

JOSÉ RIBEIRO LEMOS JUNIOR

Influência da variante Val66Met na expressão do gene *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) em resposta ao treinamento físico aeróbio

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Cardiologia

Orientadora: Profa. Dra. Ivani Credidio Trombetta

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Gonçalves Dias

**São Paulo
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lemos Junior, José Ribeiro

Influência da variante Val66Met na expressão do gene *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) em resposta ao treinamento físico aeróbio / José Ribeiro Lemos Junior.
-- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Cardiologia.

Orientadora: Ivani Credidio Trombetta.
Coorientador: Rodrigo Gonçalves Dias.

Descritores: 1.Fator neurotrófico derivado do encéfalo 2.Endotélio 3.Resistência vascular 4.Doenças cardiovasculares 5.Esforço físico 6.Consumo de oxigênio

USP/FM/DBD-394/15

Dedico este trabalho ao maior presente que Deus me deu nesta vida: minha família querida, minha esposa Tânia, meu preto Gabriel e minha filhotinha Isabella. Sinto pelas horas privadas em nosso convívio, que podem ser medidas nas dimensões temporais, mas são incomensuráveis no que concerne a falta que fez não estar rindo com vocês, passeando, brincando ou ajudando-os em seus afazeres.

À minha mãe querida, que me mostrou, desde tenra idade, sobre a importância de estudarmos e sempre acreditou em mim, sempre me incentivou. As vezes em que consegui a ver em Sorocaba desde que comecei esta jornada acadêmica não enchem os dedos de minhas mãos.

Ao meu pai, que sempre exigiu muito de mim e soube me preparar para a vida.

À Polícia Militar do Estado de São Paulo, que, por meio da Academia de Polícia Militar do Barro Branco, me forjou para superar meus limites.

AGRADECIMENTOS

Mesmo soando demagógico, acredito que as maiores recompensas surgidas nesta estrada de estudos foram as pessoas que sempre estiveram ao meu lado, colocadas por Deus em meu caminho para me fazer crescer como pesquisador e como ser humano.

À **Profa. Dra. Ivani Credidio Trombetta**, minha querida orientadora e principal incentivadora acadêmica, acreditou em mim desde o começo, se fez presente sempre que necessitei, esbanjando muita jovialidade e bom humor, me ensinou como aplicar os conhecimentos estatísticos, como fazer um raciocínio crescer e tomar forma, regado pela fundamentação científica, me mostrou a hora de acelerar, a hora de ir devagar, a hora de descontrair (“Push the button”), teve paciência comigo mesmo em meus poucos momentos de descompensação, brincando e me descontraíndo. Trata-se de uma pessoa pela qual tenho a mais profunda admiração e que sempre terá um lugar muito especial em meu coração.

Ao **Prof. Dr. Rodrigo Gonçalves Dias**, por ter sido atencioso e por ter me estimulado a enveredar por este caminho, foi a primeira pessoa que realmente leu o meu projeto e viabilizou sua execução, me acompanhou e me guiou em algumas apresentações de meu pré-projeto, compartilhamos sonhos, sucessos, premiações, frustrações e angústias, mas seguimos continuamente na direção de nossos objetivos.

Ao **Prof. Dr. Cleber Renê Alves**, por ter subido no trem comigo um dia e, na ocasião, me aconselhado a fazer pós-graduações e seguir rumo ao doutoramento, desde então, foi sempre prestativo e “ponta firme”, me guiou em muitos exames, aliquotagens de soro que levaram o dia todo, participou de várias reuniões sobre meu projeto e contribuiu, fundamentalmente, para que nosso estudo prosperasse. Na vida de caserna, temos algumas máximas que nos guiam e nos inspiram, particularmente, admiro 2 delas e as tenho como verdadeiros mantras no comando de tropa: “As palavras convencem... O exemplo arrasta”, “Que as ações confirmem as palavras”. O Dr. Cleber se enquadra em ambas, foi meu exemplo e sempre cumpriu com o que disse que faria, sem ele, nada disso seria possível.

À **Profa. Dra. Silvia Cavasin**, pelos intangíveis ensinamentos, por ter sido uma verdadeira companheira em muitos apertos, por ter me estendido a mão, por ter dado seus famosos “pitacos” em minhas apresentações e em meus textos, por ter contribuído muito para a concretização deste trabalho.

À **Profa. Dra. Júlia Marsiglia**, um doce de pessoa, um ser humano maravilhoso, portadora de um conhecimento inestimável, sacrificou horas de seu descanso comigo na bancada do laboratório para me esclarecer sobre vários processos em genética, me ouviu em momentos de tensão, de agonia, de frustração, por vezes, parou tudo que estava fazendo para tomar um café comigo e me fazer sentir, sem mesmo falar, que tudo vai dar certo.

Ao **Prof. Dr. Edgar Dias**, um verdadeiro poço de conhecimento e serenidade, foi um grande amigo nesta trajetória, vou me lembrar sempre com muito carinho de sua infinita paciência ao me explicar a operacionalização do WINDAQ e de nossa reunião na USP para analisar dados.

Ao **Prof. Dr. Alexandre Costa Pereira**, me lembro como se fosse hoje a primeira vez que te vi realizar uma explanação durante a defesa do então mestrando Cleber, na ocasião, o magnetismo da plateia já me deu claros indicativos da genialidade de quem estava falando, obrigado por ter sido sempre humano comigo, atencioso e ter me ofertado, em várias oportunidades, sugestões que foram decisivas e que acrescentaram muito valor ao nosso trabalho.

À **Profa. Dra. Edilamar Menezes de Oliveira**, por ter sido sempre muito atenciosa e educada, além de receptiva aos meus intentos acadêmicos, disponibilizando seu laboratório para realização de procedimentos essenciais para a consecução deste estudo.

Aos **Prof. Dr. José Eduardo Krieger** e **Carlos Eduardo Negrão**, por terem me recebido em seu laboratório com muita cordialidade, parceria e atenção.

Aos doutorandos **Wladimir Bolani** e **Michelle Sabrina**, sempre prestativos, amigos e solícitos.

*“Fenecerá tua alegria,
ante o pavor dos matagais
Ao perpassar da ventania
quebrando rijos vegetais.
Vê meu irmão, soa a metralha,
Sibilam balas a cantar;
Hei de exultar! Hei de exultar!
Quem na bandeira se agasalha
sente o prazer no seu penar.
É no combate que o infante é forte
vence o perigo; despreza a morte”.*

Refrão da Canção Ardor do Infante.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena, 3ª edição. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviação dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	2
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	7
2.1 O reflexo da frequência cardíaca na saúde	7
2.2 O reflexo dos níveis de VO₂pico na saúde	8
2.3 TF e o endotélio	9
2.4 Sistema nervoso autonômico	10
2.4.1 Variabilidade da frequência cardíaca.....	11
2.4.2 Simpático e parassimpático no coração	12
2.5 Neurotrofinas	13
2.5.1 BDNF e vias de sinalização	14
2.5.2 BDNF e o sistema nervoso	16
2.5.3 BDNF e exercício físico.....	17
2.5.4 BDNF, exercício e função endotelial.....	19
2.5.5 Gene BDNF e a variante Val66Met.....	20
2.5.6 BDNF e sua influência no sistema autonômico.....	22
3 OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo geral	24
3.2 Objetivos específicos	24
4 METODOLOGIA.....	26
4.1 Amostragem	26
4.2 Medidas e procedimentos	27
4.2.1 Extração sanguínea	28
4.2.2 Avaliação da capacidade funcional cardiorrespiratória	28

4.2.3 Determinação do limiar anaeróbio e ponto de compensação respiratória	30
4.2.4 Protocolo de exercício isométrico	31
4.2.5 Protocolo de treinamento físico.....	31
4.2.6 Análise espectral da variabilidade da frequência cardíaca (VFC)	34
4.2.7 Avaliação do fluxo sanguíneo muscular.....	37
4.2.8 Pressão arterial média e FC	38
4.2.9 Dosagem do BDNF e pró-BDNF circulantes.....	39
4.3 Extração do DNA.....	40
4.3.1 Amplificação do DNA e Genotipagem do polimorfismo Val66Met	40
4.3.2 Análise estatística	41
5 RESULTADOS	44
5.1 Resultados gerais da amostra no período pré-TF	44
5.2 Genótipo, composição corporal, características metabólicas e hemodinâmicas por grupos	47
5.3 Efeitos do TF	49
5.3.1 Avaliação da reatividade vascular periférica	52
5.4 Associação entre a razão BDNF/pró-BDNF e reatividade vascular periférica	54
6 DISCUSSÃO.....	58
6.1 Limitações do estudo	63
7 CONCLUSÕES.....	66
8 ANEXOS.....	68
7.1 ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética Médica.....	68
7.2 ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	69
8 REFERÊNCIAS	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Alta frequência
AMP-c	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
ASC	Área sob a curva
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BF	Baixa frequência
BF/AF	Balanco simpato-vagal
BH4	Tetra-hidrobiopterina
Ca	Cálcio
CaMK	Calmodulina
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CO ₂	Dióxido de carbono
CREB	Elemento responsivo da ligação proteica
CVM	Contração voluntária máxima
ECG	Eletrocardiograma
FC	Frequência cardíaca
FSA	Fluxo sanguíneo no antebraço
GSK3 β	Glicogênio-sintase quinase 3 beta
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HDL-c	Lipoproteína colesterol de alta densidade
HG	Handgrip
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMC	Índice de massa corporal
KDa	Quilo Daltons

