin transporter. *J Neurochem* 60(6):2319–2322
- Lindsay RM, Wiegand SJ, Altar CA, DiStefano PS (1994) Neurotrophic factors: from molecule to man. *Trends Neurosci* 17:182–190
- Lommatzsch M, Braun A, Mammsfeldt A, Botchkarev VA, Botchkareva NV, Paus R et al (1999) Abundant production of brain-derived neurotrophic factor by adult visceral epithelia Implications paracrine target derived Neurotrophic functions. *Am J Pathol* 155(4):1183–1193
- Lommatzsch M, Zingler D, Schuhbaeck K, Schloetcke K, Zingler C, Schuff-Werner P et al (2005) The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. *Neurobiol Aging* 26:115–123
- Lommatzsch M, Niewerth A, Klotz J, Schulte-Herbrüggen O, Zingler C, Schuff-Werner P et al (2007) Platelet and plasma BDNF in lower respiratory tract infections of the adult. *Respir Med* 101(7):1493–1499
- Matriciano F, Bonaccorso S, Ricciardi A, Scaccianoce S, Panaccione I, Wang L et al (2009) Changes in BDNF serum levels in patients with major depression disorder (MDD) after 6 months treatment with sertraline, escitalopram, or venlafaxine. *J Psychiatr Res* 43(3):247–254
- Maurer-Spurej E, Pittendreigh C, Solomons K (2004) The influence of selective serotonin reuptake inhibitors on human platelet serotonin. *Thromb Haemost* 91(1):119–128
- Nakahashi T, Fujimura H, Altar CA, Li J, Kambayashi J, Tandon NN et al (2000) Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. *FEBS Lett* 470(2):113–117
- Pan W, Banks WA, Kastin AJ (1998) Permeability of the blood-brain barrier to neurotrophins. *Brain Res* 788:94–97
- Pandey GN, Dwivedi Y, Rizavi HS, Ren X, Zhang H, Pavuluri MN (2010) Brain derived neurotrophic factor gene and protein expression in pediatric and adult depressed subjects. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34:645–651
- Piccini A, Marazziti D, Catena M, Domenici L, Del Debbio A, Bianchi C et al (2008) Plasma and serum brain derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients during 1 year of antidepressant treatments. *J Affect Disord* 105:279–283
- Pliego-Rivero FB, Bayatti N, Giannakouloupoulos X, Glover V, Bradford HF, Stem G et al (1997) Brain-derived neurotrophic factor in human platelets. *Biochem Pharmacol* 54(1):207–209
- Poduslo JF, Curran GL (1996) Permeability at the blood–brain and blood–nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. *Brain Res Mol Brain Res* 36(2):280–286
- Radka SF, Holst PA, Fristche M, Altar CA (1996) 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* 709:122–130
- Ramamoorthy S, Bauman AL, Moore KR, Han H, Yang-Feng T, Chang AS et al (1993) Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression, and chromosomal localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(6):2542–2546
- Rosenfeld RD, Zeni L, Haniu M, Talvenheimo J, Radka SF, Bennett L et al (1995) Purification and identification of brain-derived

- neurotrophic factor from human serum. *Protein Expr Purif* 6 (4):465–471
- Sauer WH, Berlin JA, Kimmel SE (2003) Effect of antidepressants and their relative affinity for the serotonin transporter on the risk of myocardial infarction. *Circulation* 108(1):32–36
- Schlienger RG, Meier CR (2003) Effect of selective serotonin reuptake inhibitors on platelet activation: can they prevent acute myocardial infarction? *Am J Cardiovasc Drugs* 3(3):149–162
- Sen S, Duman R, Sanacora G (2008) Serum brain-derived neurotrophic factor, depression, and antidepressant medications: Meta-analyses and implications. *Biol Psychiatry* 64:527–532
- Shimizu E, Hashimoto K, Okamura N, Koike K, Komatsu N, Kumadiri C et al (2003) Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol Psychiatry* 54:70–75
- Stratz C, Trenk D, Bhatia HS, Valina C, Neumann FJ, Fiebich BL (2008) Identification of 5-HT₃ receptors on human platelets: increased surface immunoreactivity after activation with adenosine diphosphate (ADP) and thrombin receptor-activating peptide (TRAP). *Thromb Haemost* 99(4):784–786
- Trajkovska V, Marcussen AB, Vinberg M, Hartvig P, Aznar S, Knudsen GM (2007) Measurements of brain-derived neurotrophic factor: methodological aspects and demographical data. *Brain Res Bull* 73(1–3):143–149
- Yamamoto H, Gurney ME (1990) Human platelets contain brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 10(11):3469–3478
- Yoshimura R, Mitoma M, Sugita A, Hori H, Okamoto T, Umene W et al (2007) Effects of paroxetine or milnacipran on serum brain-derived neurotrophic factor in depressed patients. *Prog Neuro-psychopharmacol Biol Psychiatry* 31(5):1034–1037



Preliminary communication

Prothrombotic platelet phenotype in major depression: Downregulation by antidepressant treatment



Irene Lopez-Vilchez^{a,*}, Montserrat Serra-Millas^b, Victor Navarro^b, M. Rosa Hernandez^a,
Jaume Villalta^c, Maribel Diaz-Ricart^a, Cristobal Gasto^b, Gines Escolar^a, Ana M. Galan^a

^a Department of Hemotherapy and Hemostasis, Hospital Clinic, Biomedical Diagnosis Centre, Institute of Biomedical Research August Pi I Sunyer, University of Barcelona, Barcelona, Spain

^b Department of Psychiatry, Hospital Clinic, Institute Clinic of Neurosciences, Barcelona, Spain

^c Department of Internal Medicine, Hospital Clinic, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 October 2013

Received in revised form

10 February 2014

Accepted 12 February 2014

Available online 20 February 2014

Keywords:

Cardiovascular risk

Major depression

Platelets

Procoagulant profile

Prothrombotic phenotype

Selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI).

ABSTRACT

Background: Serotonergic mechanisms have been suggested as a link between major depression and cardiovascular risk. We investigated the existence of a prothrombotic condition in depressed patients and its possible modulation during treatment with a selective serotonin-reuptake inhibitor (SSRI).

Methods: Modifications in a series of biomarkers of platelet and coagulation activation were evaluated in blood from 19 patients with a major depression disorder (MDD) at the time of diagnosis, and at 8 and 24 weeks of treatment with escitalopram. Response of blood aliquots recirculated through a thrombogenic surface was assessed in a thrombosis model. Results were compared with those of 20 healthy-matched controls.

Results: In comparison with controls, platelets from MDD patients showed elevated volumes ($p < 0.01$), significantly enhanced aggregating response to arachidonic acid and augmented expression of GPIIb, fibrinogen, factor V, and anionic phospholipids by flow cytometry ($p < 0.05$). Clot firmness and procoagulant activity of platelet-associated tissue factor were also significantly elevated ($p < 0.05$). Studies with circulating blood revealed increased fibrin formation in early diagnosed patients ($71.1 \pm 9.5\%$ vs. $45.8 \pm 5.3\%$; $p < 0.05$ vs. controls). After 24 weeks of treatment with escitalopram, the majority of the alterations observed were normalized, except for a residual increased expression of GPIIb/IIIa ($p < 0.05$) and persistent alterations in thromboelastometric parameters.

Limitations: Despite the reduced number of followed-up patients our findings were consistent reaching statistical significance.

Conclusions: Our results reveal a prothrombotic phenotype in MDD patients. While continuous treatment with an SSRI downregulated the majority of the biomarkers analyzed, alterations in viscoelastic parameters of clot formation remained unaffected by the antidepressant treatment.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cardiovascular disease and major depression are highly prevalent disorders in our society. Clinical evidences confirm a reciprocal relationship between mechanisms of depression and those of cardiovascular pathology (Carney et al., 2004; Escolar et al., 2005; Maes et al., 2011). A diagnose of major depression in patients with coronary heart disease, increases cardiovascular morbidity and mortality up to 4–5 times (Carney and Freedland, 2003; Carney et al., 2004; O'Neil

et al., 2012; Shimbo et al., 2002). Major depression is also being considered an independent risk factor for cardiovascular complications (Maes et al., 2011; O'Neil et al., 2012). In accordance with these concepts, medical and scientific societies deeply recommend the use of screening tests for depressive symptoms to identify patients who may be at elevated cardiovascular risk (Lichtman et al., 2008).

Evidence is building along the concept that serotonergic mechanisms can provide the potential link between affective disorders and cardiovascular risk (Escolar et al., 2005). Platelets possess receptors for serotonin (5-HT), such as 5-HT_{2A} and 5-HT₃, and also a 5-HT transporter (SERT) in their membranes equivalent to those in serotonergic neurons (Hoyer et al., 2002; Purselle and Nemeroff, 2003; Stratz et al., 2008). 5-HT is rapidly incorporated into platelets, stored in the dense granules and secreted during

* Correspondence to: Servicio de Hemoterapia-Hemostasia, Hospital Clinic, Villarroel, 170, 08036 Barcelona, Spain. Tel.: +3493 227 5400x2034; fax: +349322798 89.
E-mail address: ilopez1@clinic.ub.es (I. Lopez-Vilchez).

stimulation. For this reason platelets have been experimentally used as neuronal models in the research of depression mechanisms. Functional implications of serotonergic mechanisms in hemostasis were not considered of relevance in the past. Data appeared in the last decade have revealed that serotonergic mechanisms could be involved in the generation of a subpopulation of highly thrombogenic platelets (Dale, 2005). Experimental studies from our group have demonstrated that 5-HT potentiated procoagulant responses of platelets and enhanced the thrombogenesis on damaged vascular surfaces, effects that were modulated by the presence of SSRIs (Galan et al., 2009; Lopez-Vilchez et al., 2009).

In the present study, we have investigated the possible prothrombotic profile in patients with major depression with special emphasis on biomarkers of platelet and coagulation activation. The potential modulating effects of antidepressant treatment with the SSRI escitalopram maintained for up to 24 weeks was also assessed.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and antibodies

Escitalopram (Lexapro[®]; Lundbeck A/S (Denmark); Low molecular weight heparin (LMWH, Fragmin[®], Pharmacia, Barcelona, Spain); Aggrepack ADP and collagen (ArkRay Inc; Kyoto, Japan); Arachidonic acid (Helena Biosciences Europe, Sunderland, UK). Anti-GPIIb/IIIa (BD Biosciences; CA, US); antibodies to CD62-P and CD63 (Immunotech; Marseille, France); anti-CD36 and annexin V (Pharmingen; San Diego, CA); anti-FV/Va (American Diagnostica Inc; Stamford, US); anti-Fibrinogen (FNG, DAKO A/S; Glostrup, DK) and anti-Von Willebrand Factor (VWF, Serotec Ltd; Oxford, UK). Immunoassay kit Enzygnost[®] F1+2micro and recombinant tissue factor Innovin[®]DADE[®] (Siemens Healthcare; Marburg BmbH, Germany). ROTEM reagents (Pentapharm GmbH; Munchen, Germany).

2.2. Experimental design

Modifications in platelet function and coagulation parameters were evaluated in 19 patients (11-females, 8-males) with major depression disorder (MDD) (unipolar major depression) at the time of diagnosis (P0), and after 8 (P8) and 24 (P24) weeks of treatment with escitalopram. Patients were diagnosed and followed-up at the psychiatry clinic of our Institution. Results were always compared with those obtained in 20 matched healthy individuals (HI). The study was approved by our institution Ethics Committee; [CEIC2009-4964]. Written informed consent was obtained from patients and healthy volunteers.

Eligible patients had to fulfill the DSM-IV criteria (American Psychiatric Association, 2000) for a current depressive episode and to have had a baseline 17-item Hamilton Depression Rating Scale (HDRS) score (adapted Spanish version) > 17 (Ramos-Brieva and Cordero-Villafila, 1988). Exclusion criteria included any history of mania, hypomania or non-affective psychosis, and current substance dependence.

None of the participants had taken drugs affecting hemostasis in the previous 10 days. Patients were given oral escitalopram starting with 5 mg/day for 4 days, up to 10 mg/day on the fifth day, and further adjusted as required until a maximum of 20 mg/day (average dose: 18 mg/day).

2.3. Blood sampling and routine hematology evaluation

Blood was drawn from the antecubital vein into 20 U/mL LMWH (Galan et al., 2009), or citrate/phosphate/dextrose (CPD)

(19 mM) depending on the experimental purposes. Platelet counts and mean platelet volume were determined in an Advia 2120 Hematology System (Siemens, Deerfield, IL, USA) using routine laboratory EDTA tubes.

2.4. Aggregation studies

Platelet-rich plasma (PRP) was prepared by centrifugation ($120 \times g$, 15 min) of citrated blood. Aggregation studies were performed in a four-channel aggregometer (APACT 4, Helena, BioSciences, Europe) (Galan et al., 2009). Platelet responses were tested with ADP (0.5 and 2 μ M), collagen (COL; 2.5 μ g/mL), arachidonic acid (AA; 1.4 mM), epinephrine (EPI; 10 μ M) and serotonin (5-HT; 5 μ M) added to PRP alone or in combination with ADP and EPI. Results were expressed as % of maximum aggregation.

2.5. Flow cytometry studies

Flow cytometry studies were performed in a FACScan (Becton-Dickinson, Mountain View, Calif, USA). PRP samples were incubated with saturating concentrations of PerCP-, FITC- and PE- conjugated antibodies (Galan et al., 2009; Lopez-Vilchez et al., 2012). Platelets were differentiated by their positivity to GPIIb-IIIa in a FACScan (Becton-Dickinson, Mountain View, Calif, USA). We also analyzed platelet-activation markers (CD36, CD62 and CD63), procoagulant markers (FV/Va, FNG and VWF) and binding of annexin V (ANV) to anionic phospholipids. For all the studies the negative control was an IgG1. All the results were expressed as mean intensity of fluorescence.

2.6. Assessment of procoagulant tissue factor in whole blood and platelets

Whole blood and washed platelets were lysed by freeze-thaw cycles and further ultracentrifuged ($600,000 \times g$, 10 min, 10 °C), to isolate the TF-bearing microvesicles. TF quantification was performed using a two-stage clotting assay as previously described (Key et al., 1998; Lopez-Vilchez et al., 2012). The clotting end-point was determined in a Dade Behring BFT[®] II Analyzer (Marburg BmbH, Germany). Values were expressed as pg/mL in whole blood and pg TF in 2×10^8 platelets in washed platelets.

2.7. Thromboelastometry studies

Clot formation in blood samples from HI and MDD patients, was investigated with the ROTEM Thromboelastometry Analyser (Pentapharm GmbH, Munchen, Germany). Clot formation was triggered with the EXTEM reagent. The following parameters were evaluated: clotting time (CT), clot formation time (CFT) and maximum clot firmness (MCF) (Galan et al., 2009).

2.8. Studies under flow conditions: perfusion experiments

Blood samples anticoagulated with LMWH were recirculated through an annular perfusion chamber, using a denuded rabbit aorta as thrombogenic substrata. Perfusion studies were performed at a shear rate of 600 s^{-1} , for 10 min at 37 °C. Perfused vessels were processed histologically for further morphometric evaluation. Platelet interaction and fibrin deposition on microscopy fields, were evaluated and quantified as percentage of platelet (%P) and fibrin (%F) coverage of the perfused vascular surface (Galan et al., 2009; Lopez-Vilchez et al., 2012).

2.9. Activation of coagulation during perfusion studies

Prothrombin activation during the perfusion studies was monitored through assessment of F1+2 fragment in the perfusates. Aliquots of blood were collected before and after perfusions and immediately mixed with sodium citrate (129 mM). Plasma levels of F1+2 were determined using the Enzygnost F1+2 assay, and values expressed as nmol/L (Galan et al., 2009).

2.10. Statistics

Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). One-way ANOVA test for independent experiments was applied when multiple comparisons were required, and student's *t*-test for paired data was used for comparisons between two different conditions.

3. Results

3.1. Clinical and laboratory determinations

We recruited and followed-up 19 MDD patients, aged between 18 and 65, and 20 matched HI used as controls. No statistical differences were observed between both groups attending age or sex. The average age at the current episode was of 49.6 ± 10.5 years; with 5.0 ± 2.1 months of episode duration. The improvement on the severity of depressive symptoms throughout treatment was confirmed (HDRS scores: 0.57 ± 0.31 for HI, 24.0 ± 1.0 for MDD-P0, 10.18 ± 1.9 for MDD-P8 and MDD-P24 3.9 ± 1.0 ; $p < 0.001$ between all points of study).

Routine platelet laboratory determinations revealed an increased mean platelet volume in MDD patients at the time of diagnose P0 (10.0 ± 0.1 fL vs. 8.3 ± 0.2 fL for HI; $p < 0.01$). This parameter decreased during treatment with SSRI, but still remained significantly increased after 24 weeks of treatment (9.4 ± 0.3 fL; $p < 0.01$ vs. HI).

3.2. Aggregation studies

As shown in table 1, platelets from patients at the time of diagnose of a MDD showed enhanced response to arachidonic acid ($p < 0.05$, vs. HI), accompanied by a decreased aggregation to 5-HT + ADP ($p < 0.01$ vs. HI). Treatment with escitalopram for 24 weeks restored both, platelet response to arachidonic acid and

5-HT + ADP, to levels observed in HI, but also resulted in a decrease in platelet aggregation to epinephrine ($p < 0.05$ vs. HI).

3.3. Flow cytometry studies

Platelets from patients with MDD at P0 showed signs of mild activation and a procoagulant phenotype when compared to platelets from HI. GPIb levels were augmented at P0 (69.7 ± 6.6 vs. 51.2 ± 4.9 in HI; $p < 0.05$), accompanied by an elevated expression of procoagulant markers such as anionic phospholipids, measured as ANV-binding (8.5 ± 2.6 in MDD-P0 vs. 3.2 ± 0.3 in HI; $p < 0.05$), and FV/Va (8.8 ± 2.2 in MDD-P0 vs. $4.0 \pm 0.5\%$ in HI; $p < 0.05$). Treatment with SSRI for 24 weeks restored these differences to values similar to those found in HI, but still revealed an increased expression of GPIIb/IIIa at this observation time (105.3 ± 6.0 vs. 87.4 ± 2.5 in HI, $p < 0.05$). Results are summarized in fig. 1.

3.4. Procoagulant tissue factor (TF) in whole blood and platelets

TF-procoagulant activity was significantly elevated in the platelet fraction from patients with MDD at P0 ($p < 0.05$ vs. HI), though no differences were observed in determinations performed in whole blood (see table 1). Treatment with escitalopram lowered levels of TF-procoagulant activity in both, platelets and whole blood fractions.

3.5. Modifications on thromboelastometric properties of clots

Thromboelastometry studies EXTEM test showed no significant changes in clot formation times (CT and CFT) between patients with MDD at P0 and HI, though maximum clot firmness (MCF) was significantly enhanced at this observation time (65.1 ± 1.2 mm vs. 60.8 ± 1.2 mm in HI; $p < 0.05$). CFT values tended to shorten progressively during treatment with escitalopram reaching statistical significance at P24 (72.1 ± 3.9 s vs. 88.3 ± 6.4 vs. MDD-P0; $p < 0.05$). MCF remained significantly increased in patients with MDD throughout the treatment with escitalopram, persisting in values above the controls even at MDD-P24 (65.3 ± 1.1 mm; $p < 0.05$ vs. HI).