LA	Limiar anaeróbio
LDL-c	Lipoproteína colesterol de baixa densidade
LOG ₁₀	Logaritmo na base 10
MBF	Componente de muito baixa frequência
Met	Metionina
MET	Equivalente metabólico
mRNA	RNA mensageiro
NGF	Fator de crescimento neural
NO	Óxido nítrico
NT3	Neurotrofina 3
NT4/5	Neurotrofina 4/5
Ntr	Neurotrofina
O ₂	Oxigênio
PAM	Pressão arterial diastólica
PCR	Ponto de compensação respiratória
PetCO ₂	Pressão parcial de gás carbônico no final da expiração
PetO ₂	Pressão parcial de oxigênio no final da expiração
PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinase
PKA	Proteína quinase A
PMESP	Polícia Militar do Estado de São Paulo
pró-BDNF	Precursor do fator neurotrófico derivado do cérebro
RER	Razão de troca respiratória
RMSSD	Diferença da média das raízes quadradas sucessivas entre os batimentos
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RVP	Resistência vascular periférica
SNA	Sistema nervoso autonômico
TECP	Teste de esforço cardiopulmonar
TF	Treinamento físico aeróbio

USP	Universidade de São Paulo
Val	Valina
VE/VCO ₂	Equivalente ventilatório de gás carbônico
VE/VO ₂	Equivalente ventilatório de oxigênio
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
VFC	Variabilidade da frequência cardíaca
VO ₂	Consumo de oxigênio
VO ₂ máx	Máxima capacidade de consumo de oxigênio no exercício
VO ₂ pico	Consumo de oxigênio no pico do exercício

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcento
<	menor que
≥	maior ou igual
>	maior que
±	mais ou menos
≈	aproximadamente
cm	centímetros
kg	quilograma
kg/m ²	quilograma/metro quadrado
mg/dL	miligrama/decilitro
min	minuto
ml	mililitro
ml/kg/min	mililitro por quilogramas por minuto
mmHg	milímetros de mercúrio
ms	milissegundos
ms ²	milissegundos ao quadrado
n	amostra
<i>P</i>	nível descritivo de probabilidade do teste
pg/ml	Picograma por mililitro
s	segundos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Posição do Gene BDNF no cromossomo 11.....	21
Figura 2	Extração sanguínea por meio da venopunção da região antecubital.....	28
Figura 3	A avaliação cardiopulmonar realizada em um sistema computadorizado (<i>Sensor Medics</i> , modelo <i>Vmáx 229</i>), para medida direta	29
Figura 4	Organograma do teste de <i>handgrip</i> ; FSA, fluxo sanguíneo no antebraço; PAM, pressão arterial média; FC, frequência cardíaca	31
Figura 5	Relação nominal com as intensidades de corrida individualizadas, baseando-se nas frequências cardíacas do Limiar Anaeróbio e do Ponto de Compensação Respiratória.....	32
Figura 6	Corrida na pista de atletismo com tempo chuvoso e baixa temperatura.....	33
Figura 7	Corrida na pista de atletismo com sol e calor.....	34
Figura 8	Processo de compensação da FMB.....	35
Figura 9	Correção de artefatos.....	36
Figura 10	Influência da MBF compensada e artefatos corrigidos.....	36
Figura 11	Teste de <i>handgrip</i> concomitante a pletismografia de oclusão venosa no antebraço contralateral	38
Figura 12	Efeito do treinamento físico no VO_{2pico} ; * $P=0,001$ vs. pré	45
Figura 13	Efeitos do treinamento físico na FC de repouso; * $P=0,003$ vs. pré	45
Figura 14	Efeitos do treinamento físico no FSA (ASC); * $P=0,01$ vs. pré.....	46
Figura 15	Efeitos do treinamento físico nas quantidades circulantes de BDNF maduro e pró-BDNF; * $P=0,01$ vs pré.....	46
Figura 16	Fluxograma de distribuição da amostragem	47
Figura 17	Ganhos na aptidão aeróbia representados pelo VO_{2pico} . * $P=0,0001$ vs. pré (Fase na anova para ambos os grupos).....	51

Figura 18	Queda na FCrep após TF. * $P=0,0003$ vs. pré (Fase na anova para ambos os grupos).....	51
Figura 19	Responsividade do FSA (ASC, área sobre a curva da resposta a 3 min de handgrip a 30% da contração voluntária máxima) pré e pós-TF. Interação $P=0,04$; * $P=0,0003$ vs. pré	52
Figura 20	Responsividade da RVP (ASC, área sobre a curva da resposta a 3 min de handgrip à 30% da contração voluntária máxima) pré e pós-TF. Interação $P=0,01$; * $P=0,0001$ vs. pré	53
Figura 21	Comportamento da razão BDNF/pró-BDNF em resposta ao TF. Interação $P=0,001$; * $P=0,0001$ vs. pré; † $P=0,02$ vs. Val66Met.....	54
Figura 22	A: Correlação positiva entre a razão BDNF/pró-BDNF e o FSA (ASC) mediada pelo TF, ($R=0,64$; $P<0,001$). B: Correlação negativa entre razão BDNF/pró-BDNF e RVP (ASC) mediada pelo TF, ($R = -0,58$; $P < 0,001$).	55
Figura 23	Correlação positiva entre o precursor pró-BDNF e o BDNF maduro mediada pelo TF, ($R = 0,43$; $P < 0,001$).....	56
Figura 24	Sugestão da mecanicística molecular protagonizada pelo BDNF, numa suposta alça de retroalimentação positiva, para vasodilatação durante o exercício	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores de consumo máximo de oxigênio (VO_2 máx) de indivíduos sedentários nas diversas faixas etárias e de diferentes grupos de atletas	9
Tabela 2	Características gerais da população estudada (304 indivíduos) nos momentos pré e pós 4 meses de treinamento físico aeróbio	44
Tabela 3	Características gerais da amostra por grupos.....	48
Tabela 4	Características iniciais hemodinâmicas e BDNF por grupos.....	49
Tabela 5	Características hemodinâmicas, autonômicas e BDNF por grupos (pré vs. pós-TF)	50

RESUMO

Lemos Junior JR. *Influência da variante Val66Met na expressão do gene brain-derived neurotrophic factor (BDNF) em resposta ao treinamento físico aeróbio* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2015.

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) tem sido associado com a angiogênese por meio do seu receptor específico tropomiosina quinase B (TrkB). Uma vez que ambos são expressos em células endoteliais vasculares e o treinamento físico aeróbio (TF) pode aumentar os níveis séricos de BDNF, este estudo teve como objetivo testar as hipóteses de que: 1) Os níveis séricos de BDNF modulam o fluxo de sangue periférico; e 2) A presença do alelo Met no polimorfismo BDNF Val66Met prejudica o ganho de vasodilatação por TF. Foram genotipados para o polimorfismo do gene *BDNF* 304 voluntários saudáveis do sexo masculino (Val66Val, n = 221; Val66Met, n = 83) que foram submetidos a intenso TF em uma pista de corrida 3 vezes/semana durante 4 meses. Foram avaliados pré e pós-TF as concentrações circulantes de BDNF e pró-BDNF (ELISA), frequência cardíaca (FC), pressão arterial média (PAM), o fluxo de sangue do antebraço (FSA) e resistência vascular periférica (RVP). No período pré-TF, BDNF, pró-BDNF, a razão BDNF/pró-BDNF, FSA e RVP foram semelhantes entre todos os genótipos. Depois do TF, a capacidade funcional (VO_{2pico}) aumentou e houve a diminuição da FC de repouso de forma semelhante em ambos os grupos. O grupo Val66Val, mas não o Val66Met, aumentou os níveis de BDNF (interação, $p=0,04$) e aumentou a razão BDNF/pró-BDNF (interação, $p<0,001$). Curiosamente, as respostas do FSA (Interação, $p=0,04$) e da RVP (Interação, $p=0,01$), durante o exercício *handgrip*, do grupo Val66Val, apresentou melhoras quando comparado com o grupo Val66Met, mesmo com respostas similares de FC e PAM. Outras análises mostraram associação entre a razão BDNF/pró-BDNF e FSA ($R=0,64$; $p<0,001$) e RVP ($R=-0,58$; $p<0,001$). Estes resultados mostram que, em resposta ao TF, tanto a reatividade vascular periférica quanto o BDNF circulante são prejudicados pela presença do polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* e esta responsividade está associada às concentrações de BDNF sérico em indivíduos saudáveis.

Descritores: Polimorfismo BDNF Val66Met; Treinamento físico; Reatividade vascular.