3.6. Perfusion Studies

As shown in fig. 2, perfusion studies revealed an enhanced procoagulant phenotype in blood from patients with MDD at P0, confirmed by a significant increase in fibrin coverage (%F: 58.8 ± 8.6

Table 1

Evolution of laboratory measurements in healthy individuals (HI) and patients with a major depression disorder (MDD) evaluated at the time of diagnose (P0), and at 8 (P8) or 24 (P24) weeks of treatment with escitalopram.

	HI	MDD-P0	MDD-P8	MDD-P24
Percentage of maximum platelet aggregation				
AA (1.4 mM)	78.1 ± 2.1	85.1 ± 2.4 1;*	77.0 ± 0.2 †	72.1 ± 3.5 †
COL (2.5 μ g/mL)	81.6 ± 2.9	82.3 ± 3.9	82.7 ± 3.2	80.0 ± 3.9
ADP (4 μ M)	78.7 ± 1.9	78.4 ± 7.3	69.3 ± 7.7	82.4 ± 11.9
ADP (0.5 μ M)	15.9 ± 2.2	14.8 ± 2.1	20.9 ± 6.5	19.1 ± 5.1
5-HT + ADP (0.5 μ M)	62.2 ± 5.6	38.2 ± 5.2 *	44.2 ± 6.8 1;*	61.9 ± 8.3 †
EPI (10 μ M)	82.0 ± 2.7	72.3 ± 6.3	67.9 ± 8.3	59.0 ± 10.3 1;*
5-HT + EPI (10 μ M)	88.7 ± 1.7	81.0 ± 6.5	76.5 ± 4.7	79.8 ± 4.2
Tissue factor procoagulant activity				
Whole blood (pg/mL)	42.2 ± 5.9	39.8 ± 3.3	37.9 ± 4.1	27.0 ± 3.9 †
Platelets (pg per 2×10^8 platelets)	14.0 ± 3.3	61.4 ± 23.5 *	23.4 ± 3.7	27.1 ± 15.4

Results are expressed as MEAN \pm SEM, N=19.

* $p < 0.01$ vs. HI.

† $p < 0.05$ vs. HI.

‡ $p < 0.05$ vs. P0.

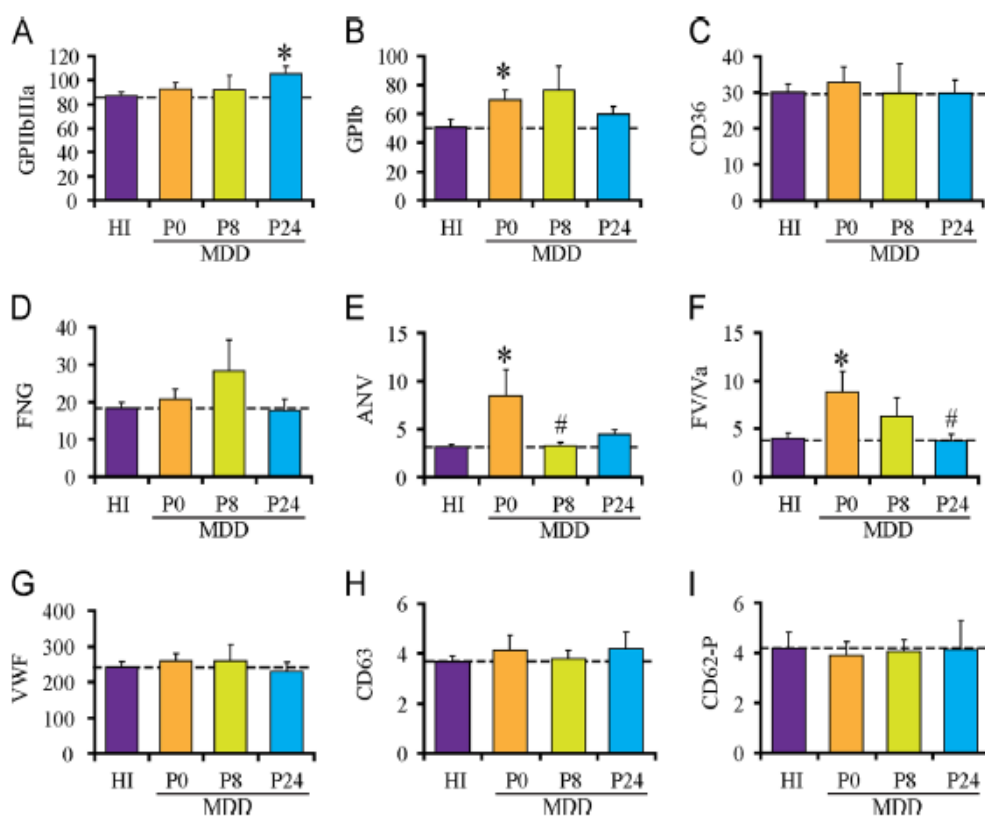


Fig. 1. Flow cytometry evaluation of platelets from healthy individuals (HI) and from patients with major depression disorder (MDD). Bar diagrams summarize the mean of fluorescence intensity measured for the different antigens studied in samples from HI and major depression patients before (P0) and during treatment with escitalopram, for 8 weeks (P8) and 24 weeks (P24). Antigens evaluated include major glycoproteins: GPIIb/IIIa (panel A), GPIb (panel B) and GPIV (panel C); antigens related to platelet procoagulant activity: fibrinogen (FNG), Annexin V (ANV) and FV/Va (panels D, E and F, respectively); and VWF (panel G) and platelet activation markers: CD63 and CD62-P (panels H and I, respectively). * $p < 0.05$ vs. HI and # $p < 0.05$ vs. MDD-P0.

vs. 38.0 ± 5.1 in HI; $p < 0.05$). Platelet coverage appeared slightly decreased in patients with MDD at P0 with respect to HI (%P: 25.2 ± 1.3 vs. 29.5 ± 2.9 in HI). An important reduction of fibrin formation on the subendothelium was observed after continued treatment (MDD-P24) with escitalopram ($26.0 \pm 6.2\%$ vs. MDD-P0, respectively; $p < 0.01$).

3.7. Activation of coagulation mechanisms during perfusion studies

Thrombin generation during perfusion, indirectly measured as prothrombin fragments F1 + 2, paralleled data obtained in perfusion experiments. F1 + 2 levels were enhanced in experiments performed with blood from patients with MDD at P0 (1.1 ± 0.4 nM vs. 0.7 ± 0.2 nM in HI). A progressive decrease in levels of F1 + 2 generated during the perfusion experiments was observed along the treatment with escitalopram (0.9 ± 0.2 nM at MDD-P8), reaching statistical significance in the perfusates from blood drawn at MDD-P24 (0.4 ± 0.1 nM; $p < 0.05$).

4. Discussion

We evaluated a series of biomarkers of platelet and coagulation activation, in a group of patients with MDD at the time of diagnosis and during 24 weeks of treatment with escitalopram. Our data reveal the existence of a platelet-related prothrombotic phenotype at the time of diagnose. This phenotype is characterized by increased mean platelet volumes, augmented responses to arachidonic acid, elevated exposure of platelet procoagulant markers, increased presence of platelet-associated TF, augmented clot firmness, and enhanced fibrin formation in perfusion studies. Treatment with SSRI for 24 weeks normalized the majority of these parameters, but accentuated the expression of GPIIb/IIIa and

the viscoelastic properties of clots formed under low shear rate conditions.

The association between cardiovascular disease and major depression seems both reciprocal and complex (Bigger and Glassman, 2010; Lippi et al., 2009; Shimbo et al., 2002; Whang and Davidson, 2009a). Data from the present study confirm a moderate, though significant increase in the aggregating response to arachidonic acid accompanied by a reduced platelet response to combinations of 5-HT with low concentrations of ADP in patients with a MDD. Aggregation to arachidonic acid involves thromboxane generation and interactions with the thromboxane receptor, a G-protein coupled receptor that is independent of the activation pathways triggered through collagen receptors (Alberio and Dale, 1999). In contrast with arachidonic acid, 5-HT is a weak platelet agonist that requires co-stimulation with other agonists to induce full platelet activation (Galan et al., 2009).

Continued treatment with the SSRI may modulate circulating levels of 5-HT, but also the presence and reactivity of the serotonergic mechanisms in platelets (Gunther et al., 2008; Yamauchi et al., 2006). It has been suggested the existence of a link between serotonergic mechanisms (SERT and 5-HT_{2A}) and ADP receptor-coupled intracellular signaling. It is likely that modifications in circulating levels of 5-HT induced by treatment with SSRI (Bismuth-Evenzal et al., 2012; Maurer-Spurej et al., 2004) could affect signaling via the P2Y₁₂ and G-protein receptor, as they share with SERT signaling mechanism involving Gi-coupling and adenylyl-cyclase (Ding et al., 2003; Offermanns, 2006). Interestingly, SSRI-treatment for 24 weeks normalized the aggregating response to both arachidonic acid and the combination of 5-HT and ADP. Tricyclic Antidepressant and other psychotropic drugs have been implied in alterations on second messenger pathways (cyclic adenosine monophosphate-adenylate cyclase and phosphoinositide cycle), and impaired calcium mobilization, that are critical for proper platelet activation (Oruch et al., 2008;

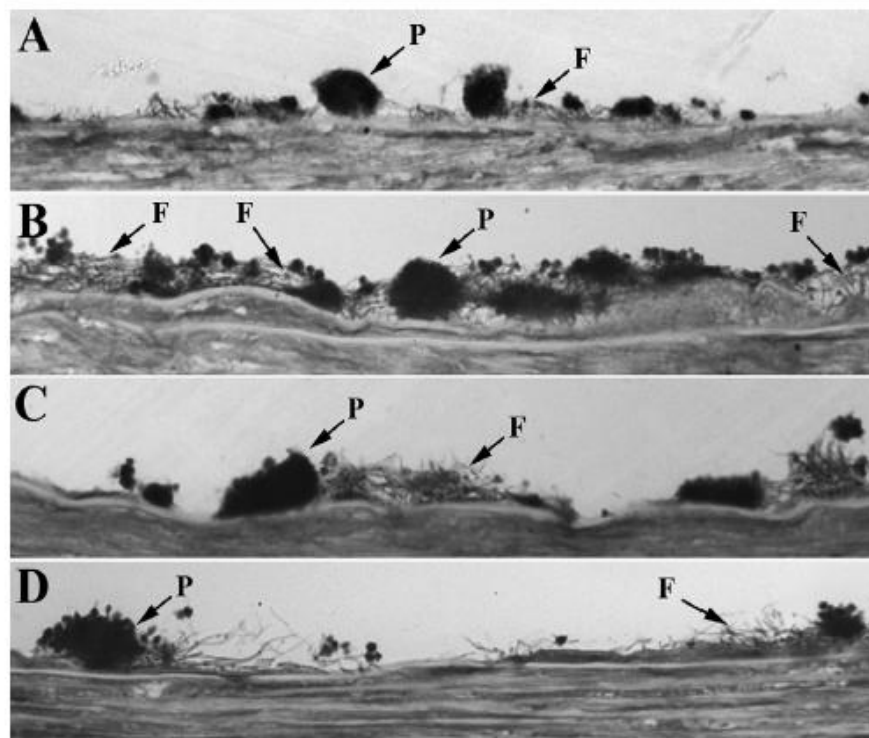


Fig. 2. Light micrographs illustrating representative microscopic fields observed in perfusion studies performed with blood samples from healthy individuals (A) or from patients with a major depression disorder at the time of the diagnose (B), and after 8 weeks (C) and 24 weeks (D) of treatment with escitalopram. Patients with major depression showed an increased procoagulant activity that tends to normalize during treatment, together with a reduction in platelet reactivity towards the subendothelium at 24 weeks. Magnification: 400 × (P: platelets interactions; F: fibrin masses).

Rehavi et al., 1993). It is worth mentioning in this context that these effects of antidepressant and psychotropic drugs on platelet signaling mechanisms are only evident at concentrations that exceed those reached under standard therapy for MDD. There is an increasing interest on the development of new molecules based on SSRI, with enhanced antithrombotic action and minimal psychotropic impact (Bismuth-Evenzal et al., 2010).

We also found that mean platelet volumes, expression of GPIb, as well as other platelet activation markers, were elevated in comparison with platelets from matched healthy individuals. These results are compatible with an enhanced platelet reactivity already communicated, for both patients with cardiovascular disease and patients with major depression (Ataoglu and Canan, 2009; Dale, 2005). Our results demonstrate the existence of a significantly increased procoagulant activity of TF in platelets isolated from patients at the time of diagnose. Platelet-associated TF could contribute to an enhanced prothrombotic profile of platelets and the precipitation of ischemic event at sites of vascular damage (Lopez-Vilchez et al., 2012).

Although our study was carried out in a limited number of patients, the results indicate the existence of a moderate, but significantly consistent prothrombotic phenotype in patients with major depression assessed through different biomarkers. The relevance of this prothrombotic phenotype was further confirmed in studies in a thrombosis model using circulating blood. Once more, SSRI-treatment in depressed patients rapidly and effectively counteracted the enhanced fibrin formation observed under flow conditions confirming in the clinical setting previous experimental *in vitro* studies (Galan et al., 2009).

Overall our results indicate that strategies aimed at the pharmacological control of serotonergic mechanisms in platelets, such as treatment with SSRI, may offer a potential therapeutic approach for downregulating the platelet-related prothrombotic status in depressed patients as previously suggested by Atar and cols (Atar et al., 2007). Previous studies from our group have

demonstrated that 5-HT can definitely potentiate platelet mediated thrombogenesis (Galan et al., 2009). Patients treated with SSRI show a reduction in cardiovascular risk when compared with patients not receiving antidepressants (Lesperance et al., 2007; Taylor et al., 2005). Recent studies suggest that not only major depression, but also anxiety disorders do also contribute to an increased risk of stroke and heart failure, and would benefit from antidepressant treatment (Garfield et al., 2014; Lambiasi et al., 2014). Further studies should investigate whether or not findings of our studies could be confirmed in patients with anxiety disorders.

Several studies have reported that SSRI interfere with platelet function increasing bleeding risk when used alone or in combination with antiplatelet therapies (Andrade et al., 2010; de Abajo et al., 2006; Labos et al., 2011). While our data seem to indicate that treatment with SSRI can downregulate the thrombotic phenotype developing in patients with major depression, the thromboelastometric data provided conflicting results. In contrast with the downregulation observed in most of the previously commented biomarkers, viscoelastic parameters showed a progressive acceleration of clotting time and enhanced clot strength during the treatment with escitalopram. The main difference between perfusion studies and thromboelastometry rely on the different shear rates, elevated in the former and very reduced in the latter, plus the fact that thromboelastometric analysis offer qualitative information on the resistance of the clots formed. Several reports have emerged implying the development of an elevated risk for coronary heart disease and sudden cardiac death in patients subjected to antidepressants or psychotropic medication (Honkola et al., 2012; Rosenberg et al., 2010; Whang et al., 2009b). It is not unlikely that a continuous treatment with SSRI may induce an imbalance in circulating pools of 5-HT in the plasma and platelets that could negatively affect other mechanisms of coagulation and fibrinolysis (Jedlitschky et al., 2012; Ziu et al., 2012). Although these potential thrombotic complications

deserve further investigations, current opinion is that treatment with SSRI is safe and does not cause major adverse events related to their effects on the hemostatic system.

In summary, our results reveal a prothrombotic phenotype in major depression patients at the moment of diagnosis. Treatment with a SSRI offers a potential approach for the down-regulation of the platelet-related contribution to thrombogenesis. Nevertheless, maintained treatment with SSRI caused alterations in qualitative aspects of experimental clots. Further studies are required to evaluate the complexity of the pharmacological implications of antidepressant therapies and their possible interference with platelet and plasma related coagulation mechanisms.

Role of funding source

This work was partially supported by grants: FIS PI13/00517, SAF 2011–28214, RETICS RD12/0042/0016, and CIBERSAM CB07/09/0005–G25 from the Spanish government. Dr. Galan belongs to the Researcher's stabilization program of the ISCIII from the Spanish government and the "Direcció d'Estratègia i Coordinació del Departament de Salut" from the Generalitat of Catalunya.

Conflict of interest

There are no potential conflicts of interest to disclose.

Acknowledgments

Authors want to thank Marcos Pino for his technical assistance.