ABSTRACT

Lemos Junior JR. *Influence of Val66Met variant on brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene expression in response to exercise training* [These]. São Paulo: "Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo"; 2015.

The neurotrophin Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has been associated with angiogenesis through its specific receptor tropomyosin-related kinase B (TrkB). Since both are expressed in vascular endothelial cells and aerobic training (ET) can increase serum BDNF levels, this study aimed to test the hypotheses that: 1) Serum BDNF levels modulate peripheral blood flow; and 2) The presence of the allele Met in the BDNF Val66Met polymorphism impairs vasodilation gain by ET. We genotyped for BDNF polymorphism 304 healthy male volunteers (Val66Val, n= 221; Val66Met, n=83) which underwent to intense aerobic ET on a running track 3 times/week for 4 months. We evaluated pre and post ET serum BDNF and proBDNF concentration (ELISA), heart rate (HR), mean blood pressure (MBP), forearm blood flow (FBF) and forearm vascular resistance (FVR). In the pre ET, BDNF, proBDNF, BDNF/proBDNF ratio, FBF and FVR were similar between all genotypes. After ET, functional capacity (VO_{2peak}) increased and HR decreased similarly in both groups. Val66Val, but not Val66Met, increased BDNF (Interaction, p= 0.04) and BDNF/proBDNF ratio (Interaction, p<0.001). Interestingly, FBF (Interaction, p=0.04) and the FVR (Interaction, p=0.01) responses during handgrip exercise improved in Val66Val compared with Val66Met, even with similar responses of HR and MBP. Further analyses showed association between BDNF/proBDNF ratio and FBF (R=0.64, p<0.001) and FVR (R=-0.56, p<0.001). These results show that peripheral vascular reactivity and serum BDNF responses to ET are impaired by the BDNF Val66Met polymorphism and such responsiveness is associated to the serum BDNF concentrations in healthy subjects.

Descriptors: BDNF Val66Met polymorphism; Exercise training; Vascular reactivity.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares constituem uma importante causa de morte nos países desenvolvidos e também naqueles em desenvolvimento, e seu crescimento significativo alerta para o profundo impacto desta questão nas classes menos favorecidas e para a necessidade de intervenções eficazes, de baixo custo e de caráter preventivo¹. Dados do IBGE indicam que as doenças cardiovasculares são a principal causa de morte natural no Brasil, refletindo um problema que afeta a sociedade mundial². A crescente incidência das doenças cardiovasculares no último século originou uma busca pelos fatores de risco e mecanismos fisiopatológicos, relacionados ao seu desenvolvimento. Ainda que a genética e a idade tenham grande importância nessa evolução, grande parte dos outros fatores de risco pode ser influenciada por modificações no estilo de vida, de forma a reduzir os eventos cardiovasculares e aumentar a sobrevida em pacientes portadores de coronariopatias³.

Estudo sobre a mortalidade de policiais militares do Estado de São Paulo⁴, ao tratar da mortalidade decorrente de causas definidas não violentas, menciona que predominam, em ordem decrescente de incidência, doenças do aparelho circulatório, neoplasias, doenças do aparelho digestivo, e algumas doenças infecciosas e parasitárias. Ao detalhar a mortalidade decorrente de doenças do aparelho circulatório, a partir da análise etária, foi constatado neste mesmo estudo que os soldados da PMESP, entre os 20 e 44 anos, apresentam cerca de metade das taxas de mortalidade da população paulista masculina de faixa etária correspondente. Entretanto, em idades mais avançadas, entre 45 e 54 anos, as taxas específicas de doenças de aparelho circulatório em soldados são muito mais elevadas que as encontradas na população paulista, sendo 3,5 vezes maior na faixa etária de 45 a 49 e 2,9 vezes maiores na faixa etária entre 50 e 54 anos.

Estes números alarmantes nos indicam que, após os 45 anos de idade, os soldados da PMESP têm um declínio repentino e agudo da saúde, no que concerne ao funcionamento íntegro do aparelho circulatório, fato que é refletido no aumento abrupto e significativo da taxa de mortalidade de nosso efetivo, ultrapassando, inclusive, as taxas de mortalidade da população paulista. O mesmo estudo aponta que a taxa ajustada de mortalidade por doenças cardiovasculares nos Soldados (168,2 mortes por 100 mil policiais militares) foi duas vezes maior do que a da população paulista masculina.

A etiologia principal das doenças cardiovasculares é a aterosclerose, enfermidade que se caracteriza pelo acúmulo de lipoproteínas de baixa densidade oxidadas e redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO – “Nitric Oxide”) na parede dos vasos sanguíneos⁵. O NO é o principal responsável pela regulação do diâmetro dos vasos sanguíneos e é liberado pelas células endoteliais, cuja produção é influenciada por mediadores endócrinos tais como a acetilcolina, estímulos mecânicos como a força de cisalhamento (ou “shear stress”) e disponibilidade do precursor do NO, a L-arginina. Diferentes doenças cardiovasculares, como hipertensão arterial, doença arterial coronariana e insuficiência cardíaca crônica, estão associadas com prejuízos na vasomotricidade e, por conseguinte, no fluxo sanguíneo⁶. Diversos fatores têm sido associados com a modulação do fluxo sanguíneo endotélio dependente, tais como a biodisponibilidade de L-arginina, de tetraidrobiopterina (BH4), índices de LDL-colesterol e VEGF, entre outros⁵.

Embora a proteína BDNF (“brain-derived neurotrophic factor”), um fator neurotrófico derivado do cérebro, tem sido relacionada com a saúde dos neurônios⁷, estudo recente demonstrou sua relação com o sistema vascular, especificamente com a angiogênese, por meio da regulação por espécies reativas de oxigênio (ROS)⁸. O BDNF é uma molécula encontrada em altas concentrações no hipocampo e córtex cerebral, tendo papel fundamental na formação de memória e proliferação celular de neurônios⁹. Enquanto o BDNF promove sobrevivência neuronal e realça a plasticidade sináptica pela ativação de seu receptor tirosina quinase B (TrkB), seu predecessor pró-

BDNF atua de maneira antagônica, resultando em apoptose celular ao interagir com o receptor p75 das neurotrofinas (p75NTR). Essa importante função demonstra que ambos estão envolvidos em diferentes funções fisiológicas^{10,11}.

Considerando o fato de que o gene *BDNF* e seu receptor TrkB são expressos em diversos tecidos e órgãos, tais como cérebro, coração, pulmões e tecido endotelial¹¹⁻¹³, é provável que o BDNF esteja implicado na saúde de outros tecidos além do tecido neuronal. Especificamente no endotélio, além da ligação do BDNF com seu receptor de alta afinidade TrkB^{10,14}, há, também, a expressão do receptor p75, cuja ligação com o pró-BDNF tem sido relacionada com apoptose de músculos lisos vasculares^{15,16}. Esta localização conjugada do BDNF-TrkB e pró-BDNF-p75 no endotélio demonstra que a análise da razão BDNF/pró-BDNF poderia se constituir numa estratégia importante para avaliarmos se o equilíbrio entre plasticidade/sobrevivência e apoptose teria influência sobre o fluxo sanguíneo periférico. Devido à atuação fisiológica antagônica existente entre o BDNF e pró-BDNF, alguns pesquisadores também optaram em realizar estudos sob o prisma da razão BDNF/pró-BDNF, em níveis de agressividade¹⁷, disordem bipolar e depressão¹⁸.

Atualmente, tem sido alvo de interesse científico uma variante do gene *BDNF* em humanos, designada comumente como Val66Met, que ocorre em 20-30% da população caucasiana¹⁹⁻²². Val66Met é um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) responsável pela substituição do aminoácido Valina, na posição 66 do códon, por uma Metionina, fenômeno conhecido por resultar numa resposta diminuída da produção da proteína BDNF²⁴. Tem sido reportado que indivíduos Met66Met e Val66Met têm menor suporte neurotrófico de BDNF para plasticidade, como também prejuízos no tráfego intracelular e na secreção regulada em neurônios, enquanto que indivíduos Val66Val experimentam o inverso^{22,24}. Juntos, estes fatores resultam em menos BDNF produzido pelo sistema nervoso central (SNC) e quantidades circulantes diminuídas desta neurotrofina em indivíduos Met66Met e Val66Met²². Portanto, o polimorfismo Val66Met pode afetar as

concentrações séricas de BDNF e, conseqüentemente, influenciar a atividade dos tecidos que contenham os receptores TrkB, sejam eles neurônios ou mesmo tecidos periféricos, como as células endoteliais vasculares.

Estudos prévios têm demonstrado consistentemente que o treinamento físico aeróbio (TF) aumenta as quantidades de BDNF circulante^{25,26}. Da mesma forma, já está bem estabelecido na literatura científica que o TF melhora a vasodilatação endotélio-dependente²⁷, primariamente, pela estimulação proveniente da força de cisalhamento¹² e por outros mecanismos, tais como o aumento de acetilcolina²⁸ e de catecolaminas circulantes²⁹. Todavia, dentre a multiplicidade de fatores genéticos que podem interferir nestes fenótipos, não é conhecido se os níveis séricos de BDNF modulam o fluxo de sangue periférico e se a presença do alelo Met prejudica o ganho de vasodilatação obtido pelo TF.