References

- Alberio, L., Dale, G.L., 1999. Platelet–collagen interactions: membrane receptors and intracellular signalling pathways. *Eur. J. Clin. Invest.* 29, 1066–1076.
- American Psychiatric Association, 2000. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4th ed. American Psychiatric Press, Washington, DC (DSM-IV-TR®).
- Andrade, C., Sandarsh, S., Chethan, K.B., Nagesh, K.S., 2010. Serotonin reuptake inhibitor antidepressants and abnormal bleeding: a review for clinicians and a reconsideration of mechanisms. *J. Clin. Psychiatry* 71, 1565–1575.
- Ataoglu, A., Canan, F., 2009. Mean platelet volume in patients with major depression: effect of escitalopram treatment. *J. Clin. Psychopharmacol.* 29, 368–371.
- Atar, D., Malinin, A., Pokov, A., van Zyl, L., Frasure-Smith, N., Lesperance, F., Serebruany, V.L., 2007. Antiplatelet properties of escitalopram in patients with the metabolic syndrome: a dose-ranging in vitro study. *Neuropsychopharmacology* 32, 2369–2374.
- Bigger, J.T., Glassman, A.H., 2010. The American Heart Association science advisory on depression and coronary heart disease: an exploration of the issues raised. *Cleve. Clin. J. Med.* 77 (3), S12–S19.
- Bismuth-Evenzal, Y., Gonopolsky, Y., Gurwitz, D., Iancu, I., Weizman, A., Rehavi, M., 2012. Decreased serotonin content and reduced agonist-induced aggregation in platelets of patients chronically medicated with SSRI drugs. *J. Affect. Disord.* 136, 99–103.
- Bismuth-Evenzal, Y., Roz, N., Gurwitz, D., Rehavi, M., 2010. N-methyl-citalopram: A quaternary selective serotonin reuptake inhibitor. *Biochem. Pharmacol.* 80, 1546–1552.
- Carney, R.M., Freedland, K.E., 2003. Depression, mortality, and medical morbidity in patients with coronary heart disease. *Biol. Psychiatry* 54, 241–247.
- Carney, R.M., Freedland, K.E., Jaffe, A.S., Frasure-Smith, N., Lesperance, F., Sheps, D. S., Glassman, A.H., O'connor, C.M., Blumenthal, J.A., Kaufmann, P.G., Czajkowski, S.M., 2004. Depression as a risk factor for post-MI mortality. *J. Am. Coll. Cardiol.* 44, 472–474.
- Dale, G.L., 2005. Coated-platelets: an emerging component of the procoagulant response. *J. Thromb. Haemost.* 3, 2185–2192.
- de Abajo, F.J., Montero, D., Rodriguez, L.A., Madurga, M., 2006. Antidepressants and risk of upper gastrointestinal bleeding. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 98, 304–310.
- Ding, Z., Kim, S., Dorsam, R.T., Jin, J., Kunapuli, S.P., 2003. Inactivation of the human P2Y₁₂ receptor by thiol reagents requires interaction with both extracellular cysteine residues, Cys17 and Cys270. *Blood* 101, 3908–3914.
- Escolar, G., Diaz-Ricart, M., Gomez-Gil, E., Serra, M., Gasto, C., Bozzo, J., Galan, A.M., 2005. Serotonergic mechanisms: a potential link between affective disorders and cardiovascular risk. *Drugs Today (Barc)* 41, 721–743.
- Galan, A.M., Lopez-Vilchez, I., Diaz-Ricart, M., Navalon, F., Gomez, E., Gasto, C., Escolar, G., 2009. Serotonergic mechanisms enhance platelet-mediated thrombogenicity. *Thromb. Haemost.* 102, 511–519.
- Garfield, L.D., Scherrer, J.F., Hauptman, P.J., Freedland, K.E., Chrusciel, T., Balasubramanian, S., Carney, R.M., Newcomer, J.W., Owen, R., Buchholz, K.K., Lustman, P.J., 2014. Association of anxiety disorders and depression with incident heart failure. *Psychosom. Med.* 76, 128–136.
- Gunther, L., Liebscher, S., Jahkel, M., Oehler, J., 2008. Effects of chronic citalopram treatment on 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in group- and isolation-housed mice. *Eur. J. Pharmacol.* 593, 49–61.
- Honkola, J., Hookana, E., Malinen, S., Kaikkonen, K.S., Junttila, M.J., Isohanni, M., Kortelainen, M.L., Huikuri, H.V., 2012. Psychotropic medications and the risk of sudden cardiac death during an acute coronary event. *Eur. Heart J.* 33, 745–751.
- Hoyer, D., Hannon, J.P., Martin, G.R., 2002. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71, 533–554.
- Jedlitschky, G., Greinacher, A., Kroemer, H.K., 2012. Transporters in human platelets: physiologic function and impact for pharmacotherapy. *Blood* 119, 3394–3402.
- Key, N.S., Slungaard, A., Dandele, L., Nelson, S.C., Moertel, C., Styles, L.A., Kuypers, F. A., Bach, R.R., 1998. Whole blood tissue procoagulant activity is elevated in patients with sickle cell disease. *Blood* 91, 4216–4223.
- Labos, C., Dasgupta, K., Nedjar, H., Turecki, G., Rahme, E., 2011. Risk of bleeding associated with combined use of selective serotonin reuptake inhibitors and antiplatelet therapy following acute myocardial infarction. *CMAJ* 183, 1835–1843.
- Lambiase, M.J., Kubzansky, L.D., Thurston, R.C., 2014. Prospective study of anxiety and incident stroke. *Stroke* 45, 438–443.
- Lesperance, F., Frasure-Smith, N., Koszycki, D., Laliberte, M.A., Van Zyl, L.T., Baker, B., Swenson, J.R., Ghatavi, K., Abramson, B.L., Dorian, P., Guertin, M.C., 2007. Effects of citalopram and interpersonal psychotherapy on depression in patients with coronary artery disease: the Canadian Cardiac Randomized Evaluation of Antidepressant and Psychotherapy Efficacy (CREATE) trial. *JAMA* 297, 367–379.
- Lichtman, J.H., Bigger, J.T., Blumenthal, J.A., Frasure-Smith, N., Kaufmann, P.G., Lesperance, F., Mark, D.B., Sheps, D.S., Taylor, C.B., Froelicher, E.S., 2008. Depression and coronary heart disease: recommendations for screening, referral, and treatment: a science advisory from the American Heart Association Prevention Committee of the council on cardiovascular nursing, council on clinical cardiology, council on epidemiology and prevention, and interdisciplinary council on quality of care and outcomes research: endorsed by the American Psychiatric Association. *Circulation* 118, 1768–1775.
- Lippi, G., Montagnana, M., Favaloro, E.J., Franchini, M., 2009. Mental depression and cardiovascular disease: a multifaceted, bidirectional association. *Semin. Thromb. Hemost.* 35, 325–336.
- Lopez-Vilchez, I., Diaz-Ricart, M., White, J.G., Escolar, G., Galan, A.M., 2009. Serotonin enhances platelet procoagulant properties and their activation induced during platelet tissue factor uptake. *Cardiovasc. Res.* 84, 309–316.
- Lopez-Vilchez, I., Galan, A.M., Hernandez, M.R., Caballo, C., Roque, M., az-Ricart, M., White, J.G., Escolar, G., 2012. Platelet-associated tissue factor enhances platelet reactivity and thrombin generation in experimental studies in vitro. *Thromb. Res.* 130, e294–e300.
- Maes, M., Ruckoanich, P., Chang, Y.S., Mahanonda, N., Berk, M., 2011. Multiple aberrations in shared inflammatory and oxidative & nitrosative stress (IO&NS) pathways explain the co-association of depression and cardiovascular disorder (CVD), and the increased risk for CVD and due mortality in depressed patients. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 35, 769–783.
- Maurer-Spreij, E., Pittendreich, C., Solomons, K., 2004. The influence of selective serotonin reuptake inhibitors on human platelet serotonin. *Thromb. Haemost.* 91, 119–128.
- O'Neil, A., Williams, E.D., Stevenson, C.E., Oldenburg, B., Berk, M., Sanderson, K., 2012. Co-morbid cardiovascular disease and depression: sequence of disease onset is linked to mental but not physical self-rated health. Results from a cross-sectional, population-based study. *Soc. Psychiatry Psychiatr. Epidemiol.* 47, 1145–1151.
- Offermanns, S., 2006. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ. Res.* 99, 1293–1304.
- Oruch, R., Hodneland, E., Pyme, I.F., Holmsen, H., 2008. Psychotropic drugs interfere with the tight coupling of polyphosphoinositide cycle metabolites in human platelets: a result of receptor-independent drug intercalation in the plasma membrane? *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 2165–2176.
- Purselle, D.C., Nemeroff, C.B., 2003. Serotonin transporter: A potential substrate in the biology of suicide. *Neuropsychopharmacology* 28, 613–619.
- Ramos-Brieva, J.A., Cordero-Villafañila, A., 1988. A new validation of the Hamilton Rating Scale for Depression. *J. Psychiatr. Res.* 22, 21–28.
- Rehavi, M., Jerushalemi, Z., Aviv, A., Laor, N., Podlizewski, E., Karp, L., Shavit, S., Weizman, R., 1993. Interaction between antidepressants and phosphoinositide signal transduction system in human platelets. *Biol. Psychiatry* 33, 40–44.
- Rosenberg, L.B., Whang, W., Shimbo, D., Shah, A., Shapiro, P.A., Davidson, K.W., 2010. Exposure to tricyclic antidepressants is associated with an increased risk of incident CHD events in a population-based study. *Int. J. Cardiol.* 145, 124–125.
- Shimbo, D., Child, J., Davidson, K., Geer, E., Osende, J.I., Reddy, S., Dronge, A., Fuster, V., Badimon, J.J., 2002. Exaggerated serotonin-mediated platelet reactivity as a possible link in depression and acute coronary syndromes. *Am. J. Cardiol.* 89, 331–333.
- Stratz, C., Trenk, D., Bhatia, H.S., Valina, C., Neumann, F.J., Fiebich, B.L., 2008. Identification of 5-HT₃ receptors on human platelets: increased surface immunoreactivity after activation with adenosine diphosphate (ADP) and thrombin receptor-activating peptide (TRAP). *Thromb. Haemost.* 99, 784–786.

- Taylor, C.B., Youngblood, M.E., Catellier, D., Veith, R.C., Carney, R.M., Burg, M.M., Kaufmann, P.G., Shuster, J., Mellman, T., Blumenthal, J.A., Krishnan, R., Jaffe, A.S., 2005. Effects of antidepressant medication on morbidity and mortality in depressed patients after myocardial infarction. *Arch. Gen. Psychiatry* 62, 792–798.
- Whang, W., Davidson, K.W., 2009a. Is it time to treat depression in patients with cardiovascular disease? *Circulation* 120, 99–100.
- Whang, W., Kubzansky, L.D., Kawachi, I., Rexrode, K.M., Kroenke, C.H., Glynn, R.J., Garan, H., Albert, C.M., 2009b. Depression and risk of sudden cardiac death and coronary heart disease in women: results from the Nurses' Health Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 53, 950–958.
- Yamauchi, M., Miyara, T., Matsushima, T., Imanishi, T., 2006. Desensitization of 5-HT_{2A} receptor function by chronic administration of selective serotonin reuptake inhibitors. *Brain Res.* 1067, 164–169.
- Ziu, E., Mercado, C.P., Li, Y., Singh, P., Ahmed, B.A., Freyaldenhoven, S., Lensing, S., Ware, J., Kilic, E., 2012. Down-regulation of the serotonin transporter in hyperreactive platelets counteracts the pro-thrombotic effect of serotonin. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 52, 1112–1121.

DISCUSSIÓ

La malaltia depressiva presenta alteracions en paràmetres biològics que s'han estudiat buscant marcadors de malaltia i de resposta al tractament. La molècula més estudiada en la depressió és la serotonina, però a finals del segle XX es va qüestionar la hipòtesi monoaminèrgica de la depressió i es va orientar com a alteracions en la neuroplasticitat. En els darrers anys s'ha vist que aquestes teories són complementàries i no excloents i que no hi ha una teoria única per explicar la depressió. Els articles presentats en aquesta tesi han estudiat els efectes de la depressió en dos aspectes molt relacionats amb la serotonina com són el BDNF, molt implicat en la neuroplasticitat, i l'alteració en l'agregació plaquetària i en la coagulació. També s'han avaluat els canvis que es produeixen amb un inhibidor de la recaptació de serotonina (ISRS), l'escitalopram, que intervé principalment a través de la serotonina i que pertany al grup dels antidepressius més utilitzats en l'actualitat.

ALTERACIONS AGREGACIÓ I COAGULACIÓ EN LA DEPRESSIÓ I EFECTES DELS ISRS

En el segon article hem investigat les modificacions en l'hemostàsia dels pacients amb depressió major en el moment del diagnòstic (P0) i durant el tractament amb ISRS i també els hem comparat amb els controls sans. S'observa l'existència d'un endofenotip protrombòtic en les plaquetes dels pacients depressius abans del tractament caracteritzat per un augment estadísticament significatiu del volum mitjà de les plaquetes, una elevada expressió de GPIIb, així com d'antígens procoagulants i marcadors d'activació plaquetària i increment de la fermesa del coàgul. L'activitat procoagulant del factor tissular associat a plaquetes es mostra incrementat i també s'observa un augment de la formació de fibrina i de la generació de trombina respecte a la sang de donants sans quan s'exposa a una superfície trombogènica en condicions de flux, el que pot contribuir a un augment del perfil protrombòtic de les plaquetes i a la precipitació d'esdeveniments isquèmics en els llocs de lesió vascular (201). Respecte als estudis d'agregació s'observa un increment moderat de l'agregació de les plaquetes en resposta a àcid araquidònic, acompanyat per una reducció en les respostes induïdes per combinacions de 5-HT i baixes concentracions d'ADP. La resposta inicialment reduïda a la 5-

HT observada en el nostre estudi podria indicar una alteració en la presència i l'afinitat del receptor 5-HT_{2A} (202), receptors que ha estat associat a la depressió en diversos estudis.

En el nostre estudi s'avalua les variacions en pacients tractats amb ISRS de forma contínua i a les dosis utilitzades pel tractament, essent un model més exacte dels canvis observats en els pacients depressius. El tractament continuat amb l'ISRS pot modular els nivells de 5-HT circulant i la presència i reactivitat dels mecanismes serotoninèrgics en les plaquetes (202,203). El tractament amb escitalopram durant 24 setmanes regula la majoria d'aquests paràmetres, normalitzant la resposta d'agregació a àcid araquidònic i a 5-HT+ADP, no obstant això, no disminueix la força del coàgul i accentua l'expressió de GPIIb/IIIa i les propietats viscoelàstiques dels trombes formats en condicions de velocitat de cisalla reduïda. En general, el tractament amb ISRS en els pacients deprimits regula a la baixa el fenotip trombogènic, contraresta amb rapidesa i eficàcia l'estat protrombòtic i procoagulant observat sota condicions de flux i donen suport a què el control farmacològic dels mecanismes serotoninèrgics en les plaquetes, com el provocat pels ISRS, poden oferir un potencial terapèutic per regular a la baixa l'estat protrombòtic dels pacients deprimits com ja s'ha suggerit en altres estudis (177). No obstant això, els paràmetres tromboelastromètrics mostren resultats contradictoris, però aquests resultats es fan en condicions quasi estàtiques i no indica una situació fisiològica perquè la sang està en circulació. Altres estudis recents relacionen un major risc de malaltia coronària i mort sobtada cardíaca en pacients tractats amb antidepressius o medicaments psicòtrops (204,205), el que podria relacionar-se amb les troballes tromboelastromètriques. No és improbable que el tractament continuat amb ISRS pugui induir un desequilibri en els pools de 5-HT en el plasma i les plaquetes que podria afectar negativament a altres mecanismes de la coagulació i la fibrinòlisi (206,207).

Un estudi anterior del nostre grup va estudiar com els ISRS interfereixen amb l'hemostàsia (148). Els ISRSs redueixen la concentració de serotonina en sang total i en plaquetes posteriorment a l'administració repetida, atenuant els efectes de 5-HT en l'activació plaquetària (208) i provoca uns efectes que serien els esperables inicialment a partir d'antagonistes específics de 5-HT_{2A}. Respecte paràmetres d'hemostàsia primària, la presència de ISRS a

dosís clíniques redueix el percentatge d'agregació de plaquetes (solament està totalment inhibida si s'incuba a dosís deu vegades superiors a les dosís clíniques més altes) i inhibeix la potenciació causada per l'exposició combinada a 5-HT i ADP, observant-se reduccions significatives de fins al 40% de l'activació plaquetària mesurada per l'expressió de CD62-P i annexin V (ANV) en plaquetes tractades amb citalopram ($p < 0,05$), però l'alliberament de factor V/Va a partir dels grànuls alfa quasi no s'afectava. Els ISRS regulen a la baixa la tendència protrombòtica observada en condicions experimentals, mostrand-se reduccions *in vitro* en els marcadors plaquetaris d'activació, agregació o ambdós després del tractament (148,177,209–211). També hi ha troballes negatives respecte a la reducció dels marcadors d'activació plaquetària posteriorment a tractaments amb ISRSs, indicant una millora dels paràmetres de la coagulació per un increment d'òxid nítric total, però no associat a una reducció en altres marcadors d'activació plaquetària com els nivells de P-selectina, β -tromboglobulina (212).

En paràmetres d'hemostàsia secundària, la incubació amb ISRS disminueix el pic de generació de trombina a causa de serotonina però no afecta la generació de trombina si s'associa 5-HT+ADP. Els ISRS també mostren un efecte neutralitzant moderat de la serotonina respecte als paràmetres dinàmics de formació de coàguls, observant-se que el temps de coagulació i el de formació de coàgul estaven lleugerament incrementats respecte a serotonina, mentre que l'amplitud del coàgul al cap de 10 minuts estava disminuït. En estudis de perfusió, la incubació amb ISRS mostra una reducció significativa de la superfície coberta per grans agregats a alta velocitat de cisalla i s'observa una disminució en el percentatge de superfície coberta per fibrina a baixa velocitat de cisalla. En general, la reducció dels patrons trombogènics observats amb els ISRS eren més evidents en condicions d'alta velocitat de cisalla (sistemes d'agregació i perfusió) i menys evidents sota condicions estables (tromboelastrometria i assajos de generació de trombina).

Aquestes alteracions poden contribuir a incrementar la susceptibilitat per la coagulació sanguínia en pacients amb depressió i l'increment en el risc de trastorn coronari agut en pacients amb depressió podria ser, almenys en part, el resultat de defectes en l'activació i agregació plaquetària. Això ha obert el debat de si els pacients amb depressió i patologia

cardiovascular podrien ser tractats de forma segura amb antidepressius que actuen sobre la inhibició de la recaptació de serotonina (213). L'ús de ISRSs pot conferir un efecte protector contra l'infart de miocardi (214–217). Un polimorfisme genètic del SERT causa un increment de la recaptació de serotonina i està associat amb un increment en el risc d'infart de miocardi (199). L'odds ratio per infart de miocardi en persones que prenen antidepressius serotoninèrgics comparat amb els qui no en prenen s'ha mostrat del 0.59 i incrementar l'afinitat per SERT s'ha associat amb odds ratios reduïts per infart. Aquesta tendència no s'observa en antidepressius tricíclics ni en atípics (216). Respecte a l'activació plaquetària/endotelial, els pacients depressius postsíndrome coronària aguda mostraven elevacions superiors en sèrum de β -thromboglobulin i PF4 respecte a pacients amb síndrome coronària aguda sense depressió i en subjectes sans i el tractament antidepressiu mostrava reduccions en paràmetres d'activació plaquetària/endotelial (218,219). Aquests canvis observats fan plantejar-nos l'efecte dels antidepressius serotoninèrgics en els pacients amb patologia cardíaca i si actuen sobre l'evolució de la malaltia cardíaca.

Els estudis que han avaluat el tractament de la depressió en pacients amb depressió major i malaltia coronària aguda mostren resultats a favor del tractament amb ISRSs, principalment respecte a la millora en la clínica depressiva. Però si l'ús de medicació antidepressiva redueix el risc d'esdeveniments cardiovasculars en pacients amb malaltia cardiovascular, ha estat poc estudiat. Una avaluació retrospectiva a més de 1.000 pacients amb síndrome coronària aguda i tractament amb ISRS s'associa a major risc de sagnat, però eren menys propensos a patir infart de miocardi, insuficiència cardíaca o elevació asimptomàtica d'enzims cardíacs (220). En l'estudi ENRICH, el grup tractat amb teràpia cognitiva conductuals \pm sertralina va mostrar una disminució marcada en la morbimortalitat cardiovascular (221) i en l'estudi MIND-IT els pacients que no van respondre a mirtazapina presentaven un increment important dels esdeveniments cardíacs comparat amb els qui van respondre (222,223). Els estudis randomitzats CREATE i SADHART han mostrat que els pacients deprimits tractats amb ISRS (citalopram i sertralina respectivament) reduïen el risc de mort o d'infart de miocardi entre un 20 i un 40% en comparació amb pacients que no van rebre la teràpia antidepressiva (224,225). En els pacients depressius i amb síndrome coronària aguda tractat amb psicoteràpia \pm antidepressiu (estudi

COPES) el percentatge de pacient que presentaven esdeveniments cardíacs adversos era d'un 4% versus el 13% dels pacients que no rebien la intervenció ($p = 0,047$) i es va associar amb una major satisfacció, una reducció dels símptomes depressius i una millora en el pronòstic (226). Una anàlisi posterior va determinar que la intervenció presentava una bona relació cost-efectivitat (227). En població superior a 80 anys que van respondre al tractament amb sertralina o citalopram es va mostrar una reducció del 60% en els esdeveniments cardiovasculars al cap de 12 mesos i la recuperació de la depressió s'associava a una reducció dels marcadors de risc cardíac (228). En pacients amb depressió i patologia cardíaca després de 20 setmanes de tractament amb sertralina (229) s'observa reduccions significatives en els nivells de proteïna C-reactiva i IL-6 i millores en la dilatació vinculada a endoteli. No tots els estudis mostren aquest efecte dels antidepressius sobre el risc cardiovascular (230).