Pelo nosso conhecimento, até o presente momento, não há estudo clínico ou prospectivo que tenha examinado os efeitos do TF sobre os níveis de BDNF e pró-BDNF. Além disso, não é sabido se a resposta BDNF/pró-BDNF ao TF poderia impactar na reatividade vascular periférica em humanos. Deste modo, este trabalho tem por objetivo estudar se os níveis circulantes de BDNF, sob o prisma da razão BDNF/pró-BDNF, podem modular o fluxo sanguíneo periférico e se a presença do alelo Met, do polimorfismo Val66Met do gene *BDNF*, pode prejudicar eventuais adaptações na vasodilatação periférica, em resposta ao TF.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O reflexo da frequência cardíaca na saúde

A frequência cardíaca (FC) é considerada um dos sinais vitais mais importantes do organismo. por causa de sua relevância, está presente na maioria dos exames que envolvem o TF, pois a análise das suas ondulações é importante no diagnóstico de possíveis doenças coronarianas e estado geral de saúde do indivíduo³⁰. A FC de repouso é utilizada como referência para condição funcional do organismo. A FC de repouso e a FC máxima (predita, máxima atingida no teste ergométrico ou máxima atingida ergoespirométrico) são utilizadas para o cálculo das faixas de intensidade durante o TF. Os baixos valores da FC de repouso refletem uma boa condição funcional, e o contrário disso pode indicar distúrbios fisiológicos e doenças cardiovasculares³¹.

Uma baixa FC oferece ao organismo uma proteção cardiovascular enquanto que uma elevada FC de repouso está correlacionada com mortalidade por doenças cardiovasculares e é considerada como fator de risco independente para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, assim como o são o tabagismo, a hipertensão e a dislipidemia³². Um recente trabalho apontou que jovens brasileiros do sexo masculino com FC de repouso acima de 80 bpm apresentaram, pelo menos, 04 fatores de risco (hipertensão, obesidade abdominal, sedentarismo e sobrepeso) para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares³³. Estudos fisiopatológicos indicam que uma alta FC de repouso tem efeitos deletérios no sistema cardiovascular, que resultam em isquemia miocárdica, arritmias ventriculares estão associadas com disfunção endotelial e progressão da arteriosclerose³⁴.

2.2 O reflexo dos níveis de VO_2 pico na saúde

Quando o ser humano se movimenta, seja de forma recreacional, ação esta atualmente caracterizada como atividade física, ou de forma sistematizada e planejada para alcançar determinadas intensidades de esforço durante períodos de tempo específicos, ação denominada exercício físico, é provocado um aumento no metabolismo energético para suprir a demanda do sistema cardiovascular.

A aptidão aeróbia depende dos componentes pulmonares, cardiovasculares, dos componentes hematológicos do fornecimento de oxigênio e dos mecanismos oxidativos do músculo em exercício. O consumo máximo de oxigênio (VO_2 máx), a taxa mais alta de oxigênio que um indivíduo consegue consumir durante o TF, é amplamente reconhecida como a melhor medida da aptidão aeróbia³⁵.

O Teste Ergoespirométrico ou Teste de Esforço Cardiopulmonar Máximo ou (TECP), teste constantemente utilizado na prática clínica, é um instrumento simples que possibilita, por meio da avaliação da atuação hemodinâmica, ventilatória e metabólica, verificar com antecedência o risco cardiovascular em diversas condições de saúde³⁶. Dentre os principais indicadores obtidos no TECP e com potencial valor da aptidão aeróbia, podemos citar a avaliação da capacidade funcional, por meio da determinação do consumo máximo de oxigênio (VO_2 pico), determinado no pico do esforço³⁷. A capacidade funcional representa o ajuste do débito cardíaco para atender a crescente demanda metabólica durante o exercício³⁶.

Uma vistosa pesquisa em modelo longitudinal prospectivo mostrou que há um aumento de 12% na sobrevida de homens adultos, para cada 1 unidade metabólica (MET) adicional no VO_2 pico medida no TECP³⁸. Ainda neste segmento, outros estudos têm indicado que a aptidão aeróbia está inversamente relacionada com a mortalidade por qualquer causa^{39,40}. O treinamento de endurance melhora a aptidão aeróbia e pode prevenir o desenvolvimento de doença arterial coronária, pois este tipo de atividade

melhora a capacidade funcional pelo aumento no transporte de oxigênio e sua utilização pelos músculos esqueléticos, o que irá resultar numa alteração no metabolismo das lipoproteínas, na coagulação sanguínea e na atividade fibrinolítica⁴¹, portanto, quanto maior o VO_2 pico, menor o risco de morte por doenças, sejam cardiovasculares ou por outras enfermidades.

A Tabela 1 mostra como são os valores de VO_2 máx (aptidão aeróbia) de pessoas de diversas faixas etárias, segundo sua condição sedentária ou ativa, conforme diferentes modalidades esportivas. Podemos observar que existe uma menor capacidade aeróbia por parte das pessoas sedentárias⁴².

Tabela 1 - Valores de consumo máximo de oxigênio (VO_2 máx) de indivíduos sedentários nas diversas faixas etárias e de diferentes grupos de atletas

Grupo ou Esporte	Idade (anos)	VO_2 máx (ml/kg/min)	
		Homens	Mulheres
Sedentários	10-19	47-56	38-46
	20-29	43-52	33-42
	30-39	38-49	30-38
	40-49	36-44	20-35
	50-59	34-41	24-33
	60-69	28-35	20-27
Fisiculturismo	20-30	38-52	----
Corrida	18-35	60-85	50-75
Natação	15-25	50-70	40-60
Ciclismo	18-26	62-74	47-75
Futebol	20-32	42-60	40-53

Adaptado de Denadai, 1995⁴²

2.3 TF e o endotélio

O exercício físico desencadeia uma série de adaptações fisiológicas, caracterizadas por uma sequência de ajustes hemodinâmicos para suprir as necessidades metabólicas dos tecidos em atividade. Dentro deste quadro, as alterações ocorridas nos vasos sanguíneos resultantes do aumento do débito cardíaco incluem vasoconstrição em regiões não envolvidas no

exercício em conjunto com uma vigorosa vasodilatação dos vasos sanguíneos na musculatura esquelética⁵. Estímulos simpáticos geradores de vasoconstrição são atuantes na resistência vascular periférica como um todo, entretanto, na musculatura em atividade durante a prática de TF, tais mecanismos vasoconstritores são sobrepujados pelas ações vasodilatadoras locais endotélio-dependentes, com isso, ocorre o aumento do fluxo sanguíneo somente nos tecidos com maior demanda metabólica⁵.

A prática de TF é conhecida por provocar uma melhora da reatividade vascular periférica pelo consequente aumento do fluxo sanguíneo durante o exercício⁴³, resultante, principalmente, do aumento da produção de NO⁴⁴ e da resposta vasodilatadora endotelial no músculo⁴⁵, a qual tem sido positivamente correlacionada com o VO₂pico⁴⁶, sugerindo, assim, uma relação entre a capacidade vasodilatadora e a capacidade funcional.

2.4 Sistema nervoso autonômico

O sistema nervoso autonômico tem componentes simpáticos e parassimpáticos. A estimulação simpática ocorrendo em resposta ao estresse exercício e à doença cardíaca causa um aumento na FC resultante do aumento da frequência de disparos das células marca-passo no nódo sinoatrial cardíaco. A atividade parassimpática primariamente resulta da função de órgãos internos, trauma, reações alérgicas e inalação de irritantes, além de diminuir a frequência de disparos das células marca-passo, por conseguinte da FC, promovendo, assim, um equilíbrio regulatório na função autonômica fisiológica⁴⁷.

Diferentes mecanismos operam para ajustar a FC nos distintos momentos do TF. No início do exercício, ocorre uma inibição ou “retirada” vagal com o concomitante e progressivo aumento da entrada modulatória simpática proveniente da liberação de noradrenalina nas terminações nervosas e adrenalina na circulação, vinda das suprarrenais. Essas catecolaminas irão se ligar aos receptores adrenérgicos em todo o

organismo⁴⁸. No tecido muscular cardíaco, a ligação com os receptores do tipo β_1 resulta no aumento da FC, facilitando a condução atrioventricular, aumentando a força da contratilidade atrial e ventricular. Nas paredes dos vasos sanguíneos, a ligação da noradrenalina com os receptores do tipo α_1 e α_2 -adrenérgicos provoca vasoconstrição, levando à redução da capacitância venosa e ao aumento do retorno venoso, aumentando, assim, a pressão arterial sistólica⁴⁹.

Essa ativação simpática aumenta juntamente com o aumento da intensidade durante o esforço, que reflete o aumento da necessidade metabólica do corpo em exercício de forma progressiva, atingindo seu máximo no pico do esforço⁴⁹.