No tots els efectes dels ISRSs sobre l'hemostàsia han estat positius. L'acció antitrombòtica dels ISRSs pot interferir amb la funció hemostàtica plaquetària i incrementar el risc de sagnat (231–233). L'ús de ISRSs s'ha associat a un increment del risc de sagnat gastrointestinal, sent aquest potenciat per ús d'AINEs. Els fàrmacs amb major grau d'inhibició de la recaptació de serotonina - fluoxetina, paroxetina i sertralina- estan associats més freqüentment amb els sagnats anormals i amb les modificacions dels marcadors hemostàtics. En pacients amb història de trastorns de la coagulació (trombocitopènia o trastorn plaquetari) s'ha de monitoritzar la prescripció d'un ISRS. Si hi ha sagnat durant l'ús de ISRS cal pensar en disfuncions plaquetàries, trastorn de la coagulació o malaltia von Willebrand. En aquest context caldria valorar l'ús d'un antidepressiu no serotoninèrgic (234)

L'habilitat dels ISRS per modular l'acció protrombòtica de la 5-HT pot explicar-se per la seva acció a diversos nivells. El bloqueig de SERT podria prevenir directament la fosforilació de SERT i la seva exposició en la membrana (235,236) i aquest bloqueig podria evitar l'amplificació de la resposta plaquetària provocada per contingut dels grànuls alliberats (237). Una exposició prolongada dels pacients als ISRS és probable que interfereixi amb el transport de 5-HT dintre dels grànuls de les plaquetes impedit així el desenvolupament de plaquetes altament procoagulants. Seria esperable que la inhibició crònica de SERT pels ISRS induïssin

la resposta adaptativa secundària amb una regulació a la baixa del nombre o afinitat dels receptors serotoninèrgics. També s'ha descrit que les característiques de recaptació de 5-HT plaquetària basal poden estar relacionades amb la resposta al tractament, mostrant que els pacients amb millor resposta als antidepressius són els que presentat una afinitat pel SERT superior abans el tractament (238,239). Abdelmalik et al. 2008 van observar diferències significatives en l'acció dels ISRS en les plaquetes, depenent de polimorfismes del gen de SERT i el seu promotor (5-HTTLPR) (240).

Els ISRS actuen sobre el SERT però també actuen sobre altres receptors com el receptor sigma-1. Una hipòtesi que podríem fer per explicar l'increment del trombus que s'observa en les proves de tromboelastrometria en els pacients tractats amb ISRS seria que aquest efecte es produís per l'estimulació del receptor sigma-1 en lloc del bloqueig del SERT. L'efecte de l'escitalopram sobre aquest receptor podria regular l'excreció de proteïnes del reticle endoplasmàtic que afavorissin la formació del trombus com per exemple la proteïna disulfida isomerasa.

BDNF

El BDNF ha estat molt estudiat en sèrum, menys en plasma, i no ha estat fins als darrers anys que s'ha estudiat a nivell plaquetari. Una troballa del primer estudi, contrària a la hipòtesi inicial, és que els nivells de BDNF en plasma apareixen significativament més alts en pacients depressius respecte als controls sans, essent equivalents en els dos grups quan remet la clínica. Altres estudis mostren nivells plasmàtics inferiors en pacients depressius en fase aguda (104,241–243) o no observen canvis (83,103). Respecte a les plaquetes, dos estudis han mostrat una disminució del BDNF plaquetari abans del tractament i donat que les plaquetes emmagatzemen el BDNF, la disminució del BDNF plaquetari podria estar associada amb un menor nivell de BDNF sèric en pacients amb depressió major (84,85). El BDNF plaquetari en pacients remesos van ser similar al dels controls sans, el que podria indicar una relació entre la normalització a un nivell bioquímic i la millora clínica deguda al tractament. Una de les

qüestions menys estudies és l'alliberació del BDNF per les plaquetes que tractarem a continuació.

BDNF I ACTIVACIÓ PLAQUETÀRIA:

El primer aspecte a considerar si relacionem els dos estudis és la implicació de l'estat de major reactivitat plaquetària observada en els pacients depressius en l'alliberació de BDNF per les plaquetes. Caldrà valorar si l'increment en els nivells de BDNF plasmàtics i la reducció en els nivells intraplaquetaris podrien ser explicat per l'activació plaquetària que s'observa en els pacients depressius, provocant que el BDNF s'excreti de la plaqueta cap al plasma. Tradicionalment s'ha considerat que el BDNF intraplaquetari és originat en altres cèl·lules i internalitzat a partir de la via exògena, perquè els megacariòcits no produeixen BDNF per si mateixos (64), tot i que un estudi recent troba BDNF en els megacariòcits que podrien intervenir en la maduració d'aquesta línia cel·lular (244). L'estudi de Fujimura del 2002 va trobar que l'alliberament de BDNF a partir de plaquetes estava augmentat pels activadors de plaquetes com la trombina, el col·lagen i l'ió calci (64). L'estudi de Laske en pacients amb malaltia d'Alzheimer també refereix una associació entre les concentracions de BDNF en sèrum i el grau d'activació plaquetària mesurada pels nivells plasmàtics de β -TG (245). No obstant això, un altre estudi va trobar que l'alliberament de BDNF de les plaquetes en pacients deprimits era independent de la reactivitat/activació plaquetària (242), indicant que les alteracions en BDNF plasmàtic i sèric dels depressius no estan relacionades amb canvis ni en els nivells de BDNF en sang completa ni en l'alliberació plaquetària d'un marcador d'activació, el PF4. El fet que no hi hagi canvis en sang total però sí en sèrum i en plasma suggereix una regulació diferent en els dos compartiments sanguinis, però la mateixa disminució en plasma i sèrum indica que els mecanismes d'alliberació de BDNF són probablement els mateixos. Aquest estudi refereix regulacions independents entre l'alliberació de BDNF i PF4 plaquetaris i indica que hi pot haver dos mecanismes aparentment independents d'alliberació de dues proteïnes que s'emmagatzemen als mateixos grànuls alfa o dues localitzacions subcel·lulars diferents. En el nostre estudi nosaltres trobem uns resultats contraris, ja que s'observa un increment dels nivells de BDNF plasmàtic en depressius i més similars a les troballes de PF4. També s'ha

trobat que l'alliberament de BDNF pot dependre d'un bucle autocrí BDNF-TrkB de les plaquetes que alhora estaria implicat en l'activació plaquetària (72), però hi ha resultats inconsistents respecte a si existeix TrkB en la superfície de les plaquetes (64,244,246).

L'estudi de Tamura 2011 (247) estudia com s'allibera el BDNF plaquetari a través de l'estimulació plaquetària amb diversos agonistes específics dels receptors de trombina. L'activació de les plaquetes es va avaluar per l'expressió en la superfície de les plaquetes de CD62P (P-selectina). Aquest estudi mostra que l'alliberació de BDNF és dosi dependent de les concentracions d'agonista del receptor específic de trombina 1 (PAR1-AP), mostrant un patró de dues fases amb un alliberament dràstic a baixes concentracions de PAR1-AP i una alliberació més lenta a altes concentracions de PAR1-AP. L'alliberament màxim de BDNF va ser d'aproximadament 37%. No va mostrar diferències estadísticament significatives en l'alliberament de BDNF entre la no estimulació i les estimulacions amb PAR4 – AP. En l'estudi de la localització del BDNF es va detectar no només en α -grànuls, sinó també en el citoplasma de les plaquetes en repòs. Quan es va activar la plaqueta amb PAR-1A, el BDNF dels α -grànuls es van fusionar al sistema canalicular i es van alliberar, mentre el BDNF del citoplasma (que pot representar el 70%) es va mantenir sense canvis al llarg de l'activació plaquetària. Aquests resultats indiquen que l'activació de PAR1 és la senyalització predominant per a l'alliberament de BDNF en les plaquetes activades amb trombina, mostrant que s'allibera juntament amb el VEGF i que les plaquetes humanes tindrien dos magatzems de BDNF, els α -grànuls i el citoplasma. L'estudi de Tamura també va comparar l'alliberament de BDNF als de PF4 i la serotonina, mostrant que la corba de resposta a BDNF era similar a la de PF4 però no a serotonina. Posteriorment es va analitzar l'efecte del pretractament amb un inhibidor de l'activació de les plaquetes, i s'observa una inhibició completa de l'alliberament de BDNF a baixes concentracions PAR1-AP, però no a altes concentracions de PAR1-AP. Altres estudis han avaluat l'alliberació de BDNF de les plaquetes si aquestes són pretractades amb inhibidors de l'activitat plaquetària, mostrant-se en un estudi una reducció en l'alliberament de BDNF de les plaquetes (248,249), mentre que un estudi posterior nega aquesta reducció (250).

En l'àmbit clínic, solament dos estudis en pacients posteriorment a cirurgia major abdominal i a situacions de bypass cardiovascular estudien les concentracions de BDNF en sèrum i plasma i marcadors d'activació plaquetària. El primer estudi conclou que les concentracions de BDNF en sèrum i en plasma podrien estar relacionats amb l'activació de les plaquetes (β -TG) i la resposta inflamatòria (IL -6 i TNF- α), respectivament (251) i el segon estudi mostra un increment en els nivells de BDNF plasmàtics associats amb paràmetres inflamatoris, modificacions redox i activació plaquetària (p-selectina) (252).

Un primer estudi en rates va avaluar l'efecte de l'antidepressiu *in vitro* en l'alliberació de BDNF plaquetari i l'efecte del tractament antidepressiu endovenós en els nivells de BDNF en sèrum (253). Els antidepressius provoquen canvis relativament ràpids en els nivells de BDNF sèric, al voltant d'1 o 2 hores i s'incrementen gradualment, mitjançant la promoció de l'alliberació de BDNF des de les plaquetes, essent la sertralina l'antidepressiu més efectiu en l'alliberació de BDNF plaquetari. Respecte a l'alliberació de BDNF provocat pels antidepressius, aquest representava almenys un 20% del total de BDNF plaquetari. No es va mostrar diferències en l'efecte entre ISRN i ISRS i l'alliberació va ser dosis dependent. Aquests resultats serien contraris als esperats a partir del nostre estudi, però cal considerar que solament estudien els efectes aguts dels antidepressius i no l'efecte a llarg termini i que és una troballa en rates i amb una mostra petita. L'estudi de Hochstrasser 2013 valora els efectes de diversos ISRSs sobre l'alliberament de BDNF a partir de plaquetes de rata, mostrant que no hi ha efecte sobre l'alliberament de BDNF amb citalopram, paroxetina, sertralina o indometacina (249).

En global, cal destacar que hi ha resultats molt contradictoris respecte a la síntesi, absorció, distribució (possibilitat de dos compartiments intraplaquetaris) i alliberació del BDNF plaquetari, així com dificultats per establir la importància de l'activació plaquetària per l'alliberament de BDNF el que fa que sigui necessari estudiar més aquests factors per comprendre el comportament del BDNF en la sang circulant.

BDNF I ALTRES PARÀMETRES DE LA COAGULACIÓ

Un segon aspecte a considerar és si el processament del BDNF, independentment de l'alliberació plaquetària d'aquest, depèn de paràmetres de la coagulació. Durant l'activació plaquetària, l'estimulació de la serotonina també accelera l'exocitosi dels α -grànuls de les plaquetes, que secreten molècules procoagulants en el plasma. Una d'aquestes molècules és l'inhibidor de l'activador del plasminogen-1 (PAI-1), que s'allibera en el lloc de la formació de trombes. Els nivells de PAI-1 en els coàguls arterials són 2-3 vegades més grans que els observats en els coàguls venosos i el contingut relatiu de PAI-1 determina la seva resistència a la trombólisi. La PAI-1 inhibeix la biodisponibilitat de l'activador tissular del plasminogen (tPA) i la plasmina, que són les proteases que realitzen l'escissió del precursor de BDNF (proBDNF) a la seva forma madura (mBDNF), pel que l'elevada síntesi de PAI-1 redueix la producció de mBDNF. Múltiples línies d'evidència han demostrat que l'escissió de proBDNF és fonamental per a la fisiopatologia del trastorn depressiu major i pels mecanismes d'acció dels antidepressius (254). L'escissió inadequada del proBDNF pot augmentar el risc de trastorns de l'estat d'ànim (255). De fet, els pacients amb depressió major mostren uns nivells augmentats de proBDNF i uns nivells de mBDNF (256) disminuït.

Ahora, la PAI-1, inhibint la producció de plasmina, impedeix la dissolució dels coàguls de sang formats en la placa ateroscleròtica trencada i seria d'esperar que els pacients amb trastorns depressius presentessin un major risc d'esdeveniments cardiovasculars. Aquestes troballes suggereixen que els trastorns cardiovasculars i la depressió podrien tenir un denominador comú, que probablement es deriva de metabolisme anormal d'insulina. L'estat proinflamatori indueix un estat de resistència a la insulina i una hiperinsulinèmia que promou la síntesi i alliberació de PAI-1 i inhibeix la síntesi de plasmina. Les conseqüències d'aquestes alteracions serien l'escissió inadequada de proBDNF en mBDNF, la dissolució anormal de trombes coronaris intraluminal, la falta d'activació de les metal·loproteïnes dependent de plasmina responsables de l'angiogènesi i la neurogènesi (257) i la disminució de la remodelació del miocardi i de la regeneració del sistema límbic associada a nivells elevats de PAI-1.

Els pacients en tractament amb antidepressius serotoninèrgics semblen tenir els nivells de fibrinogen i PAI-1 en plasma similars a les dels controls sans, i més baix que en els pacients deprimits que no reben antidepressius serotoninèrgics (258). Això fa suposar que la restauració dels circuits de l'hipocamp en els trastorns depressius requeriria les següents etapes: (1) la inhibició de la serotonina; (2) disminució de la síntesi i alliberament d'insulina; (3) la disminució de la síntesi i alliberament de PAI-1; (4) l'augment de la producció de plasmina; (5) l'escissió de proBDNF en mBDNF; (6) la neurogènesi. Aquestes accions seqüencials que caldria realitzar podrien proporcionar en part una explicació per al retard en l'aparició de la resposta del pacient als ISRS (259).

EL BDNF ESTÀ RELACIONAT AMB LA PATOLOGIA CARDIOVASCULAR?

Un tercer aspecte a considerar en la relació entre paràmetres d'hemostàsia, serotonina i BDNF, seria si el BDNF també estaria implicat en la patologia cardíaca i podria ser un altre mecanisme de relació entre depressió i malaltia cardiovascular. Es coneix poc sobre el paper de les neurotrofines en l'homeòstasi vascular de l'adult en condicions normals o en patològiques. El BDNF i el seu receptor TrkB són expressats en cèl·lules endotelials, cèl·lules múscul llis vascular i vasos arterioscleròtics (60,61). Les cèl·lules endotelials són vitals per la salut vascular i les funcions endotelials estant independentment associades amb el pronòstic cardíac. El BDNF està involucrat en el desenvolupament del sistema cardiovascular i una expressió de BDNF deficient empitjora la supervivència de les cèl·lules endotelials en les arteries intramiocàrdiques i capil·lars en períodes postnatsals inicials. A més a més, les deficiències de BDNF resulten en una reducció dels contactes endotelials cèl·lula-cèl·lula i en apoptosi de les cèl·lules endotelials que causen hemorràgia en la paret intraventricular, contractilitat cardíaca disminuïda i mort postnatal (260). L'activació transcripcional de TrkB és crucial en el desenvolupament de les venes coronàries (261).

La relació del BDNF amb la patologia cardiovascular pot tenir diversos punts de confluència. Les malalties inflamatòries cròniques i l'arterosclerosi poden provocar una modificació en

l'expressió i en la producció de neurotrofines (262,263). A nivell cardiovascular, la participació del BDNF no es pot dissociar del procés inflamatori que acompanya la instal·lació i el desenvolupament de les disfuncions cardíques i vasculars. Els macròfags i les cèl·lules del múscul llis de l'íntima ateromatosa i l'adventícia són fonts alternatives de BDNF i la seva expressió està incrementada en les lesions arterioscleròtiques (264), però la seva contribució és marginal comparada amb l'alliberament des de les plaquetes. S'ha observat unes concentracions de receptors TrkB i BDNF en el miocardi d'animals d'edat avançada 10 vegades superiors a les dels animals joves i aquest augment està associat a una infiltració majoritària de cèl·lules mononucleades (265). L'administració intramiocàrdica de BDNF s'acompanya, a curt termini, d'un augment dels paràmetres inflamatoris tissulars i particularment de macròfags activats. El BDNF provoca un estrès oxidatiu en les cèl·lules del múscul llis que podria induir la inestabilitat de les plaques d'arterosclerosi i ser un factor pronecròtic (266) i l'expressió de Trk pot contribuir al desenvolupament de lesions i a l'alliberació de factors proinflamatoris (267). L'expressió alterada de neurotrofines poden provocar una desregulació de l'emmagatzematge i alliberació de norepinefrina pels terminals nerviosos simpàtics que s'observa durant el desenvolupament de la insuficiència cardíaca (268). També cal tenir en compte que el BDNF és alliberat per l'estimulació plaquetària i pot ser el causant de l'associació entre BDNF i patologia cardiovascular i cal destacar que s'ha trobat BDNF prop de la placa d'arterosclerosi però no hi ha proves del fet que sigui la causant de l'inici o el desenvolupament de l'arterosclerosi coronària. Per contra, la seva participació en fenòmens de neoangiogènesi via receptors de TrkB al nivell de teixits que han sofert una isquèmia de llarga durada està ben establert (269). El BDNF podria reclutar i mobilitzar progenitors endotelials, facilitant la reparació del teixit vascular o induint neoangiogènesi (270).

En pacients amb angina inestable, els nivells de BDNF estan modificats en la circulació coronària quan es comparen amb pacients estables (264,271). En els pacients amb infart agut de miocardi es va observar nivells sèrics de BDNF superiors i estaven correlacionats significativament amb p-selectina, però no es va mostrar correlació significativa entre el BDNF i sCD40. En pacients amb angina estable no es va observar aquestes correlacions. L'estudi conclou que el BDNF en sèrum en pacients amb infart agut de miocardi pot estar relacionat

amb l'activació plaquetària i amb la resposta inflamatòria (272), però expliquen que les diferències respecte a altres estudis es poden deure a diferències metodològiques. Aquests autors indiquen que la manca d'associació entre el BDNF i l'extensió o complexitat de la malaltia coronària suggereix que la relació entre BDNF i aterosclerosi podria incloure l'activació plaquetària en lloc de la progressió de la malaltia. Okada et al 2012 descriu que posteriorment a un infart, els nivells plasmàtics de BDNF estan marcadament elevats i aquest increment està associat a una regulació a l'alça de l'expressió de BDNF en el cervell, però no en cor, pel que suposa que els mecanismes del sistema nerviós central dependents de BDNF protegeixen del remodelatge cardíac posterior a un infart de miocardi a través d'evitar la mort de cardiomiòcits i millorar la funció sistòlica. La deleció de TrkB dels teixits cardíacs també incrementen la disfunció cardíaca posterior a l'infart de miocardi i l'administració de BDNF perifèrica en rates amb deficiència de BDNF neuronal restableix el fenotip cardíac (273).

Altres autors descriuen disminucions dels nivells plasmàtics de BDNF en pacients amb síndrome coronària aguda (271). Els nivells plasmàtics de BDNF en pacients amb angina estaven inversament associats amb els nivells de triglicèrids i colesterol LDL, la presència de diabetis mellitus, els nivells de fibrinogen, el sexe masculí i l'edat i correlacionats de forma positiva amb el colesterol HDL i el recompte plaquetari (274). També s'ha descrit que els nivells de BDNF en sèrum en el grup amb risc de malaltia cardíaca isquèmica eren significativament més baixos que en el grup control (275), suggerint que els nivells baixos de BDNF estarien associats amb esdeveniments futurs coronaris i mortalitat i la mesura del BDNF en sang seria útil com a marcador biològic de malaltia isquèmica en el grup de risc.