2.4.1 Variabilidade da frequência cardíaca

Pela facilidade de mensuração, o comportamento FC tem sido bastante estudado durante diferentes tipos e condições associadas ao TF. A FC é controlada primariamente pela atividade direta do sistema nervoso autônomo (SNA), por meio de seus ramos simpático e parassimpático sobre a autorritmicidade do nódulo sinusal, com predominância da atividade vagal (parassimpática) em repouso, que é progressivamente inibida com o exercício, e simpática intensificada pelo incremento da intensidade do esforço.

A Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC) é um reflexo confiável de muitos fatores fisiológicos modulando o ritmo normal do coração. De fato, eles provêm um meio poderoso de observação da interface entre os sistemas nervoso simpático e parassimpático. Isso mostra que a estrutura geradora do sinal não é completamente linear, mas também envolve contribuições não lineares. FC é um sinal não estacionário e sua avaliação pode conter indicadores de doenças atuais ou avisos sobre doenças cardíacas iminentes. Os indicadores podem estar presentes a todo momento ou podem ocorrer aleatoriamente, durante certos intervalos do dia⁵⁰.

As diretrizes sobre os padrões de mensuração, interpretação fisiológica e uso clínico da VFC, publicados pela força tarefa da Sociedade Europeia de Cardiologia em conjunto com Sociedade Norte Americana de Ritmicidade e Eletrofisiologia, publicadas no *Jornal Europeu do Coração*⁵¹, afirmam, desde 1996, que a VFC versa sobre os intervalos entre os batimentos, mais precisamente, entre os intervalos R-R, analisando, neste contexto, duas variáveis principais, o fator tempo, correlacionando os milissegundos entre tais intervalos R-R; e o fator frequência, decompondo as influências da alta frequência, baixa frequência e muito baixa frequência. Desta forma, tais informações indicam o grau de influência do parassimpático (alta frequência) e do simpático (razão baixa frequência/alta frequência). As contribuições rítmicas separadas das atividades simpáticas e parassimpáticas modulam a FC de intervalos R-R no complexo QRS do eletrocardiograma (ECG) em frequências distintas. A atividade simpática está associada com a escala de baixa frequência (0,04-0,15Hz), enquanto que atividade parassimpática está associada com a escala de alta frequência (0,15-0,4Hz) na frequência de modulação do coração. Esta diferença na frequência das escalas permite que a análise da VFC verifique separadamente as contribuições evidentes do simpático e parassimpático⁵¹.

2.4.2 Simpático e parassimpático no coração

O funcionamento do coração depende da atuação conjunta de uma série de estruturas⁵², que, muitas vezes, compreende fatores que podem funcionar antagonicamente, como a acetilcolina, neurotransmissor ligante do sistema parassimpático, atuante nos processos relativos à desaceleração cardíaca e a adrenalina, ligante do sistema simpático e atua nos processos de aceleração cardíaca⁵³.

Ao se analisar a influência sobre o marca-passo do nó sinoatrial, nota-se que a ação da acetilcolina tem predominância sobre a ação da adrenalina, devido ao fato de que a acetilcolina atenua o aumento nas

concentrações intracelulares de adenosina monofosfato cíclico (AMP-c), inibindo, assim, os efeitos da estimulação dos receptores β -adrenérgicos⁵⁴. Uma substância aumenta os batimentos cardíacos enquanto a outra diminui e ambas são igualmente importantes para a saúde cardíaca, sendo que sua modulação se torna importante para a nossa saúde no dia a dia.

A interação entre o sistema nervoso simpático e parassimpático cardíaco pode ser avaliada por meio da análise do ritmo cardiovascular com apropriadas metodologias espectrais⁵¹.

Neste panorama, é importante destacar o papel das neurotrofinas, caracterizadas como proteínas atuantes na saúde dos neurônios, central e periféricamente, além do que uma delas particularmente, o BDNF, tem sido relacionada à saúde cardíaca⁵⁵. Ansiedade, por exemplo, é um conhecido fator de risco para morbidade cardiovascular com disfunção autonômica. Um corpo emergente de pesquisadores tem demonstrado que desordens de ansiedade, particularmente doença do pânico, desordens de ansiedade generalizadas e estresse pós-traumático estão associados com reduzida modulação vagal e atividade simpática aumentada. Apesar do papel específico do BDNF na fisiopatologia da ansiedade permanecer obscuro, as associações entre ansiedade e disfunção autonômica sugerem que esta neurotrofina tem um papel importante no sistema autonômico⁵⁵. Portanto, será capitulado a partir daqui, sequencialmente, o que são neurotrofinas e sua atuação na saúde cardíaca e cerebral, com ênfase ao BDNF e suas peculiaridades genéticas.

2.5 Neurotrofinas

Os fatores neurotróficos compõem duas principais famílias: a das neurotrofinas e a do fator neurotrófico derivado da glia, cujos componentes podem atuar de forma isolada ou conjuntamente nos processos de regeneração de fibras nervosas lesadas. A família das neurotrofinas compreende peptídeos com grande homologia estrutural sintetizados

inicialmente como pró-neurotrofinas. Estas são clivadas para a formação de proteínas biologicamente ativas, apresentando-se, então, como homodímeros covalentes. Os principais componentes da família das neurotrofinas são: o fator neurotrófico derivado do cérebro, BDNF⁵⁷; o fator de crescimento neural, NGF⁵⁷; a NT-3⁵⁸ e a NT-4/5⁵⁹.

Neurotrofinas ou fatores tróficos são polipetídeos que, por meio de receptores específicos, agem no desenvolvimento, na sobrevivência e na manutenção dos neurônios. O primeiro fator neurotrófico descoberto foi o BDNF, que foi isolado pela primeira vez oriundo do cérebro de porcos, sendo o mais abundante da família dos fatores que provocam o crescimento nervoso⁶⁰.

Diversas linhas de pesquisa têm relacionado a biodisponibilidade deste neurotrófico com resultados benéficos à saúde, constituindo-se em um polipeptídeo fundamental para o desenvolvimento do sistema nervoso. É responsável por importantes funções no cérebro adulto, relacionando-se com o desenvolvimento, a sobrevivência e a diferenciação neuronal⁶¹. O BDNF exerce ações neuroprotetoras em doenças neurodegenerativas, vários estudos têm mostrado uma possível associação entre baixos níveis de BDNF e neuropatologias como a depressão, a esquizofrenia, o mal de Alzheimer e a esclerose múltipla⁶².

2.5.1 BDNF e vias de sinalização

As neurotrofinas exercem seus efeitos por meio de receptores do tipo Tirosina Quinase, existem 3 categorias destes receptores: trk A, trk B e trk C. Cada um deles apresenta uma maior afinidade para substâncias distintas, sendo que o BDNF se liga ao receptor trk B. Todas as neurotrofinas podem se ligar a receptores p75, entretanto, a afinidade é menor⁶³.

Após estar ligado ao receptor trk B, o BDNF desencadeia uma cascata de reações associadas com outros sinais moleculares, tais como o PI3K, AMPc, CREB, Sinapsina I e CaMK II⁶⁴.

PI3K ou fosfatidilinositol 3 quinase é um dos principais sinais moleculares ativados após a ligação do BDNF ao seu receptor trk B, sua ação inibe as atividades da proteína GSK3-b (*glycogen synthase kinase 3*) parte dos efeitos protetores das neurotrofinas decorre desta inibição, resultando numa maior atividade de outros sinais moleculares como o AMPc, CREB e maior biodisponibilidade de Ca⁺⁺ intracelular⁶⁵.

O AMPc ou adenosina monofosfato cíclica trata-se de um importante segundo mensageiro tendo como uma de suas principais funções a ativação de uma outra enzima, a PKA, que é uma enzima quinase dependente da AMPc, a qual integra as alterações rápidas da neurotransmissão em mudanças neurobiológicas de longa duração⁶⁶.

A CREB ou elemento responsivo da ligação proteica também está sob a ação regulatória do BDNF e foi o que melhor descreveu os estímulos induzidos nos fatores de transcrição, envolvidos na responsividade adaptativa e memória em longo prazo. Os níveis de (CREB) mRNA aumentam em proporção aos níveis de (BDNF) mRNA, com maior expressividade no sistema nervoso central⁶⁷. A CREB é uma proteína que se localiza no núcleo da célula, usualmente na forma inativa, sendo ativada por uma série de proteínas quinases, como a PKA, a MAPK ou CaMK. Após ativada, a CREB promove a produção de RNAm ao ligar-se a um determinado sítio na região promotora de genes-alvo, com a formação de proteínas que podem alterar permanentemente a estrutura ou funções em regiões específicas do cérebro⁶⁸.

Sinapsina I é uma vesícula fosfoproteica de quem a síntese e fosforilação são regulados pelo BDNF, ela contribui para a plasticidade sináptica modulando o transmissor de liberação e prolongamento axonal, constituindo-se em um modulador sináptico da ação do BDNF, com ação preponderante no sistema nervoso periférico^{69,70}.

CaMK II ou calciomodulina ativada proteína quinase II tem uma conexão bem estabelecida com o sistema BDNF, podendo ter relação direta na expressão do neurotrófico e CREB, com isso, pode impactar a memória e a aprendizagem. A CaMK II tem sido descrita como interruptor molecular da

memória e também está sob controle regulatório do BDNF, atuando no sistema nervoso central⁷¹.

A variação dos níveis de Ca⁺⁺ intracelular modula a plasticidade sináptica, a sobrevivência e morte celular. De fato, a sinalização de Ca⁺⁺ interage com diversas outras cascatas de sinalização, incluindo as vias do AMPc e PI3K. Além disso, o cálcio pode interagir com outras proteínas regulatórias, como a calmodulina, formando complexos que modulam a atividade de outras proteínas importantes, incluindo as proteínas quinases dependentes de (CaMKs) cálcio-calmodulina⁷².

2.5.2 BDNF e o sistema nervoso

O BDNF é descrito como a neurotrofina mais abundante no sistema nervoso central, tanto com relação à quantidade quanto à distribuição, sendo seus mais altos níveis encontrados no hipocampo, cerebelo e córtex. Também atua como modulador da plasticidade sináptica, nos processos de crescimento, diferenciação e sobrevivência das células do sistema nervoso, na produção de neurotransmissores ao regular excitabilidade neuronal. O BDNF é produzido pré-sinápticamente nos corpos celulares dos neurônios sensoriais projetados no corno dorsal, enquanto que no hipocampo é produzido predominantemente pelos dendritos pós-sinápticos⁷³.

Na periferia, o BDNF sérico é encontrado nas plaquetas do plasma sanguíneo e é formado pelas células do endotélio vascular e pelas células sanguíneas mononucleadas periféricas. Apesar do tamanho da proteína, 27kDA, o BDNF pode atravessar livremente a barreira hemato-encefálica em ambas as direções, tanto do cérebro para a periferia quanto da periferia para o cérebro, via alta capacidade de saturação do sistema transportador⁷⁴.

No sistema nervoso periférico, o BDNF ainda apresenta um papel adicional, atuando na regeneração axonal. O sistema nervoso periférico apresenta condições favoráveis à regeneração, existe a presença da matriz extracelular, que constitui um fator significativo no processo de regeneração

de fibras nervosas periféricas. Células-alvo de neurônios, além de células de schwann, fibroblastos e macrófagos podem constituir suporte trófico. Diversos fatores expressos por estas células são importantes no processo regenerativo, com atividades estimuladoras e inibidoras⁷⁵.

BDNF e outros fatores tróficos podem ter um papel na prevenção de morte neuronal ao atuar na neuroregeneração. Isso promove o desenvolvimento de neurônios imaturos e realça sua sobrevivência em adultos. Sua presença parece necessária aos potenciais de longa duração apropriados, pois animais com uma deleção genética ao gene do BDNF falham ao experi-lo, entretanto, quando houve aplicação de BDNF exógeno, os potenciais de longa duração foram restaurados⁷⁶.

2.5.3 BDNF e exercício físico

Segundo Cotman e Berchold⁶², o exercício físico aumenta a circulação sanguínea cerebral, favorecendo a síntese de BDNF, aumentando seus níveis, estimulando, assim, a neurogênese, o aumento da resistência aos insultos cerebrais, e melhoria no aprendizado e no desempenho mental. Aliado a estes fatos, o TF é reconhecido por aumentar as moléculas-chave envolvidas na sinalização do BDNF, beneficiar a neuroplasticidade, além de aumentar a expressão do neurotrófico. Houve estudos experimentais em que foram investigados potenciais mecanismos pelos quais os exercícios podem promover mudanças na plasticidade neuronal, via modulação de neurotrofinas.

Roedores foram expostos à roda de correr voluntária de 3 a 7 dias, após o que suas medulas espinhais lombares e músculo sóleo foram avaliados para mudanças no BDNF, além disso, foram analisados os sinais de transdução trk B e efeitos decorrentes da ação do BDNF na plasticidade sináptica. Na ocasião, Gomez-Pinilla⁶⁷, ao dosar tanto o BDNF circulante quanto o cerebral, constatou que houve um aumento da produção do BDNF e seus canais de ligação Sinapsina I, AMPc e CREB.

Em humanos, os níveis séricos de BDNF foram significativamente elevados em resposta ao exercício. Um aumento observado durante o teste de exaustão na rampa foi correlacionado com a intensidade do exercício⁷⁷.

Em uma pesquisa em humanos envolvendo 16 pessoas oriundas da China, sendo 8 homens e 8 mulheres sem histórico de doenças psiquiátricas ou neurológicas, com idade entre 19 e 30 anos, os indivíduos realizaram um protocolo de exercícios de “*step*”, com duração de 15 minutos, sendo que o BDNF circulante foi dosado logo após o término do exercício, e após 25 e 50 minutos. Interessantemente, foi constatado um aumento significativo do neurotrófico durante os 3 períodos⁷⁸.

Castellano⁷⁹ realizou estudo envolvendo 22 pessoas, submetendo-as a um protocolo de exercícios aeróbios a 60% do VO₂máx, 3 vezes por semana durante 8 semanas. O grupo era constituído por 11 pessoas com esclerose múltipla e 11 pessoas saudáveis. O sangue dos participantes foi analisado antes dos exercícios, 30 minutos, 60 minutos e 90 minutos após. No estudo, foi dosado o BDNF circulante antes do início do protocolo, 4 semanas e 8 semanas após. Com 4 semanas de treinamento, o grupo com esclerose múltipla apresentou aumentos substanciais de BDNF, superando inclusive o aumento apresentado pelos indivíduos saudáveis. Após a oitava semana, ambos os grupos apresentaram um aumento significativo da proteína dosada, entretanto, o grupo saudável apresentou índices mais elevados.

Em 2003, Gold⁸⁰ já havia realizado um estudo similar, entretanto, após dosar o BDNF circulante, encontrou um aumento igual em todos os grupos.

Em 2006, Vega⁸¹ estudou os efeitos do exercício na dosagem do BDNF circulante. Oito atletas do sexo masculino foram submetidos a um protocolo de exercícios aeróbios, em teste incremental de rampa até a exaustão, durante 1 dia. Foi constatado um aumento significativo do BDNF durante o teste, enquanto os atletas estavam se esforçando, entretanto, 10 minutos após o início do teste, os níveis praticamente tinham regredido até o nível anterior ao exercício.

Os efeitos do treinamento de *endurance* e treinamento de força sobre os níveis de BDNF foram estudados por Schiffer⁸², em que 27 jovens saudáveis foram divididos em 3 grupos, compostos por 9 indivíduos cada: grupo controle, grupo força e grupo *endurance*. O protocolo consistiu de treinamento 3 vezes por semana nos grupos *endurance* e treinamento de força, durante 12 semanas. Entretanto, ao final, o BDNF circulante foi dosado e não houve alterações significativas em nenhum dos grupos.

2.5.4 BDNF, exercício e função endotelial

Neste momento, faz-se necessário analisar duas questões apresentadas anteriormente. A primeira é a de que parte do BDNF sérico é significativamente produzido pelas células endoteliais⁸³, a segunda questão é a de que o BDNF tem livre passagem pela barreira hemato-encefálica, tanto da periferia para o cérebro quanto do cérebro para a periferia⁸⁴. É sabido que o TF está relacionado com o aumento das células endoteliais²⁷.

O exercício físico aeróbio promove efeitos benéficos à saúde, dentre eles, a melhora da função endotelial, a qual está associada a uma maior biodisponibilidade de Óxido Nítrico²⁷. Alguns estudos têm examinado os efeitos do exercício nas mudanças morfológicas dentro do endotélio, tais como o aumento da área capilar luminal e do número de vesículas do plasma⁸⁵. O Óxido Nítrico, que atua como um potente dilatador da musculatura lisa dos vasos, é sintetizado e liberado pelo endotélio por estímulos como a tensão de cisalhamento, causada pelo aumento do fluxo sanguíneo, o que vai determinar um aumento na luz dos vasos⁸⁶.

Sinais físicos e químicos estimulam a resposta endotelial, os exercícios aumentam a FC durante o treinamento, o sangue entra em atrito com os vasos mais acentuadamente, causando o estresse de cisalhamento, chamado de "*shear stress*", que é um importante estimulador da produção de Óxido Nítrico pelo endotélio, estimulando, assim, a vasodilatação⁸⁷. Quando uma pressão é aplicada sobre um fluido, as camadas de moléculas

deslizam umas sobre as outras e isso é chamado de cisalhamento, a força que faz com que as camadas deslizem umas sobre as outras é chamada de tensão, ou estresse de cisalhamento⁸⁸.