En cap d'aquests estudis es correlaciona el canvi en els nivells de BDNF amb la presència o absència de clínica depressiva, sent un factor independent de risc cardiovascular. Una qüestió a respondre seria si la relació entre el BDNF i el risc cardiovascular està influenciat o condicionat per la presència o no de clínica depressiva.

Altres receptors que mostren unes connexions entre el cervell i el cor similar a les del BDNF són els receptors sigma-1. Aquests receptors estant associat amb la depressió, mostrant que

els ratolins knockout per sigma-1 mostren fenotips depressius i els agonistes d'aquest receptor milloren la clínica depressiva. Un model de ratolí amb insuficiència cardíaca induïda es va associar amb una reducció d'aquest receptor en el cervell. Però el BDNF i el receptor sigma-1 estant molt relacionats, regulant la secreció de BDNF (276). L'activació del receptor sigma-1 promou l'activitat de la proteïna chaperona, que al seu torn, regula la secreció de BDNF, inhibeix l'agregació de proteïnes induïdes per estrès i regula el plegament erroni de les proteïnes en el reticle endoplasmàtic, el que juga un paper en la patogènesi de les malalties cardiovasculars i psiquiàtriques. Una sobreexpressió del receptor sigma-1 potencia la conversió del precursors de proBDNF a BDNF madur i millora la secreció de BDNF madur. L'estimulació de receptors sigma-1 mitjançant agonistes i la secreció posterior de BDNF podrien tenir efectes beneficiosos en els pacients amb malalties cardiovasculars (277), però cal més estudi sobre la relació entre els receptors sigma-1 i la senyalització BDNF-TrkB. Els antidepressius mostren una afinitat entre moderada i alta amb els receptors sigma-1 cerebrals. Donat que tots els ISRSs actuen mitjançant el bloqueig del transportador de serotonina i que s'ha observat un efecte variable d'aquests fàrmacs sobre la malaltia cardiovascular (278), és probable que l'acció heterogènia d'aquests fàrmacs sobre els receptors sigma-1 expliquin aquestes troballes, ja que alguns fàrmacs com la paroxetina no actua i la sertralina té una funció antagonista (278). Caldria examinar individualment els efectes dels ISRSs sobre els receptors sigma-1 en relació al seu efecte cardiovascular (277).

Un altre punt de confluència a destacar és que el BDNF pot ser un mediador important en els efectes de l'eix hipotàlem-hipòfisi-adrenal (HPA) sobre la depressió i la malaltia cardiovascular. El receptor de glucocorticoides interactua amb el receptor específic de BDNF, el TrkB, i la secreció excessiva de glucocorticoides interfereix amb la senyalització de BDNF. L'excés de glucocorticoides pot provocar efectes adversos a través dels efectes que el BDNF realitza sobre les cèl·lules endotelials i els cardiomiòcits (276).

EL BDNF ÉS UN BON MARCADOR BIOLÒGIC?

Els estudis sobre el BDNF perifèric han intentat aclarir si aquesta proteïna seria un bon marcador de la depressió. Un biomarcador ha de tenir tres característiques fonamentals: (1) ser un indicador de processos biològics normals, (2) ser un indicador de processos patològics i permetre un diagnòstic precoç en població vulnerable i un diagnòstic específic de depressió, i (3) ser un marcador de resposta a les intervencions terapèutiques. La troballa d'un marcador biològic objectiu permetria millorar el procés diagnòstic, reduir l'heterogeneïtat en la classificació, delimitar subtipus, ajudar a elegir un tractament específic per cada pacient (279) i determinar la seva sensibilitat als efectes secundaris, permetent reduir la incertesa del procés d'assaig i error. Respecte al BDNF, quan es compara amb altres alteracions biològiques observades en la depressió com la desregulació immunològica o l'activitat de l'eix hipotàlem-hipofiso-adrenal, la magnitud de la diferència continua sent superior en el BDNF (81), però no es pot considerar un bon marcador de depressió com s'intentarà explicar a continuació.

La primera pregunta a realitzar-nos seria si el BDNF perifèric és un indicador del BDNF central. La suposició d'un transport actiu de BDNF a través de la barrera hematoencefàlica (280) provenen d'estudis en animals i no en humans. Hi ha estudis que mostren correlació positiva entre el BDNF sèric i el BDNF en teixits cerebrals (65,281), però altres troben una correlació negativa entre el BDNF en sang i en hipocamp (282). Respecte a la mostra utilitzada, hi ha estudis animals que observen una correlació superior entre BDNF plasmàtic i cerebral que entre BDNF sèric i cerebral (283) i això podria ser explicat perquè el BDNF plasmàtic està mínimament afectat per la quantitat de BDNF emmagatzemat a les plaquetes i ser un marcador de BDNF més sensible de les variacions en el cervell i a nivell perifèric. Altres estudis no mostren aquesta correlació entre el sistema perifèric i central i indiquen que l'expressió de BDNF cerebral és dependent de temps i de localització (284) i els antidepressius incrementen el BDNF en algunes localitzacions però no en altres (285). Una segona consideració és que el BDNF s'obté de fonts diverses i no prové al 100 % del sistema nerviós central. Les concentracions de BDNF en sèrum són molt superiors a les obtingudes del líquid cefaloraquídi (x1000), el que indica que poden reflectir principalment la síntesi perifèrica (286). Com a

conseqüència, les alteracions en el BDNF perifèric poden no reflexar les alteracions en les vies centrals sinò ser un epifenomen d'altres processos fisiològics o conductuals perifèrics que no estan necessàriament relacionats amb el funcionament del BDNF cerebral.

Els primers metaanàlisis indicaven que el BDNF en sèrum podria ser un marcador de trastorn depressiu (82), però els estudis més recents ho posen en dubte, ja que la probabilitat d'una classificació correcta és del 0.59 (81). Altres malalties com l'esquizofrènia, el trastorn bipolar o l'anorèxia, entre altres, han mostrat disminucions en les concentracions perifèriques de BDNF, pel que aquesta troballa no és suficientment específica per diferenciar entre diagnòstics.

Una altra troballa destacable és l'elevada variabilitat en els valors de les concentracions de BDNF en sèrum entre els diferents estudis. Aquestes diferències es poden deure a procediments de laboratori diferents que fa que no es pugui extrapolar els resultats però sí que permet fer diferències dintre d'un estudi (287). Una conseqüència negativa d'aquesta variabilitat és que no hi ha un valor de referència acceptat que defineixi si un valor individual de BDNF és alt o baix i caldria estandarditzar les mesures. Una altra consideració és que la majoria dels estudis comparen els valors entre diferents grups i no de forma individual, alhora que hi ha molts factors que influencien els nivells de BDNF. Variables dels pacients tals com edat, sexe, ús de medicació, cicle menstrual, tabaquisme, índex de massa corporal, canvis en el pes, ... poden influir en els nivells de BDNF i la majoria dels estudis no ho tenen en compte. En aquest sentit, el segon article ens planteja la qüestió de si caldria considerar l'estat de reactivitat plaquetària en les mesures del BDNF en els pacients deprimits.

Inicialment es va descriure que un increment superior del BDNF sèric durant el tractament amb antidepressius estava associat a una disminució superior en la gravetat de la clínica depressiva. Aquesta darrera troballa indicaria una relació dinàmica temporal entre l'expressió de BDNF i l'eficàcia del tractament, observant-se canvis ja en fases inicials del tractament (288,289). Altres estudis longitudinals i el metaanàlisi més recent no mostren l'associació entre la gravetat de la clínica depressiva i les concentracions de BDNF en sèrum, destacant que els estudis que han trobat aquesta associació solen ser els que tenen menys poder estadístic

(81,290). Això ha provocat que alguns autors indiquin que l'increment en el BDNF no és necessari per induir una resposta antidepressiva, ja que molt pacients milloren sense observar-se canvis en els nivells de la neurotrofina (290).

El BDNF en sèrum és solament una de les mesures perifèriques de la neurotrofina. Altres opcions no invasives inclouen la concentració de BDNF en sang total, plasma i plaquetes. Hi ha estudis que mostren una associació estadísticament significativa, encara que modesta, entre aquestes mesures (291–293), però altres estudis mostraven un significat biològic diferent del BDNF en sèrum i en plasma (104,294). Els nostres resultats mostren una correlació inversa entre el BDNF en plasma i en plaquetes. Cal considerar que hi ha evidència sobre l'estabilitat dels nivells de BDNF en plaquetes o en sèrum (287), però no en plasma, ja que la molècula circula menys d'una hora (67). En general, cal considerar que les troballes en els diferents compartiments no es poden generalitzar directament a altres paràmetres perifèrics.

Un metaanàlisi va mostrar una reducció del BDNF plasmàtic en la depressió (83), però cal tenir en compte que aquestes mesures són altament dependent de la metodologia utilitzada (78) i aquestes diferències metodològiques podrien explicar la variabilitat de resultats. Un altre factor que incrementa la variabilitat és que els nivells plasmàtics de BDNF poden disminuir de forma significativa amb l'edat, el pes o el colesterol i molts estudis no ho registren.

Respecte als nivells de BDNF en plaquetes no van mostrar aquesta variació, però s'alteren amb el cicle menstrual (68). La quantitat de BDNF en sèrum és gairebé idèntica a la quantitat de BDNF en plaquetes lisades, per tant, la diferència entre el BDNF en sèrum i en plasma sembla reflectir la quantitat de BDNF emmagatzemat en les plaquetes circulants. El nostre estudi coincidiria amb els estudis de nivells sèrics que també mostren una reducció dels nivells (65,77,82,295).

Queden diferents qüestions a respondre respecte al BDNF com a marcador:

1. Determinar el paràmetre que millor representa el BDNF a nivell cerebral.

- a. Alguns autors han indicat que el contingut de RNAm del BDNF en els leucòcits podria reflectir de forma més estreta la dinàmica del BDNF central per la seva vida mitjana curta i poca afectació de factors de confusió perifèrics (296).
 - b. El turnover de BDNF en plasma es completa en aproximadament 6 minuts (67). Per tant, el BDNF plasmàtic és probable que sigui un índex més adequat dels nivells de BDNF cerebrals (297) a causa de la mínima influència deguda a la quantitat emmagatzemada en les plaquetes. Però la mesura del BDNF plasmàtic depèn de l'anticoagulant utilitzat, el temps d'emmagatzematge i la temperatura.
 - c. El BDNF plaquetari podria representar un marcador a llarg termini de la variació dels nivells de BDNF en un període de diversos dies.
 - d. També s'ha destacat que la combinació de diferents mostres perifèriques podria tenir avantatges respecte a un de sol.
2. Saber és si el BDNF que estudiem a nivell perifèric és la proteïna madura o la immadura (pro-BDNF). Els kits d'ELISA utilitzats en la majoria d'estudis no permeten fer la diferència entre la proteïna madura i la immadura (40), encara que recentment s'ha desenvolupat un kit que permet diferenciar les dues proteïnes. L'estudi de Burnouf et al 2012 no va detectar la presència de pro-BDNF en els extractes de plaquetes, el que suggereix que en les plaquetes la neurotrofina es troba exclusivament en la seva forma madura (246). Respecte al plasma no podem saber quina de les dues variants estem analitzant i donat la seva funció contrària caldrà millorar els estudis per detectar aquesta diferència i les possibles ràtios diferents de les dues variants en diferents patologies.
 3. Relacionar el BDNF amb paràmetres d'activació plaquetària, ja que diferències en l'activació poden provocar diferències en els nivells de BDNF en plasma o en sèrum (298).

4. Determinar quins factors afecten les mesures de BDNF i incloure'ls en els estudis o protocols relatius al BDNF.
5. Estandardització de la metodologia per evitar la variabilitat en la investigació sobre el BDNF.
6. Determinar les ràtios de concentracions de BDNF en el líquid cefaloraquídi, en sèrum i en plasma, tant en pacients amb malaltia aguda, en remesos i en controls i mirar les seves correlacions.
7. Valorar les alteracions en el BDNF a través de fenòmens transdiagnòstics, ja que moltes condicions psicopatològiques s'associen a alteracions en el BDNF.

En global es pot considerar que les mesures de BDNF perifèric no han de ser la base per entendre les alteracions neurotròfiques en la depressió i que la falta de troballes uniformes en aquests valors fa considerar que la importància del BDNF en els darrers anys ha estat sobredimensionada. Aquestes consideracions ens fa que calgui revalorar la mesura del BDNF respecte a com l'hem entès fins ara. Per contra, recentment s'ha ampliat el nombre de malalties relacionades amb aquesta neurotrofina i s'ha postulat com una molècula implicada en les vies que relacionen diferents malalties, com la depressió i la malaltia cardiovascular, entre altres.

LIMITACIONS:

- La mida de la mostra és petita i això pot limitar la nostra capacitat per determinar diferències significatives.
- L'avaluació dels símptomes s'ha realitzat solament amb HDRS i es poden haver omès altres components de la síndrome depressiva.
- Haver tingut en compte variables que intervenen en la variabilitat plasmàtica o en la plaquetària podria haver reduït determinats biaixos i treure conclusions més concretes. Moltes d'aquestes variables s'han descobert en els darrers anys, posteriorment a la realització de gran part de les determinacions.
- Realització de les proves amb un kit que no diferencia BDNF i proBDNF, ja que el kit que permet analitzar aquesta diferència no estava disponible en el moment de les anàlisis.
- La metodologia utilitzada en els estudis de BDNF no ha estat estandarditzada i pot provocar elevada variabilitat entre els nostres resultats respecte als obtinguts amb altres estudis.
- Seguiment de sis mesos i estudi dels efectes dels antidepressius durant aquest temps, però no s'avalua que provoca el tractament a llarg termini tot i que molts pacients depressius requereix tractaments prolongats o de tota la vida.
- No s'ha relacionat el BDNF amb els marcadors d'activació plaquetària.

CONCLUSIONS

Les conclusions que es deriven dels treballs exposats a la present tesi doctoral són les següents:

1. Els pacients amb depressió sense tractament presenten alteracions en els paràmetres de BDNF respecte als subjectes sans mostrant nivells inferiors de BDNF plaquetari i nivells superiors de BDNF en plasma pobre en plaquetes.
2. El tractament amb ISRS (escitalopram) modifica els nivells de BDNF tendint a normalitzar-los.
 - a) Al cap de 8 setmanes de tractament, els nivells de BDNF en plasma han disminuït de forma significativa, però el canvi més important s'observa amb l'increment del BDNF plaquetari que ja no mostra diferències respecte als subjectes controls.
 - b) Al cap de 24 setmanes de tractament, els nivells de BDNF en plasma van disminuir i els nivells de BDNF en plasma van augmentar, assolint nivells similars als subjectes controls.
 - c) El BDNF plaquetari es modifica en fases més inicials del tractament, pel que podria ser utilitzat com un marcador de resposta al tractament, predint la resposta al tractament en fases inicials.
3. Es va observar una correlació negativa entre els nivells de BDNF plaquetari i plasmàtic.
4. Els pacients en fase depressiva presenten un endofenotip protrombòtic respecte als subjectes controls, observant-se canvis estadísticament significatius en :
 - a) Augment volum mitjà de les plaquetes
 - b) Elevada expressió de GPIIb, d'antígens procoagulants i de marcadors d'activació plaquetària

- c) Increment de la fermesa del coàgul
 - d) Increment de l'activitat procoagulant del factor tissular associat a plaquetes
 - e) Augment de la formació de fibrina i de la generació de trombina quan s'exposa a una superfície trombògena en condicions de flux
 - f) Increment moderat de l'agregació de les plaquetes en resposta a àcid araquidònic.
5. El tractament amb ISRS en els pacients deprimits regula a la baixa el fenotip trombogen i contraresta amb rapidesa i eficàcia l'estat protrombòtic i procoagulant observat sota condicions de flux.
6. Alguns paràmetres de la coagulació no es modifiquen durant el tractament amb ISRS. No s'observa una disminució de la força del coàgul, l'expressió de GPIIb/IIIa es manté elevada i les propietats viscoelàstiques dels trombes formats en condicions de velocitat de cisalla reduïda no es modifiquen.
7. Els efectes dels ISRS sobre les plaquetes pot explicar el risc més gran de sagnat en els pacients que reben aquest tractament.

BIBLIOGRAFIA

1. Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Koretz D, Merikangas KR, et al. The Epidemiology of major depressive disorder results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *JAMA* 2003;289(23):3095–105.
2. Frank E, Michael E. Natural history and preventative treatment of recurrent mood disorders. *Annual Reviews of Medicine* 1999; 50:453–68
3. López-Ibor Aliño JJ, Valdés Miyar M. DSM-IV-TR: manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales. Biblioteca del DSM-IV. 2001.
4. Kendler KS. Levels of explanation in psychiatric and substance use disorders: implications for the development of an etiologically based nosology. *Molecular Psychiatry*. *Molecular Psychiatry* 2012;17(1):11-21.
5. aan het Rot M, Mathew S, Charney D. Neurobiological mechanisms in major depressive disorder. *CMAJ* 2009;180(3):305–13.
6. Mesulam M. Neuroplasticity failure in Alzheimer's disease: bridging the gap between plaques and tangles. *Neuron* 1999;24:521–9.
7. Duman RS, Monteggia LM. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry* 2006;59(12):1116–27.
8. Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression. *Nature* 2008; 455(7215):894–902.
9. Son H, Banasr M, Choi M, Yeon S, Licznarski P, Lee B, et al. Neuritin produces antidepressant actions and blocks the neuronal and behavioral deficits caused by chronic stress. *PNAS* 2012;109(28):11378–11383.

10. Koolschijn PCMP, van Haren NEM, Lensvelt-Mulders GJLM, Hulshoff Pol HE, Kahn RS. Brain volume abnormalities in major depressive disorder: a meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *Hum Brain Mapp* 2009;30(11):3719–35.
11. Rao U, Chen L-A, Bidesi AS, Shad MU, Thomas MA, Hammen CL. Hippocampal changes associated with early-life adversity and vulnerability to depression. *Biol Psychiatry* 2010;67(4):357–64.
12. Sheline YI, Gado MH, Kraemer HC. Untreated depression and hippocampal volume loss. *Am J Psychiatry* 2003;160:1516–8.
13. Arnone D, Mckie S, Elliott R, Juhasz G, Thomas EJ, Downey D, et al. State-dependent changes in hippocampal grey matter in depression. *Molecular Psychiatry* 2013;18(12):1265–72.
14. Banasr M, Dwyer J, Duman R. Cell atrophy and loss in depression: reversal by antidepressant treatment. *Curr Opin Cell Biol* 2011;23:730–7.
15. Cheng Y, Xu J, Chai P, Li H, Luo C, Yang T, et al. Neuroscience Letters Brain volume alteration and the correlations with the clinical characteristics in drug-naïve first-episode MDD patients: A voxel-based morphometry study. *Neurosci Lett* 2010;480(1):30–4.
16. Price JL, Drevets WC. Neurocircuitry of mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 2010;35(1):192–21617.
17. Schlösser RGM, Wagner G, Koch K, Dahnke R, Reichenbach JR, Sauer H. Fronto-cingulate effective connectivity in major depression: A study with fMRI and dynamic causal modeling. *Neuroimage* 2008; 43(3):645–55.
18. Carballedo A, Scheuerecker J. Functional connectivity of emotional processing in depression. *J Affect Disorder* 2011;134(1-3):272–9.