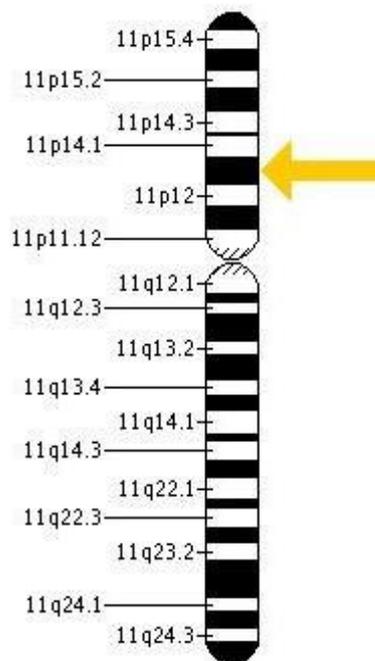
Estes fatos nos levam a crer na possibilidade de que o acréscimo de células endoteliais provocado pelo TF pode resultar no aumento do BDNF sérico, o qual tem livre passagem pela barreira hemato-encefálica, beneficiando, então, tanto o sistema nervoso periférico quanto o sistema nervoso central.

2.5.5 Gene BDNF e a variante Val66Met

O BDNF é produzido pelo gene BDNF, localizado no braço curto (p) do cromossomo 11 (11p13), um polimorfismo genético caracterizado como funcional, em que ocorre a troca do aminoácido Valina por uma Metionina no códon 66 da proteína codificada pelo gene. O polimorfismo Val66Met tem sido largamente estudado.

Em humanos caucasonoides, estima-se que, de 20 a 30%, apresentem o genótipo heterozigoto (Val66Met), enquanto apenas de 2 a 3% apresentam o genótipo homozigoto (Met66Met), o que dificulta os estudos desta variante²⁰.

Sujeitos portadores do genótipo Val66Met apresentam respostas deficitárias a estímulos de aprendizagem, quando comparados com os portadores do genótipo Val66Val⁸⁹. O polimorfismo Val66Met está relacionado com memória episódica empobrecida, baixa produção de BDNF.



Fonte: *National Center of Biological Information (NCBI)*

Figura 1 – Posição do Gene BDNF no cromossomo 11

A presença do alelo Met afeta a anatomia cerebral implicando em menor volume no hipocampo e no córtex pré-frontal, duas regiões relacionadas especificamente com a expressão de BDNF⁹⁰.

O alelo Met do gene BDNF está associado com uma redução de 11% do volume do hipocampo, o que pode representar um fator de vulnerabilidade para o desenvolvimento de doenças, como o mal de Alzheimer e depressão, ambas relacionadas com a disfunção desta região cerebral⁹¹.

A relação entre o polimorfismo do gene BDNF e tendências suicidas entre pacientes bipolares foi investigada⁹². O estudo apresentou como conclusão que, dos 169 integrantes da amostra (80 Val66Met), 23 têm tendências suicidas (28,8%), de 36 Met66Met 14 têm tendências suicidas (38,9%) e de 53 Val66Val apenas 6 têm tendências suicidas (11,3%), demonstrando, assim, uma predisposição maior ao suicídio, entre pacientes bipolares com a presença do alelo Met, com o percentual total de 67%.

Quanto à secreção constitutiva do BDNF, não existe diferença entre os alelos Met e Val, entretanto, a secreção regulada da proteína é severamente reduzida na presença do alelo Met²⁴.

2.5.6 BDNF e sua influência no sistema autonômico

Esta baixa concentração de BDNF circulante, peculiar aos indivíduos portadores do alelo Met, tem sido constantemente associada a algumas anormalidades fisiológicas, tais como: desbalanço simpátovagal, devido, possivelmente, à ação do BDNF no sistema autonômico, influenciando não somente os neurônios serotoninérgicos, mas também os neurônios adrenérgicos e colinérgicos atuantes nos sistemas simpático e parassimpático⁵⁵, deficiência embrionária de BDNF prejudica severamente o desenvolvimento de vasos intramiocárdicos e podem levar a uma hipocontratibilidade cardíaca⁹³, escassas quantidades de BDNF também foram associados à obesidade, diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas e depressão⁹⁴.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o efeito do treinamento físico nos níveis de BDNF circulantes, sob o prisma da razão BDNF/pró-BDNF, bem como, sua influência na modulação autonômica e na resposta vascular periférica em jovens saudáveis sedentários, portadores do polimorfismo Val66Met do gene do BDNF.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o nível de aptidão aeróbia, antes e depois do TF, por meio do exame cardiopulmonar de esforço;
- Avaliar a FC de repouso e a atividade autonômica cardíaca por meio da variabilidade da FC de repouso no domínio do tempo e no domínio da frequência e seus componentes de alta frequência (HF, predomínio parassimpático), de baixa frequência (LF) e a razão LF/HF (balanço simpátovagal) pelo registro contínuo da FC no ECG, antes e depois do TF;
- Realizar a genotipagem e identificar a presença do polimorfismo Val66Met do BDNF, em jovens saudáveis.
- Dosar a proteína BDNF circulante, antes e depois do TF.

4 METODOLOGIA

4 METODOLOGIA

4.1 Amostragem

Para o desenvolvimento deste estudo, foram pré-selecionados 317 voluntários pertencentes ao efetivo em processo de formação pela Polícia Militar do Estado de São Paulo. Os indivíduos foram submetidos a exames clínicos para determinar seu estado de saúde quanto à presença de desordens cardiovasculares, endócrinas e metabólicas, não apresentando nenhuma anormalidade. Nossa amostra, portanto, foi composta por indivíduos saudáveis que foram submetidos a exames médicos, realizados no Centro Médico da Polícia Militar, durante o processo de ingresso nas fileiras da Polícia Militar do Estado de São Paulo, sendo esta uma das principais etapas que compõem o concurso para Soldados.

Foram selecionados indivíduos sem histórico de doenças, do sexo masculino, idade entre 19 e 36 anos, não tabagistas e que não tivessem utilizado medicamentos nos 03 meses que antecederam o estudo. O critério de exclusão foi estar praticando atividade física regularmente (3 a 4x/semana) nos últimos 6 meses. Dentre aqueles que se enquadraram nos critérios do estudo, após assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de acordo com as normas que regem os estudos experimentais com seres humanos, os indivíduos foram convidados para participar deste estudo. Participaram do estudo ingressantes na Escola Superior de Soldados da Polícia Militar por 4 anos consecutivos. Um total de 304 indivíduos completaram o protocolo de treinamento físico e, após isso, foram genotipados para a presença do polimorfismo Val66Met do gene *BDNF*. Este protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o número 0714/10.

4.2 Medidas e procedimentos

Os voluntários foram orientados a se absterem do consumo de cafeína e álcool 24 horas antes da realização dos exames. Os procedimentos adotados nesta pesquisa foram constituídos pela coleta sanguínea para extração de DNA, e armazenamento de amostras de soro e de plasma. Em adição, todos os voluntários foram submetidos aos exames de avaliação cardiopulmonar de esforço (ergoespirometria), e avaliação do fluxo sanguíneo muscular (pletismografia de oclusão venosa) durante o exercício isométrico de preensão de mão (*handgrip*). Após os 4 meses de treinamento físico aeróbio de média/alta intensidade, novas alíquotas de sangue foram coletadas para extração de DNA e armazenamento de amostras de soro e de plasma. Os exames de ergoespirometria e avaliação do fluxo sanguíneo muscular foram repetidos.

Para atender aos objetivos propostos no estudo:

- 1) Foi realizada a análise das quantidades circulantes de BDNF e do pró-BDNF no plasma sanguíneo pré e pós-TF;
- 2) Foi realizado o registro da FC de repouso, para o estudo do balanço autonômico, o registro da pressão arterial média e do fluxo sanguíneo muscular pré e pós-TF;
- 3) Após a finalização de todos os exames e do TF, os indivíduos foram genotipados para a variante Val66Met do gene BDNF.

A genotipagem foi efetuada após o término de todos os laudos, treinamento físico e exames. Portanto, este estudo foi duplo-cego, pois os pacientes não sabiam se eram portadores ou não do polimorfismo Val66Met do gene BDNF, bem como o resultado da genotipagem foi de desconhecimento de todos os componentes do grupo de pesquisa que efetuaram a monitoração do treinamento físico, coletas sanguíneas, laudos dos exames ergoespirométricos e avaliação do fluxo sanguíneo muscular.

4.2.1 Extração sanguínea

Amostras de sangue foram coletadas às 07h00, os pacientes estavam sob jejum de 12 horas, as extrações sanguíneas foram realizadas por enfermeiras do InCor, por meio de venopunção da região antecubital, conforme Figura 2, para exames destinados à caracterização do perfil glicêmico e lipídico da amostra, bem como, foram congelados e armazenados em freezer -80°C para a realização posterior da dosagem do BDNF e pró-BDNF circulantes, e genotipagem em leucócitos visando à identificação da presença da variante Val66Met do gene *BDNF*.