19. Vyas A, Mitra R, Rao BSS, Chattarji S. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neuroscience* 2002;22(15):6810–8.
20. Eisch AJ, Petrik D. Depression and Hippocampal Neurogenesis: A Road to Remission? *Science* 2012;338(6103): 72–75.
21. Malberg JE. Implications of adult hippocampal neurogenesis in antidepressant action. *J Psychiatry Neuroscience* 2004;29(3):196–205.
22. Boldrini M, Underwood MD, Hen R, Rosoklija GB, Dwork AJ, Mann JJ, et al. Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 2009;34:2376–89.
23. Spalding KL, Bergmann O, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Huttner HB, et al. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 2013;153(6):1219–27.
24. Nutt D. The role of dopamine and norepinephrine in depression and antidepressant treatment. *J Clin Psychiatry* 2006;67 Suppl 6:3–8.
25. Dunlop BW, Nemeroff CB. The role of dopamine in the pathophysiology of depression. *Arch Gen Psychiatry* 2007;64(3):327–37.
26. Sanacora G, Zarate C a, Krystal JH, Manji HK. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7(5):426–37.
27. Hasler G, van der Veen JW, Tumonis T, Meyers N, Shen J, Drevets WC. Reduced prefrontal glutamate/glutamine and gamma-aminobutyric acid levels in major depression determined using proton magnetic resonance spectroscopy. *Arch Gen Psychiatry* 2007;64(2):193–200.

28. Svenningsson P, Chergui K, Rachleff I, Flajolet M, Zhang X, El Yacoubi M, et al. Alterations in 5-HT_{1B} receptor function by p11 in depression-like states. *Science* 2006;311(5757):77–80.
29. Hill MN, Gorzalka BB. Impairments in endocannabinoid signaling and depressive illness. *JAMA* 2009;301(11):1165–6.
30. Pittenger C, Duman RS. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 2008;33(1):88–109.
31. Calabrese F, Molteni R, Racagni G, Riva M a. Neuronal plasticity: a link between stress and mood disorders. *Psychoneuroendocrinology* 2009;34 (1):S208–16.
32. Castrén E. Neuronal network plasticity and recovery from depression. *JAMA psychiatry* 2013;70(9):983–9.
33. Heldt S a, Stanek L, Chhatwal JP, Ressler KJ. Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Mol Psychiatry* 2007;12(7):656–70.
34. Angelucci F, Brenè S, Mathé AA. BDNF in schizophrenia, depression and corresponding animal models. *Mol Psychiatry* 2005;10(4):345–52.
35. Numakawa T, Suzuki S, Kumamaru E, Adachi N, Richards M, Kunugi H. BDNF function and intracellular signaling in neurons. *Histol Histopathol.* 2010;25:237–58.
36. Schuman EM. Neurotrophin regulation of synaptic transmission. *Curr Opin Neurobiol* 1999;9(1):105–9.
37. Kovalchuk Y, Holthoff K, Konnerth A. Neurotrophin action on a rapid timescale. *Curr Opin Neurobiol* 2004;14(5):558–63.
38. Nagappan G, Lu B. Activity-dependent modulation of the BDNF receptor TrkB: mechanisms and implications. *Trends Neurosci* 2005;28(9):464–71.

39. Pang PT, Lu B. Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF. *Ageing Res Rev* 2004;3(4):407–30.
40. Lu B, Pang PT, Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci* 2005;6(8):603–14.
41. Chao M V. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 2003;4(4):299–309.
42. Mattson MP. Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1144:97–112.
43. Yoshii A, Constantine-Paton M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev Neurobiol* 2010;70(5):304–22.
44. Pillai A. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in the pathogenesis and novel pharmacotherapy of schizophrenia. *Neurosignals* 2008;16(2-3):183–93.
45. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:677–736.
46. Monteggia LM, Barrot M, Powell CM, Berton O, Galanis V, Gemelli T, et al. Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(29):10827–32.
47. Lu Y, Christian K, Lu B. BDNF: A key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory?. *Neurobiol Learn Memory* 2008;89(3):312–23.
48. Castrén E, Vöikar V, Rantamäki T. Role of neurotrophic factors in depression. *Curr Opin* 2007;7(1):18–21.
49. Groves JO. Is it time to reassess the BDNF hypothesis of depression? *Mol Psychiatry* 2007;12(12):1079–88.

50. Lu B. BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learn Mem* 2003;10(2):86–98.
51. Lu B, Chang J. Regulation of neurogenesis by neurotrophins: implications in hippocampus-dependent memory. *Neuron Glia Biol* 2004;1(04):377–84.
52. Chao M V, Rajagopal R, Lee FS. Neurotrophin signalling in health and disease. *Clin Sci* 2006;110(2):167–73.
53. Murgatroyd C, Patchev AV, Wu Y, Micale V, Bockmühl Y, Fischer D, et al. Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress. *Nat Neurosci* 2009;12(12):1559–66.
54. Roth TL, Sweatt JD. Epigenetic marking of the BDNF gene by early-life adverse experiences. *Horm Behav* 2011;59(3):315–20.
55. Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, et al. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 2003;112(2):257–69.
56. Neto FL, Borges G, Torres-Sanchez S, Mico J a, Berrocoso E. Neurotrophins role in depression neurobiology: a review of basic and clinical evidence. *Curr Neuropharmacol* 2011;9(4):530–52.
57. Ignácio ZM, Réus GZ, Abelaira HM, Quevedo J. Epigenetic and epistatic interactions between serotonin transporter and brain-derived neurotrophic factor genetic polymorphism: Insights in depression. *Neuroscience* 2014;275:455–68.
58. Ozan E, Okur H, Eker C, Eker OD, Gönül AS, Akarsu N. The effect of depression, BDNF gene val66met polymorphism and gender on serum BDNF levels. *Brain Res Bull* 2010;81(1):61–5.
59. Verhagen M, van der Meij A, van Deurzen PAM, Janzing JGE, Arias-Vásquez A, Buitelaar JK, et al. Meta-analysis of the BDNF Val66Met polymorphism in major depressive disorder: effects of gender and ethnicity. *Mol Psychiatry* 2010;15(3):260–71.

60. Donovan MJ, Miranda RC, Kraemer R, McCaffrey TA, Tessarollo L, Mahadeo D, et al. Neurotrophin and neurotrophin receptors in vascular smooth muscle cells. Regulation of expression in response to injury. *Am J Pathol* 1995;147:309–24.
61. Nakahashi T, Fujimura H, Altar CA, Li J, Kambayashi J, Tandon NN, et al. Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. *FEBS Lett* 2000;470(2):113–7.
62. Braun A, Lommatzsch M, Mannsfeldt A, Neuhaus-Steinmetz U, Fischer A, Schnoy N, et al. Cellular sources of enhanced brain-derived neurotrophic factor production in a mouse model of allergic inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;21:537–46.
63. Radka SF, Holst PA, Fritsche M, Altar CA. 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* 1996;709(1):122–130.
64. Fujimura H, Altar CA, Chen R, Nakamura T, Nakahashi T, Kambayashi J, et al. Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. *Thromb Haemost* 2002;87(4):728–34.
65. Karege F, Perret G, Bondolfi G, Schwald M, Bertschy G, Aubry J-M. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Res* 2002;109(2):143–8.
66. Pan W, Banks WA, Fasold MB, Bluth J, Kastin AJ. Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. *Neuropharmacology* 1998;37(12):1553–61.
67. Poduslo J, Curran G. Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. *Mol brain Res* 1996;36:280–6.

68. Lommatzsch M, Zingler D, Schuhbaeck K, Schloetcke K, Zingler C, Schuff-Werner P, et al. The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. *Neurobiol Aging* 2005;26(1):115–23.
69. Raap U, Braunstahl G-J. The role of neurotrophins in the pathophysiology of allergic rhinitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2010;10:8–13.
70. Ziemińska E, Kügler S, Schachner M, Wewiór I, Czarkowska-Bauch J, Skup M. Overexpression of BDNF increases excitability of the lumbar spinal network and leads to robust early locomotor recovery in completely spinalized rats. *PLoS One* 2014; Feb 14;9(2):e88833. doi: 10.1371/journal.pone.0088833.
71. Linker RA, Lee D-H, Demir S, Wiese S, Kruse N, Siglienti I, et al. Functional role of brain-derived neurotrophic factor in neuroprotective autoimmunity: therapeutic implications in a model of multiple sclerosis. *Brain* 2010;133:2248–63.
72. Yang Z, Ho D, Lau C, Tam K. Platelet activation during tumor development, the potential role of BDNF–TrkB autocrine loop. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;346:981–5.
73. Duman RS. Depression: a case of neuronal life and death? *Biol Psychiatry* 2004;56(3):140–5.
74. Shirayama Y, Chen AC-H, Nakagawa S, Russell DS, Duman RS. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci* 2002;22(8):3251–61.
75. Duman RS, Malberg J, Nakagawa S, D'Sa C. Neuronal plasticity and survival in mood disorders. *Biol Psychiatry* 2000;48(8):732–9.
76. Schmidt HD, Duman RS. Peripheral BDNF produces antidepressant-like effects in cellular and behavioral models. *Neuropsychopharmacology* 2010;35(12):2378–91.

77. Shimizu E, Hashimoto K, Okamura N, Koike K, Komatsu N, Kumakiri C, et al. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol Psychiatry* 2003;54(1):70–5.
78. Brunoni AR, 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):1169–80.
79. Fernandes B, Gama CS, Massuda R, Torres M, Camargo D, Kunz M, et al. Serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is not associated with response to electroconvulsive therapy (ECT): a pilot study in drug resistant depressed patients. *Neurosci Lett* 2009;453(3):195–8.
80. Fernandes BS, Berk M, Turck CW, Steiner J, Gonçalves C. Decreased peripheral brain-derived neurotrophic factor levels are a biomarker of disease activity in major psychiatric disorders: a comparative meta-analysis. *Mol Psychiatry* 2014;19(7):750-1.
81. Molendijk ML, Spinhoven P, Polak M, Bus BA, Penninx BW, Elzinga BM. Serum BDNF concentrations as peripheral manifestations of depression: evidence from a systematic review and meta-analyses on 179 associations (N=9484). *Mol Psychiatry* 2014;19(7):791-800.
82. Sen S, Duman R, Sanacora G. Serum brain-derived neurotrophic factor, depression, and antidepressant medications: meta-analyses and implications. *Biol Psychiatry* 2008;64(6):527–32.
83. Bocchio-Chiavetto L, Bagnardi V, Zanardini R, Molteni R, Nielsen MG, Placentino A, et al. Serum and plasma BDNF levels in major depression: a replication study and meta-analyses. *World J Biol Psychiatry* 2010;11(6):763–73.
84. Lee BH, Kim YK. Reduced platelet BDNF level in patients with major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009;33(5):849–53.

85. Pandey GN, Dwivedi Y. Brain-derived neurotrophic factor gene and protein expression in pediatric and adult depressed subjects. *Prog Neuropsychopharmacology Biol Psychiatry* 2010;34(4):645-51.
86. Altar CA. Neurotrophins and depression. *Trends Pharmacol Sci* 1999;20(2):59–61.
87. Siuciak JA, Boylan C, Fritsche M, Altar CA, Lindsay RM. BDNF increases monoaminergic activity in rat brain following intracerebroventricular or intraparenchymal administration. *Brain Res* 1996;710(1-2):11–20.
88. Siuciak JA, Lewis DR, Wiegand SJ, Lindsay RM. Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Pharmacol Biochem Behav* 1997;56(1):131–7.
89. Eisch AJ, Bolan CA, Wit J De, Simonak RD, Pudiak CM, Barrot M, et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Ventral Midbrain – Nucleus Accumbens Pathway : A Role in Depression. *Biol Psychiatry* 2003;54: 994–1005.
90. Martinowich K, Lu B. Interaction between BDNF and serotonin: role in mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 2008;33(1):73–83.
91. Ernst C, Olson AK, Pinel JPJ, Lam RW, Christie BR. Antidepressant effects of exercise: evidence for an adult-neurogenesis hypothesis? *J Psychiatry Neurosci*. 2006;31:84–92.
92. Schloesser RJ, Lehmann M, Martinowich K, Manji HK, Herkenham M. Environmental enrichment requires adult neurogenesis to facilitate the recovery from psychosocial stress. *Mol Psychiatry* 2010;15(12):1152–63.
93. Nibuya M, Morinobu S, Duman RS. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci* 1995;15(11):7539–47.
94. Lee BH, Kim YK. BDNF mRNA expression of peripheral blood mononuclear cells was decreased in depressive patients who had or had not recently attempted suicide. *J Affect Disord* 2010;125(1-3):369–73.

95. Chen ZY, Jing D, Bath KG, Ieraci A, Khan T, Siao C-J, et al. Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. *Science* 2006;314(5796):140–3.
96. Koponen E, Rantamäki T, Voikar V, Saarelainen T, MacDonald E, Castrén E. Enhanced BDNF signaling is associated with an antidepressant-like behavioral response and changes in brain monoamines. *Cell Mol Neurobiol* 2005;25(6):973–80.
97. Duman RS, Li N, Liu R-J, Duric V, Aghajanian G. Signaling pathways underlying the rapid antidepressant actions of ketamine. *Neuropharmacology* 2012;62(1):35–41.
98. Zarate C, Duman RS, Liu G, Sartori S, Quiroz J, Murck H. New paradigms for treatment-resistant depression. *Ann N Y Acad Sci* 2013;1292:21–31.
99. Jacobsen JPR, Mørk A. The effect of escitalopram, desipramine, electroconvulsive seizures and lithium on brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein expression in the rat brain and the correlation to 5-HT and 5-HIAA levels. *Brain Res* 2004;1024(1-2):183–92.
100. Alboni S, Benatti C, Capone G, Corsini D, Caggia F, Tascetta F, et al. Time-dependent effects of escitalopram on brain derived neurotrophic factor (BDNF) and neuroplasticity related targets in the central nervous system of rats. *Eur J Pharmacol* 2010;643(2-3):180–7.
101. Nagappan G, Zaitsev E, Senatorov VV, Yang J, Hempstead BL, Lu B. Control of extracellular cleavage of ProBDNF by high frequency neuronal activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(4):1267–72.
102. Dell’Osso L, Del Debbio A, Veltri A, Bianchi C, Roncaglia I, Carlini M, et al. Associations between brain-derived neurotrophic factor plasma levels and severity of the illness, recurrence and symptoms in depressed patients. *Neuropsychobiology* 2010;62(4):207–12.

103. Lee HY, Kim YK. Plasma brain-derived neurotrophic factor as a peripheral marker for the action mechanism of antidepressants. *Neuropsychobiology* 2008;57(4):194–9.
104. Piccinni A, Marazziti D, Catena M, Domenici L, Del Debbio A, Bianchi C, et al. Plasma and serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients during 1 year of antidepressant treatments. *J Affect Disord* 2008;105(1-3):279–83.
105. Dreimüller N, Schlicht KF, Wagner S, Peetz D, Borysenko L, Hiemke C, et al. Early reactions of brain-derived neurotrophic factor in plasma (pBDNF) and outcome to acute antidepressant treatment in patients with major depression. *Neuropharmacology* 2012;62(1):264–9.
106. Ni W, Watts SW. 5-hydroxytryptamine in the cardiovascular system: focus on the serotonin transporter (SERT). *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006;33(7):575–83.
107. Homberg JR, van den Hove DL. The serotonin transporter gene and functional and pathological adaptation to environmental variation across the life span. *Prog Neurobiol* 2012;99(2):117–27.
108. Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;71(4):533–54.
109. Leysen JE, de Chaffoy de C, De Clerck F, Niemegeers CJ, Van Nueten JM. Serotonin-S2 receptor binding sites and functional correlates. *Neuropharmacology* 1984;23:1493–501.
110. Launay J-M, Schneider B, Loric S, Da Prada M, Kellermann O. Serotonin transport and serotonin transporter-mediated antidepressant recognition are controlled by 5-HT2B receptor signaling in serotonergic neuronal cells. *FASEB J* 2006;20(11):1843–54.
111. Laruelle M, Vanisberg MA, Maloteaux JM. Regional and subcellular localization in human brain of [3H]paroxetine binding, a marker of serotonin uptake sites. *Biol Psychiatry* 1988;24:299–309.

112. Chen JG, Liu-Chen S, Rudnick G. Determination of External Loop Topology in the Serotonin Transporter by Site-directed Chemical Labeling. *J Biol Chem* 1998; 273(20):12675–81.
113. Langer SZ, Galzin AM, Poirier MF, Loo H, Sechter D, Zarifian E. Association of [3H]-imipramine and [3H]-paroxetine binding with the 5HT transporter in brain and platelets: relevance to studies in depression. *J Recept Res* 1987;7:499–521.
114. Marazziti D, Rossi A, Giannaccini G, Baroni S, Lucacchini a, Cassano GB. Presence and characterization of the serotonin transporter in human resting lymphocytes. *Neuropsychopharmacology* 1998;19(2):154–9.
115. Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, et al. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 1996;274:1527–31.
116. Karg K. The serotonin transporter promoter variant (5-HTTLPR), stress, and depression meta-analysis revisited: evidence of genetic moderation. *Arch Gen Psychiatry* 2011;68(5):444–54.
117. Clarke H, Flint J, Attwood AS, Munafò MR. Association of the 5-HTTLPR genotype and unipolar depression: a meta-analysis. *Psychol Med* 2010;40:1767–78.
118. Serretti A, Zanardi R, Mandelli L, Smeraldi E, Colombo C. A neural network model for combining clinical predictors of antidepressant response in mood disorders. *J Affect Disord* 2007;98(3):239–45.
119. Blier P, El Mansari M. Serotonin and beyond: therapeutics for major depression. *Phil Trans R Soc B* 2013;368(1615):20120536.
120. Arora RC, Meltzer HY. Serotonergic measures in the brains of suicide victims: 5-HT₂ binding sites in the frontal cortex of suicide victims and control subjects. *Am J Psychiatry* 1989;146:730–6.

121. Perry EK, Marshall EF, Blessed G, Tomlinson BE, Perry RH. Decreased imipramine binding in the brains of patients with depressive illness. *Br J Psychiatry* 1983;142:188–92.
122. Delgado P, Miller H, Salomon R. Tryptophan-depletion challenge in depressed patients treated with desipramine or fluoxetine: implications for the role of serotonin in the mechanism of antidepressant. *Biol Psychiatry* 1999;46:212–220
123. Graham D, Langer SZ. Advances in sodium-ion coupled biogenic amine transporters. *Life Sci* 1992;51:631–45.
124. Chaput Y, Blier P, de Montigny C. In vivo electrophysiological evidence for the regulatory role of autoreceptors on serotonergic terminals. *J Neurosci* 1986;6:2796–801.
125. Haddjeri N, Blier P, Montigny C De. Long-term antidepressant treatments result in a tonic activation of forebrain 5-HT_{1A} receptors. *J Neurosci* 1998;18(23):10150–6.
126. Homberg JR, Molteni R, Calabrese F, Riva MA. The serotonin-BDNF duo: Developmental implications for the vulnerability to psychopathology. *Neurosci Biobehav Rev* 2014;43C:35–47.
127. Merlio JP, Ernfors P, Jaber M, Persson H. Molecular cloning of rat trkC and distribution of cells expressing messenger RNAs for members of the trk family in the rat central nervous system. *Neuroscience* 1992;51:513–32.
128. Anderson KD, Alderson RF, Altar CA, DiStefano PS, Corcoran TL, Lindsay RM, et al. Differential distribution of exogenous BDNF, NGF, and NT-3 in the brain corresponds to the relative abundance and distribution of high-affinity and low-affinity neurotrophin receptors. *J Comp Neurol* 1995;357:296–317.
129. Trajkovska V, Santini M a, Marcussen a B, Thomsen MS, Hansen HH, Mikkelsen JD, et al. BDNF downregulates 5-HT(2A) receptor protein levels in hippocampal cultures. *Neurochem Int* 2009;55(7):697–702.

130. Burke TF, Advani T, Adachi M, Monteggia LM, Hensler JG. Sensitivity of hippocampal 5-HT_{1A} receptors to mild stress in BDNF-deficient mice. *Int J Neuropsychopharmacology* 2013;16:631–45.
131. Cools R, Roberts A, Robbins T. Serotonergic regulation of emotional and behavioural control processes. *Trends Cogn Sci* 2008; 12(1):31–40.
132. Casarotto PC, de Bortoli VC, Zangrossi H. Intrahippocampal injection of brain-derived neurotrophic factor increases anxiety-related, but not panic-related defensive responses: involvement of serotonin. *Behav Pharmacol* 2012;23(1):80–8.
133. Guiard BP, David DJP, Deltheil T, Chenu F, Le Maitre E, Renoir T, et al. Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice exhibit a hippocampal hyperserotonergic phenotype. *Int J Neuropsychopharmacology* 2008;11:79–92.
134. Bath KG, Jing DQ, Dincheva I, Neeb CC, Pattwell SS, Chao M V, et al. BDNF Val66Met impairs fluoxetine-induced enhancement of adult hippocampus plasticity. *Neuropsychopharmacology* 2012;37(5):1297–304.
135. Deltheil T, Guiard BP, Cerdan J, David DJ, Tanaka KF, Repérant C, et al. Behavioral and serotonergic consequences of decreasing or increasing hippocampus brain-derived neurotrophic factor protein levels in mice. *Neuropharmacology* 2008;55(6):1006–14.
136. Branchi I, Santarelli S, Capoccia S, Poggini S, Andrea ID, Cirulli F, et al. Antidepressant treatment outcome depends on the quality of the living environment: a pre-clinical investigation in mice. *PLoS One* 2013;8(4):e62226.
137. Calabrese F, Molteni R, Maj PF, Cattaneo A, Gennarelli M, Racagni G, et al. Chronic duloxetine treatment induces specific changes in the expression of BDNF transcripts and in the subcellular localization of the neurotrophin protein. *Neuropsychopharmacology* 2007;32(11):2351–9.

138. Kozisek ME, Middlemas D, Bylund DB. Brain-derived neurotrophic factor and its receptor tropomyosin-related kinase B in the mechanism of action of antidepressant therapies. *Pharmacol Ther* 2008;117(1):30–51.
139. Maya Vetencourt JF, Sale A, Viegi A, Baroncelli L, De Pasquale R, O’Leary OF, et al. The antidepressant fluoxetine restores plasticity in the adult visual cortex. *Science* 2008 320(5874):385–8.
140. Kalueff A V., Olivier JDA, Nonkes LJP, Homberg JR. Conserved role for the serotonin transporter gene in rat and mouse neurobehavioral endophenotypes. *Neurosci Biobehav Rev* 2010;34(3):373-86.
141. Caspi A, Hariri AR, Holmes A, Uher R, Moffitt TE. Genetic sensitivity to the environment: the case of the serotonin transporter gene and its implications for studying complex diseases and traits. *Am J Psychiatry* 2010;167(5):509–27.
142. Guidotti G, Calabrese F, Auletta F, Olivier J, Racagni G, Homberg J, et al. Developmental influence of the serotonin transporter on the expression of npas4 and GABAergic markers: modulation by antidepressant treatment. *Neuropsychopharmacology* 2012;37(3):746–58.
143. Calabrese F, Guidotti G, Middelman A, Racagni G, Homberg J, Riva M a. Lack of serotonin transporter alters BDNF expression in the rat brain during early postnatal development. *Mol Neurobiol* 2013;48:244–56.
144. Luoni A, Hulsken S, Cazzaniga G, Racagni G, Homberg JR, Riva MA. Behavioural and neuroplastic properties of chronic lurasidone treatment in serotonin transporter knockout rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 2013;16(6):1319–30.
145. Rand ML, Leung R, Packham MA. Platelet function assays. *Transfus Apher Sci* 2003;28(3):307–17.
146. Stratz C, Trenk D, Bhatia HS, Valina C, Neumann F-J, Fiebich BL. Identification of 5-HT₃ receptors on human platelets: increased surface immunoreactivity after activation

- with adenosine diphosphate (ADP) and thrombin receptor-activating peptide (TRAP).
Thromb Haemost 2008;99(4):784–6.
147. McNicol A, Israels SJ. Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. Thromb Res 1999;95(1):1–18.
148. Galan AM, Lopez-Vilchez I, Diaz-Ricart M, Navalon F, Gomez E, Gasto C, et al. Serotonergic mechanisms enhance platelet-mediated thrombogenicity. Thromb Haemost 2009;102(3):511–9.
149. Escolar G, Díaz-Ricart M, Gomez-Gil E, Serra M, Gasto C, Bozzo J, et al. Serotonergic mechanisms: a potential link between affective disorders and cardiovascular risk. Timely Top Med Cardiovasc Dis 2006;10:E3.
150. White JG. Ultrastructural modifications in platelet membranes and cytoskeleton following activation. Blood Cells 1983;9:237–61.
151. Ting HJ, Murad JP, Espinosa EVP, Khasawneh FT. Thromboxane A2 Receptor: Biology and Function of a Peculiar Receptor that Remains Resistant for Therapeutic Targeting. Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics. 2012. p. 248–59.
152. Rendu F, Lavie P, Saleun S, Lasne D. Platelet procoagulant activity is independent of aggregation. Nouv Rev Fr Hematol. 1995;37:327–31.
153. Dale GL, Friese P, Batar P, Hamilton SF, Reed GL, Jackson KW, et al. Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface. J Thromb Haemost 2005;3(10):2185-92.
154. Weiss HJ, Turitto VT, Baumgartner HR, Nemerson Y, Hoffmann T. Evidence for the presence of tissue factor activity on subendothelium. Blood. 1989;73:968–75.
155. Brummel KE, Paradis SG, Butenas S, Mann KG. Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation. Blood. 2002;100:148–52.

156. Alberio L, Safa O, Clemetson KJ, Esmon CT, Dale GL. Surface expression and functional characterization of alpha-granule factor V in human platelets: effects of ionophore A23187, thrombin, collagen, and convulxin. *Blood* 2000;95(5):1694–702.
157. Dale GL. Coated-platelets: an emerging component of the procoagulant response. *J Thromb Haemost* 2005;3(10):2185–92.
158. Szasz R, Dale GL. Thrombospondin and fibrinogen bind serotonin-derivatized proteins on COAT-platelets. *Blood* 2002;100(8):2827–31.
159. Lehoux S, Castier Y, Tedgui A. Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. *J Int Medicine* 2006;259(4):381–92.
160. Baumgartner H. The role of blood flow in platelet adhesion, fibrin deposition, and formation of mural thrombi. *Microvasc Res* 1973;5(2):167–79.
161. Tonda R, Lopez-Vilchez I, Navalon F, Pino M, Hernandez MR, Escolar G, et al. Platelets interact with tissue factor immobilized on surfaces: Effects of shear rate. *Eur J Clin Invest* 2008;38:34–42.
162. Yubero-Lahoz S, Robledo P, Farré M, de la Torre R. Platelet SERT as a peripheral biomarker of serotonergic neurotransmission in the central nervous system. *Curr Med Chem* 2013;20:1382–96.
163. Rudnick G. Serotonin transporters--structure and function. *J Membr Biol* 2006;213:101–10.
164. Parsey R, Hastings R, Oquendo M, Huang Y, Simpson N, Arcement J, et al. Lower serotonin transporter binding potential in the human brain during major depressive episodes. *Am J Psychiatry* 2006;163(1):52–8.
165. Ellis PM, Salmond C. Is platelet imipramine binding reduced in depression? A meta-analysis. *Biol Psychiatry*. 1994;36:292–9.

166. Wirz-Justice A. Platelet research in psychiatry. *Experientia*. 1988;44:145–52.
167. Owens MJ, Nemeroff CB. Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter. *Clin Chem* 1994;40(2):288–95.
168. Rosel P, Arranz B, Vallejo J, Alvarez P, Menchon JM, Palencia T, et al. Altered [3H]imipramine and 5-HT₂ but not [3H]paroxetine binding sites in platelets from depressed patients. *J Affect Disord* 1999;52:225–33.
169. Gómez-Gil E, Gastó C, Díaz-Ricart M, Carretero M, Salamero M, Catalán R, et al. Platelet 5-HT_{2A}-receptor-mediated induction of aggregation is not altered in major depression. *Hum Psychopharmacol* 2002;17:419–24.
170. Gómez-Gil E, Gastó C, Carretero M, Díaz-Ricart M, Salamero M, Navinés R, et al. Decrease of the platelet 5-HT_{2A} receptor function by long-term imipramine treatment in endogenous depression. *Hum Psychopharmacol* 2004;19:251–8.
171. Reed GL, Fitzgerald ML, Polgár J. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: insights into the “secrete” life of thrombocytes. *Blood* 2000;96:3334–42.
172. Jonnakuty C, Gragnoli C. What do we know about serotonin? *J Cell Physiol* 2008;217(2):301–6.
173. Rausch JL, Johnson ME, Li J, Hutcheson J, Carr BM, Corley KM, et al. Serotonin transport kinetics correlated between human platelets and brain synaptosomes. *Psychopharmacology (Berl)* 2005;180(3):391–8.
174. Pletscher A. The 5-hydroxytryptamine system of blood platelets: physiology and pathophysiology. *Int J Cardiol* 1987;14:177–88.
175. Carney RM, Freedland KE, Jaffe AS, Frasure-Smith N, Lespérance F, Sheps DS, et al. Depression as a risk factor for post-MI mortality. *J Am Coll Cardiol* 2004;44(2):472; author reply 473–4.

176. Maes M, Ruckoanich P, Chang YS, Mahanonda N, Berk M. Multiple aberrations in shared inflammatory and oxidative & nitrosative stress (IO&NS) pathways explain the co-association of depression and cardiovascular disorder (CVD), and the increased risk for CVD and due mortality in depressed patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2011;35(3):769–83.
177. Atar D, Malinin A, Takserman A, Pokov A, van Zyl L, Tanguay J-F, et al. Escitalopram, but not its major metabolites, exhibits antiplatelet activity in humans. *J Clin Psychopharmacol* 2006;26(2):172–7.
178. Kendler KS, Gardner CO, Fiske A, Gatz M. Major depression and coronary artery disease in the Swedish twin registry: phenotypic, genetic, and environmental sources of comorbidity. *Arch Gen Psychiatry* 2009;66:857–63.
179. Rudisch B, Nemeroff CB. Epidemiology of comorbid coronary artery disease and depression. *Biol Psychiatry* 2003;54(3):227–40.
180. Thombs B, Bass E, Ford DE, Stewart KJ, Tsilidis KK, Patel U, et al. Prevalence of depression in survivors of acute myocardial infarction. *J Gen Intern Med* 2006;21(1):30-8.
181. Lippi G, Montagnana M, Favaloro EJ, Franchini M. Mental depression and cardiovascular disease: a multifaceted, bidirectional association. *Semin Thromb Hemost* 2009;35(3):325-36.
182. Glassman A. Psychiatric characteristics associated with long-term mortality among 361 patients having an acute coronary syndrome and major depression: seven-year follow-up of SADHART participants. *Arch Gen Psychiatry* 2009;66(9):1022–9.
183. Ruo B, Rumsfeld JS, Hlatky MA, Liu H, Browner WS, Whooley MA. Depressive symptoms and health-related quality of life: the Heart and Soul Study. *JAMA* 2003;290(2):215–21.

184. Frasure-Smith N, Lespérance F, Habra M, Talajic M, Khairy P, Dorian P, et al. Elevated depression symptoms predict long-term cardiovascular mortality in patients with atrial fibrillation and heart failure. *Circulation* 2009;120(2):134–40.
185. Lichtman JH, Bigger JT, Blumenthal J a, Frasure-Smith N, Kaufmann PG, Lespérance F, et al. Depression and coronary heart disease: recommendations for screening, referral, and treatment: a science advisory from the American Heart Association prevention committee of the council on cardiovascular nursing, council on clinical cardiology, council on epidemiology and prevention, and interdisciplinary council on quality of care and outcomes research: endorsed by the American Psychiatric Association. *Circulation* 2008;118(17):1768–75.
186. O’Neil A, Williams ED, Stevenson CE, Oldenburg B, Berk M, Sanderson K. Co-morbid cardiovascular disease and depression: sequence of disease onset is linked to mental but not physical self-rated health. Results from a cross-sectional, population-based study. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol* 2012;47(7):1145–51.
187. Musselman DL, Evans DL, Nemeroff CB. The relationship of depression to cardiovascular disease: epidemiology, biology, and treatment. *Arch Gen Psychiatry* 1998;55:580–92.
188. Surtees PG, Wainwright NWJ, Luben RN, Wareham NJ, Bingham SA, Khaw K-T. Depression and ischemic heart disease mortality: evidence from the EPIC-Norfolk United Kingdom prospective cohort study. *Am J Psychiatry* 2008;165:515–23.
189. Grippo AJ, Johnson AK. Biological mechanisms in the relationship between depression and heart disease. *Neurosci Biobehav Rev* 2002;26(8):941-62.
190. Nemeroff CB, Goldschmidt-Clermont PJ. Heartache and heartbreak--the link between depression and cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol* 2012;9(9):526–39.

191. Musselman DL, Marzec UM, Manatunga A, Penna S, Reemsnyder A, Knight BT, et al. Platelet reactivity in depressed patients treated with paroxetine: preliminary findings. *Arch Gen Psychiatry* 2000;57:875–82.
192. Musselman DL, Tomer A, Manatunga AK, Knight BT, Porter MR, Kasey S, et al. Exaggerated platelet reactivity in major depression. *Am J Psychiatry* 1996;153:1313–7.
193. Morel-Kopp MC, McLean L, Chen Q, Tofler GH, Tennant C, Maddison V, et al. The association of depression with platelet activation: evidence for a treatment effect. *J Thromb Haemost* 2009;7(4):573–81.
194. Aschbacher K, Roepke SK, von Känel R, Mills PJ, Mausbach BT, Patterson TL, et al. Persistent versus transient depressive symptoms in relation to platelet hyperactivation: a longitudinal analysis of dementia caregivers. *J Affect Disord* 2009;116(1-2):80–7.
195. Laghrissi-Thode F, Wagner WR, Pollock BG, Johnson PC, Finkel MS. Elevated platelet factor 4 and beta-thromboglobulin plasma levels in depressed patients with ischemic heart disease. *Biol Psychiatry* 1997;42(4):290–5.
196. Schins A. Increased coronary events in depressed cardiovascular patients: 5-HT_{2A} receptor as missing link? *Psychosom Med* 2003;65(5):729–37.
197. Parakh K, Sakhuja A, Bhat U, Ziegelstein RC. Platelet function in patients with depression. *South Med J*. 2008;101(6):612-7.
198. McCaffery JM, Frasure-Smith N, Dubé M-P, Thérioux P, Rouleau GA, Duan Q, et al. Common genetic vulnerability to depressive symptoms and coronary artery disease: a review and development of candidate genes related to inflammation and serotonin. *Psychosom Med* 2006;68:187–200.
199. Fumeron F, Betoulle D, Nicaud V, Evans A, Kee F, Ruidavets JB, et al. Serotonin transporter gene polymorphism and myocardial infarction: Etude Cas-Témoins de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM). *Circulation* 2002;105:2943–5.

200. Nakatani D, Sato H, Sakata Y, Shiotani I, Kinjo K, Mizuno H, et al. Influence of serotonin transporter gene polymorphism on depressive symptoms and new cardiac events after acute myocardial infarction. *Am Heart J*. 2005;150:652–8.
201. Lopez-Vilchez I, Galan AM, Hernandez MR, Caballo C, Roque M, Diaz-Ricart M, et al. Platelet-associated tissue factor enhances platelet reactivity and thrombin generation in experimental studies in vitro. *Thromb Res* 2012;130(6):e294–300.
202. Günther L, Liebscher S, Jähkel M, Oehler J. Effects of chronic citalopram treatment on 5-HT1A and 5-HT2A receptors in group- and isolation-housed mice. *Eur J Pharmacol* 2008;593(1-3):49–61.
203. Yamauchi M, Miyara T, Matsushima T, Imanishi T. Desensitization of 5-HT2A receptor function by chronic administration of selective serotonin reuptake inhibitors. *Brain Res* 2006;1067(1):164–9.
204. Whang W, Kubzansky LD, Kawachi I, Rexrode KM, Kroenke CH, Glynn RJ, et al. Depression and risk of sudden cardiac death and coronary heart disease in women: results from the Nurses' Health Study. *J Am Coll Cardiol* 2009;53(11):950–8.
205. Rosenberg LB, Whang W, Shimbo D, Shah A, Shapiro PA, Davidson KW. Exposure to tricyclic antidepressants is associated with an increased risk of incident CHD events in a population-based study. *Int J Cardiol* 2010;145(1):124–5.
206. Ziu E, Mercado CP, Li Y, Singh P, Ahmed BA, Freyaldenhoven S, et al. Down-regulation of the serotonin transporter in hyperreactive platelets counteracts the pro-thrombotic effect of serotonin. *J Mol Cell Cardiol* 2012;52(5):1112–21.
207. Jedlitschky G, Greinacher A, Kroemer HK. Transporters in human platelets: physiologic function and impact for pharmacotherapy. *Blood* 2012;119(15):3394–402.
208. Skop BP, Brown TM. Potential vascular and bleeding complications of treatment with selective serotonin reuptake inhibitors. *Psychosomatics* 1996;37(1):12–6.

209. Lopez-Vilchez I, Diaz-Ricart M, White JG, Escolar G, Galan AM. Serotonin enhances platelet procoagulant properties and their activation induced during platelet tissue factor uptake. *Cardiovasc Res* 2009;84(2):309–16.
210. Serebruany VL, Glassman AH, Malinin AI, Nemeroff CB, Musselman DL, van Zyl LT, et al. Platelet/endothelial biomarkers in depressed patients treated with the selective serotonin reuptake inhibitor sertraline after acute coronary events: the Sertraline AntiDepressant Heart Attack Randomized Trial (SADHART) Platelet Substudy. *Circulation* 2003;108(8):939–44.
211. Serebruany VL, Gurbel PA, O'Connor CM. Platelet inhibition by sertraline and N-desmethylsertraline: a possible missing link between depression, coronary events, and mortality benefits of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacol Res* 2001;43:453–62.
212. Van Zyl LT, Lespérance F, Frasure-Smith N, Malinin AI, Atar D, Laliberté M-A, et al. Platelet and endothelial activity in comorbid major depression and coronary artery disease patients treated with citalopram: the Canadian Cardiac Randomized Evaluation of Antidepressant and Psychotherapy Efficacy Trial (CREATE) biomarker sub-study. *J Thromb Thrombolysis* 2009;27(1):48–56.
213. Kitzlerová E, Anders M. The role of some new factors in the pathophysiology of depression and cardiovascular disease: overview of recent research. *Neuro Endocrinol Lett* 2007;28:832–40.
214. Carney RM, Freedland KE. Depression, mortality, and medical morbidity in patients with coronary heart disease. *Biol Psychiatry* 2003;54(3):241–7.
215. Maurer-Spurej E, Pittendreigh C, Solomons K. The influence of selective serotonin reuptake inhibitors on serotonin metabolism in human platelets. *Thromb Haemost* 2004;91:119–28.

216. Sauer WH, Berlin JA, Kimmel SE. Effect of antidepressants and their relative affinity for the serotonin transporter on the risk of myocardial infarction. *Circulation* 2003;108(1):32–6.
217. Schlienger RG, Meier CR. Effect of selective serotonin reuptake inhibitors on platelet activation: can they prevent acute myocardial infarction? *Am J Cardiovasc Drugs* 2003;3:149–62.
218. Serebruany VL, Glassman AH, Malinin AI, Sane DC, Finkel MS, Krishnan RR, et al. Enhanced platelet/endothelial activation in depressed patients with acute coronary syndromes: evidence from recent clinical trials. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003;14(6):563–7.
219. Gehi A, Musselman D, Otte C, Bruce E, Ali S, Whooley MA. Depression and platelet activation in outpatients with stable coronary heart disease: Findings from the Heart and Soul Study. *Psychiatry Res* 2010;175(3):200–4.
220. Ziegelstein RC, Meuchel J, Kim TJ, Latif M, Alvarez W, Dasgupta N, et al. Selective serotonin reuptake inhibitor use by patients with acute coronary syndromes. *Am J Med* 2007;120:525–30.
221. Taylor CB, Youngblood ME, Catellier D, Veith RC, Carney RM, Burg MM, et al. Effects of antidepressant medication on morbidity and mortality in depressed patients after myocardial infarction. *Arch Gen Psychiatry* 2005;62(7):792–8.
222. Honig A, Kuyper AMG, Schene AH, van Melle JP, de Jonge P, Tulner DM, et al. Treatment of post-myocardial infarction depressive disorder: a randomized, placebo-controlled trial with mirtazapine. *Psychosom Med* 2007;69(7):606–13.
223. De Jonge P, Honig A, van Melle JP, Schene AH, Kuyper AMG, Tulner D, et al. Nonresponse to treatment for depression following myocardial infarction: association with subsequent cardiac events. *Am J Psychiatry* 2007;164(9):1371–8.

224. Lesperance F, Frasura-Smith N. Depression and heart disease. *Cleve Clin J Med* 2007;74(2):63–6.
225. Glassman AH, O'Connor CM, Califf RM, Swedberg K, Schwartz P, Bigger JT, et al. Sertraline treatment of major depression in patients with acute MI or unstable angina. *JAMA* 2002;288(6):701–9.
226. Davidson KW, Rieckmann N, Clemow L, Schwartz JE, Shimbo D. Enhanced Depression Care for Patients With Acute Coronary Syndrome and Persistent Depressive Symptoms. *Arch Intern Med*. 2010;170(7):600–8.
227. Ladapo J, Shaffer J, Fang Y. Cost-effectiveness of Enhanced Depression Care after Acute Coronary Syndrome: Results from the COPES Randomized Controlled Trial. *Arch Intern Med* 2012;172(21):1682–4.
228. Santangelo A, Testai M, Barbagallo P, Crisafulli C, Grasso S, Manuele S, et al. Use of specific serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) (Sertraline or Citalopram) in the treatment of depression reduces the cardiovascular risk in the elderly: evidence from a Sicilian population >80 years recovered in the assisted sanitary residences. *Arch Gerontol Geriatr* 2009;48(3):350–2.
229. Pizzi C, Mancini S, Angeloni L, Fontana F, Manzoli L, Costa GM. Effects of selective serotonin reuptake inhibitor therapy on endothelial function and inflammatory markers in patients with coronary heart disease. *Clin Pharmacol Ther* 2009;86(5):527–32.
230. Sherwood A, Blumenthal JA, Trivedi R, Johnson KS, O'Connor CM, Adams KF, et al. Relationship of depression to death or hospitalization in patients with heart failure. *Arch Intern Med* 2007;167:367–73.
231. Dalton SO, Johansen C, Mellekjaer L, Nørgård B, Sørensen HT, Olsen JH. Use of selective serotonin reuptake inhibitors and risk of upper gastrointestinal tract bleeding: a population-based cohort study. *Arch Intern Med* 2003;163:59–64.

232. De Abajo FJ, Montero D, García Rodríguez LA, Madurga M. Antidepressants and risk of upper gastrointestinal bleeding. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006;98(3):304-10.
233. Meijer WEE, Heerdink ER, Nolen WA, Herings RMC, Leufkens HGM, Egberts ACG. Association of risk of abnormal bleeding with degree of serotonin reuptake inhibition by antidepressants. *Arch Intern Med* 2004;164(21):2367–70.
234. Halperin D, Reber G. Influence of antidepressants on hemostasis. *Dialogues Clin Neurosci* 2007;9(1):47–59.
235. Steiner JA, Carneiro AMD, Blakely RD. Going with the flow: trafficking-dependent and -independent regulation of serotonin transport. *Traffic* 2008;9(9):1393-402.
236. Blakely RD, Ramamoorthy S, Schroeter S, Qian Y, Apparsundaram S, Galli A, et al. Regulated phosphorylation and trafficking of antidepressant-sensitive serotonin transporter proteins. *Biol Psychiatry* 1998;44(3):169-78.
237. Frankhauser P, Baranyai R, Ahrens T, Schloss P, Deuschle M, Lederbogen F. Platelet surface P-selectin expression is highly correlated with serotonin
238. Figueras G, Pérez V, San Martino O, Alvarez E, Artigas F. Pretreatment platelet 5-HT concentration predicts the short-term response to paroxetine in major depression. *Biol Psychiatry* 1999;46:518–24.
239. Fisar Z, Kalisová L, Paclt I, Anders M, Vevera J. Platelet serotonin uptake in drug-naïve depressive patients before and after treatment with citalopram. *Psychiatry Res* 2008;161(2):185–94.
240. Abdelmalik N, Ruhé HG, Barwari K, van den Dool E-J, Meijers JCM, Middeldorp S, et al. Effect of the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine on platelet function is modified by a SLC6A4 serotonin transporter polymorphism. *J Thromb Haemost* 2008;6(12):2168–74.

241. Grassi-Oliveira R, Stein LM, Lopes RP, Teixeira AL, Bauer ME. Low plasma brain-derived neurotrophic factor and childhood physical neglect are associated with verbal memory impairment in major depression--a preliminary report. *Biol Psychiatry* 2008;64(4):281–5.
242. Karege F, Bondolfi G, Gervasoni N, Schwald M, Aubry J-M, Bertschy G. 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* 2005;57(9):1068–72.
243. Lee BH, Kim H, Park SH, Kim YK. Decreased plasma BDNF level in depressive patients. *J Affect Disord* 2007;101(1-3):239–44.
244. Tamura S, Nagasawa A, Masuda Y, Tsunematsu T, Hayasaka K, Matsuno K, et al. BDNF, produced by a TPO-stimulated megakaryocytic cell line, regulates autocrine proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;427(3):542–6.
245. Laske C, Stransky E, Leyhe T, Eschweiler GW, Schott K, Langer H, et al. Decreased brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and β -thromboglobulin (β -TG) blood levels in Alzheimer's disease. *Thromb Haemost* 2006;96(1):102-3.
246. Burnouf T, Kuo Y-P, Blum D, Burnouf S, Su C-Y. Human platelet concentrates: a source of solvent/detergent-treated highly enriched brain-derived neurotrophic factor. *Transfusion* 2012;52(8):1721–8.
247. Tamura S, Suzuki H, Hirowatari Y, Hatase M, Nagasawa A, Matsuno K, et al. Release reaction of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) through PAR1 activation and its two distinct pools in human platelets. *Thromb Res* 2011;128(5):e55–61.
248. Storey RF. Biology and pharmacology of the platelet P2Y₁₂ receptor. *Curr Pharm Des* 2006;12:1255–9.

249. Hochstrasser T, Ehrlich D, Sperner-Unterweger B, Humpel C. Antidepressants and anti-inflammatory drugs differentially reduce the release of NGF and BDNF from rat platelets. *Pharmacopsychiatry* 2013;46(1):29–34.
250. Stoll P, Plessow A, Bratke K, Virchow JC, Lommatzsch M. Differential effect of clopidogrel and aspirin on the release of BDNF from platelets. *J Neuroimmunol* 2011;238(1-2):104–6.
251. Chimienti G, Mezzapesa a, Rotelli MT, Lupo L, Pepe G. Plasma concentrations but not serum concentrations of brain-derived neurotrophic factor are related to pro-inflammatory cytokines in patients undergoing major abdominal surgery. *Clin Biochem* 2012;45(9):631–6.
252. Amoureux S, Sicard P, Korandji C, Borey A, Benkhadra S, Sequeira-Le Grand A, et al. Increase in Levels of BDNF is Associated with Inflammation and Oxidative Stress during Cardiopulmonary Bypass. *Int J Biomed Sci* 2008;4(3):204–11.
253. Watanabe K, Hashimoto E, Ukai W, Ishii T, Yoshinaga T, Ono T, et al. Effect of antidepressants on brain-derived neurotrophic factor (BDNF) release from platelets in the rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010;34(8):1450–4.
254. Tsai S-J. The P11, tPA/plasminogen system and brain-derived neurotrophic factor: Implications for the pathogenesis of major depression and the therapeutic mechanism of antidepressants. *Med Hypotheses* 2007;68(1):180-3.
255. Martinowich K, Manji H, Lu B. New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nat Neurosci.* 2007;10(9):1089-93.
256. Zhou L, Xiong J, Lim Y, et al. Upregulation of blood proBDNF and its receptors in major depression. *J Affect Disord.* 2013;150(3):776-84.
257. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003;92(8):827-39.

258. Geiser F, Conrad R, Imbierowicz K, et al. Coagulation activation and fibrinolysis impairment are reduced in patients with anxiety and depression when medicated with serotonergic antidepressants. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2011;65(5):518-25.
259. Hoirisch-Clapauch S, Nardi AE, Gris J-C, Brenner B. Are the antiplatelet and profibrinolytic properties of selective serotonin-reuptake inhibitors relevant to their brain effects? *Thromb Res*. 2014;134(1):11-6.
260. Donovan MJ, Lin MI, Wiegand P, Ringstedt T, Kraemer R, Hahn R, et al. Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development* 2000;127(21):4531–40.
261. Lorigs L, Amoureux S, Vergely C, Zeller M, Cottin Y, Rochette L. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF): role of this neurotrophin in cardiovascular physiopathology]. *Ann Cardiol Angeiol* 2009;58(2):99–103.
262. Kerschensteiner BM, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T, Klinkert WEF, et al. I 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* 1999;189(5):865-70.
263. Chalidakov GN, Fiore M, Stankulov IS, Hristova M, Antonelli A, Manni L, et al. NGF, BDNF, leptin, and mast cells in human coronary atherosclerosis and metabolic syndrome. *Arch Physiol Biochem* 2001;109:357–60.
264. Ejiri J, Inoue N, Kobayashi S, Shiraki R, Otsui K, Honjo T, et al. Possible role of brain-derived neurotrophic factor in the pathogenesis of coronary artery disease. *Circulation* 2005;112(14):2114–20.
265. Cai D, Holm JM, Duignan IJ, Zheng J, Xaymardan M, Chin A, et al. BDNF-mediated enhancement of inflammation and injury in the aging heart. *Physiol Genomics* 2006;24(3):191–7.

266. Halade GV, Ma Y, Ramirez TA, Zhang J, Dai Q, Hensler JG, et al. Reduced BDNF attenuates inflammation and angiogenesis to improve survival and cardiac function following myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013;305:H1830–42.
267. Kraemer R, Baker PJ, Kent KC, Ye Y, Han JJ, Tejada R, et al. Decreased neurotrophin TrkB receptor expression reduces lesion size in the apolipoprotein E-null mutant mouse. *Circulation* 2005;112(23):3644–53.
268. Kreusser MM, Buss SJ, Krebs J, Kinscherf R, Metz J, Katus HA, et al. Differential expression of cardiac neurotrophic factors and sympathetic nerve ending abnormalities within the failing heart. *J Mol Cell Cardiol* 2008;44:380–7.
269. Kermani P, Hempstead B. Brain-derived neurotrophic factor: a newly described mediator of angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 2007;17(4):140–3.
270. Kim H, Li Q, Hempstead BL, Madri JA. Paracrine and autocrine functions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in brain-derived endothelial cells. *J Biol Chem* 2004;279(32):33538–46.
271. Manni L, Nikolova V, Vyagova D, Chaldakov GN, Aloe L. Reduced plasma levels of NGF and BDNF in patients with acute coronary syndromes. *Int J Cardiol* 2005;102(1):169–71.
272. Lorgis L, Amoureux S, de Maistre E, Sicard P, Bejot Y, Zeller M, et al. Serum brain-derived neurotrophic factor and platelet activation evaluated by soluble P-selectin and soluble CD-40-ligand in patients with acute myocardial infarction. *Fundam Clin Pharmacol* 2010;24(4):525–30.
273. Okada S, Yokoyama M, Toko H, Tateno K, Moriya J, Shimizu I, et al. Brain-derived neurotrophic factor protects against cardiac dysfunction after myocardial infarction via a central nervous system-mediated pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32(8):1902–9.

274. Jiang H, Liu Y, Zhang Y, Chen Z-Y. Association of plasma brain-derived neurotrophic factor and cardiovascular risk factors and prognosis in angina pectoris. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;415(1):99–103.
275. Chaldakov GN, Fiore M, Stankulov IS, Manni L, Hristova MG, Antonelli A, et al. Neurotrophin presence in human coronary atherosclerosis and metabolic syndrome: A role for NGF and BDNF in cardiovascular disease? *Prog Brain Res* 2004;146:279–89.
276. Huffman JC, Celano CM, Beach SR, Motiwala SR, Januzzi JL. Depression and cardiac disease: epidemiology, mechanisms, and diagnosis. *Cardiovasc Psychiatry Neurol* 2013, Article ID 695925, 14 pages, 2013. doi:10.1155/2013/695925
277. Hashimoto K. Sigma-1 receptor chaperone and brain-derived neurotrophic factor: emerging links between cardiovascular disease and depression. *Prog Neurobiol* 2013;100:15–29.
278. Baumeister H, Hutter N, Bengel J. Psychological and pharmacological interventions for depression in patients with coronary artery disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2011;9:CD008012.
279. Schmidt HD, Shelton RC, Duman RS. Functional biomarkers of depression: diagnosis, treatment, and pathophysiology. *Neuropsychopharmacology* 2011;36(12):2375–94.
280. Pan W, Banks WA, Kastin AJ. Permeability of the blood-brain barrier to neurotrophins. *Brain Res* 1998;788:87–94.
281. Sartorius A, Hellweg R, Litzke J, Vogt M, Dormann C, Vollmayr B, et al. Correlations and discrepancies between serum and brain tissue levels of neurotrophins after electroconvulsive treatment in rats. *Pharmacopsychiatry* 2009;42(6):270–6.
282. Elfving B, Plougmann PH, Müller HK, Mathé AA, Rosenberg R, Wegener G. Inverse correlation of brain and blood BDNF levels in a genetic rat model of depression. *Int J Neuropsychopharmacol* 2010;13(5):563–72.

283. Klein AB, Williamson R, Santini MA, Clemmensen C, Ettrup A, Rios M, et al. Blood BDNF concentrations reflect brain-tissue BDNF levels across species. *Int J Neuropsychopharmacol* 2011;14(3):347–53.
284. Bennett MR, Lagopoulos J. Stress and trauma: BDNF control of dendritic-spine formation and regression. *Prog Neurobiol* 2014;112(1):80-99.
285. Taliáz D, Nagaraj V, Haramati S, Chen A, Zangen A. Altered brain-derived neurotrophic factor expression in the ventral tegmental area, but not in the hippocampus, is essential for antidepressant-like effects of electroconvulsive therapy. *Biol Psychiatry* 2013;74:305–12.
286. Pillai A, Kale A, Joshi S, Naphade N, Raju MSVK, Nasrallah H, et al. Decreased BDNF levels in CSF of drug-naive first-episode psychotic subjects: correlation with plasma BDNF and psychopathology. *Int J Neuropsychopharmacol* 2010;13:535–9.
287. Trajkovska V, Marcussen AB, Vinberg M, Hartvig P, Aznar S, Knudsen GM. Measurements of brain-derived neurotrophic factor: methodological aspects and demographical data. *Brain Res Bull* 2007;73(1-3):143–9.
288. Lang UE, Bajbouj M, Gallinat J, Hellweg R. Brain-derived neurotrophic factor serum concentrations in depressive patients during vagus nerve stimulation and repetitive transcranial magnetic stimulation. *Psychopharmacol* 2006;187:56–9.
289. Machado-Vieira R, Yuan P, Brutsche N, DiazGranados N, Luckenbaugh D, Manji HK, et al. Brain-derived neurotrophic factor and initial antidepressant response to an N-methyl-D-aspartate antagonist. *J Clin Psychiatry* 2009;70:1662–6.
290. Brunoni AR, Machado-Vieira R, Zarate CA, Vieira ELM, Vanderhasselt M-A, Nitsche M a, et al. BDNF plasma levels after antidepressant treatment with sertraline and transcranial direct current stimulation: Results from a factorial, randomized, sham-controlled trial. *Eur Neuropsychopharmacol* 2014;24(7):1144–51.

291. Terracciano A, Lobina M, Piras MG, Cannas A, Meirelles O, Sutin AR, et al. Neuroticism, depressive symptoms, and serum BDNF. *Psychosom Med* 2012;73(8):638–42.
292. Jeon HJ, Kang E-S, Lee EH, Jeong E-G, Jeon J-R, Mischoulon D, et al. Childhood trauma and platelet brain-derived neurotrophic factor (BDNF) after a three month follow-up in patients with major depressive disorder. *J Psychiatr Res* 2012;46(7):966–72.
293. Yoshimura R, Sugita-Ikenouchi A, Hori H, Umene-Nakano W, Hayashi K, Katsuki A, et al. A close correlation between plasma and serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in healthy volunteers. *Int J Psychiatry Clin Pract* 2010;14(3):220–2.
294. Krabbe KS, Mortensen EL, Avlund K, Pedersen AN, Pedersen BK, Jorgensen T, et al. Brain-derived neurotrophic factor predicts mortality risk in older women. *J Am Geriatr Soc* 2009;57:1447–52.
295. Karege F, Schwald M, Cisse M. Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets. *Neurosci Lett* 2002;328(3):261–4.
296. Rojas PS, Fritsch R, Rojas RA, Jara P, Fiedler JL. Serum brain-derived neurotrophic factor and glucocorticoid receptor levels in lymphocytes as markers of antidepressant response in major depressive patients: a pilot study. *Psychiatry Res* 2011;189(2):239–45.
297. Marano CM, Phatak P, Vemulapalli UR, Sasan A, Nalbandyan MR, Ramanujam S, et al. Increased plasma concentration of brain-derived neurotrophic factor with electroconvulsive therapy: a pilot study in patients with major depression. *J Clin Psychiatry* 2007;68(4):512–7.
298. Bus BA, Molendijk ML, Penninx BJ, Buitelaar JK, Kenis G, Prickaerts J, et al. Determinants of serum brain-derived neurotrophic factor. *Psychoneuroendocrinology* 2011;36(2):228–39.