Figura 2 - Extração sanguínea por meio da venopunção da região antecubital

4.2.2 Avaliação da capacidade funcional cardiorrespiratória

A avaliação da capacidade cardiorrespiratória foi realizada no início e após quatro meses e meio a cinco meses de intervenção do treinamento físico aeróbio. Todos os voluntários foram submetidos a teste ergoespirométrico, com um protocolo de rampa, em esteira ergométrica

(*Quinton Instruments Company*, Seattle, Washington). A avaliação foi realizada em um sistema computadorizado (*Sensor Medics*, modelo *Vmáx 229*, Buena Vista, CA, USA), para medida direta do consumo de oxigênio (VO_2) pico, antes de iniciar o protocolo de treinamento e ao final deste período. Após posicionamento na esteira, os examinados foram acoplados a uma válvula com transdutor de volume, ao mesmo tempo em que era realizada preensão nasal por meio de prendedor apropriado, para que os gases expirados fossem coletados continuamente por intermédio da referida válvula. A ventilação (VE), fração de oxigênio (O_2) e dióxido de carbono (CO_2) foram medidos a cada ciclo respiratório por meio de sensores. A partir das análises da VE e das concentrações dos gases expirados, foram calculados o VO_2 e a produção de CO_2 . O VO_{2pico} foi considerado o VO_2 obtido no pico do exercício, quando o paciente se encontrava em exaustão e não mais conseguia manter o ritmo da corrida imposto pela esteira.



Figura 3 - A avaliação cardiopulmonar realizada em um sistema computadorizado (*Sensor Medics*, modelo *Vmáx 229*), para medida direta

4.2.3 Determinação do limiar anaeróbio e ponto de compensação respiratória

Além da determinação da capacidade funcional máxima, foram determinados o limiar anaeróbio (LA) e o ponto de compensação respiratória (PCR) que foram utilizados para a prescrição individualizada da intensidade de treinamento físico. O LA foi considerado no minuto em que o paciente apresentou valores de equivalente ventilatório de oxigênio (VE/VO_2) e pressão parcial de oxigênio no final da expiração ($PetO_2$) mais baixos, antes de iniciarem um aumento progressivo e incremento do valor de razão de troca respiratória (RER) não linear. O PCR foi considerado no minuto em que o paciente apresentou valores de equivalente ventilatório de gás carbônico (VE/VCO_2) mais baixos antes de iniciarem um aumento progressivo e pressão parcial de gás carbônico no final da expiração ($PetCO_2$) mais alto antes de começar a diminuir⁹⁵. Todos foram encorajados a realizar o exercício progressivo máximo até que sintomas como dispneia, fadiga intensa ou dor muscular os tornassem inábeis para continuação do teste. O esforço também seria interrompido na presença de arritmias complexas ou sinais de isquemia miocárdica, fato não ocorrido na população estudada. O período de recuperação foi de quatro minutos, numa velocidade de duas milhas por hora, com a esteira a zero grau de inclinação. A pressão arterial e a FC foram monitoradas durante todo o teste ergoespirométrico. A pressão arterial foi aferida pelo método auscultatório, utilizando-se um esfigmomanômetro de coluna de mercúrio. As aferições foram realizadas no repouso e a cada dois minutos de exercício e no primeiro, segundo e quarto minutos da recuperação. A FC foi continuamente monitorada pelo sinal eletrocardiográfico e registrada ao final de cada minuto do exercício e recuperação. O teste ergoespirométrico foi precedido de um eletrocardiograma de repouso (ECG), com o registro de doze derivações simultâneas e realizado em ambiente com ar-condicionado em temperatura controlada (21°C), pelo menos, duas horas após uma refeição leve.

4.2.4 Protocolo de exercício isométrico

O protocolo de exercício isométrico foi realizado no início e após quatro meses da intervenção TF.

Neste protocolo, foi realizada manobra de exercício isométrico a 30% da contração voluntária máxima (CVM).

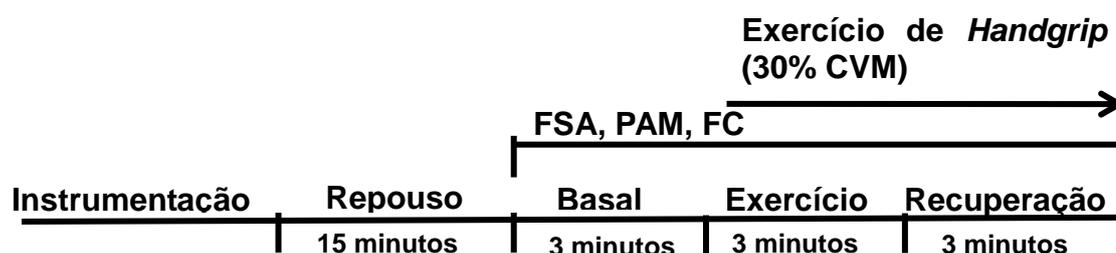


Figura 4 - Organograma do teste de *handgrip*; FSA, fluxo sanguíneo no antebraço; PAM, pressão arterial média; FC, frequência cardíaca

Antes do início do protocolo, o indivíduo foi colocado na posição deitada, e, a seguir, foi determinada sua contração voluntária máxima após três tentativas de contração máxima (no braço dominante) em um dinamômetro de preensão de mão (*handgrip*). A seguir, calculou-se 30% da contração voluntária máxima. Após três minutos de repouso (registro basal), o indivíduo realizou três minutos de exercício isométrico a 30% da contração voluntária máxima.

Durante todo o protocolo de exercício isométrico, foram feitos os registros do fluxo sanguíneo muscular no antebraço contralateral.

4.2.5 Protocolo de treinamento físico

Foram submetidos ao protocolo de treinamento físico cerca de 80 indivíduos por ano, sendo 40 no primeiro semestre e 40 no segundo semestre. O treinamento físico foi realizado em pista de atletismo da Escola Superior de Soldados “Coronel Eduardo Assumpção” situado na Av. Dr.

Felipe Pinel, 2859 – Pirituba – São Paulo/SP. O período de treinamento físico foi de 16 semanas (~4 meses), com três sessões semanais com duração de 60 minutos. Cada sessão de treinamento consistiu em:

- Aquecimento - caminhada por 5 minutos;
- Alongamento - priorizando os membros inferiores, que são mantidos na posição de alongamento por 15 segundos. Total de 5 minutos;
- Exercícios de resistência muscular localizada - exercícios de caráter técnico/educativo para corrida;
- Corrida - 60 minutos de corrida com FC correspondente à zona-alvo de treinamento físico. O controle da intensidade de treinamento foi individual e realizado com a utilização de frequencímetro cardíaco;
- Alongamentos finais - priorizando os membros inferiores que são mantidos na posição de alongamento por 20 segundos. Total de 5 a 10 minutos. Na Fase I (primeira à nona semana), o treinamento físico teve um caráter progressivo em relação ao volume, ou seja, tempo de corrida para cada sessão em minutos.

Intensidade de Corrida	Frequência Cardíaca (bpm)	Tempo de Corrida (min)
1	130	150
2	135	150
3	140	150
4	145	150
5	150	150
6	155	150
7	160	150
8	165	150
9	170	150
10	175	150
11	180	150
12	185	150
13	190	150
14	195	150
15	200	150
16	205	150
17	210	150
18	215	150
19	220	150
20	225	150
21	230	150
22	235	150
23	240	150
24	245	150
25	250	150
26	255	150
27	260	150
28	265	150
29	270	150
30	275	150
31	280	150
32	285	150
33	290	150
34	295	150
35	300	150
36	305	150
37	310	150
38	315	150
39	320	150
40	325	150
41	330	150
42	335	150
43	340	150
44	345	150
45	350	150
46	355	150
47	360	150
48	365	150
49	370	150
50	375	150
51	380	150
52	385	150
53	390	150
54	395	150
55	400	150
56	405	150
57	410	150
58	415	150
59	420	150
60	425	150
61	430	150
62	435	150
63	440	150
64	445	150
65	450	150
66	455	150
67	460	150
68	465	150
69	470	150
70	475	150
71	480	150
72	485	150
73	490	150
74	495	150
75	500	150
76	505	150
77	510	150
78	515	150
79	520	150
80	525	150
81	530	150
82	535	150
83	540	150
84	545	150
85	550	150
86	555	150
87	560	150
88	565	150
89	570	150
90	575	150
91	580	150
92	585	150
93	590	150
94	595	150
95	600	150
96	605	150
97	610	150
98	615	150
99	620	150
100	625	150

Figura 5 - Relação nominal com as intensidades de corrida individualizadas, baseando-se nas frequências cardíacas do Limiar Anaeróbio e do Ponto de Compensação Respiratória

Cada sessão foi iniciada com trinta minutos de duração, progredindo até 50 minutos a 1 hora na oitava semana (progressão de, aproximadamente, 10% a cada semana).

Os indivíduos foram previamente esclarecidos sobre a FC que cada um deveria manter, com a finalidade de atingir a intensidade de esforço desejada durante as corridas. A pista de atletismo era revestida de uma mistura de agregado asfáltico granulado e carvão, o que fornecia menores impactos durante as atividades, além do que os voluntários foram orientados sobre quais tipos de tênis deveriam utilizar para prevenir dores e incômodos nas articulações.



Figura 6 - Corrida na pista de atletismo com tempo chuvoso e baixa temperatura

Nesta fase, o treinamento físico de corrida foi conduzido numa intensidade correspondente ao Limiar Anaeróbio (LA) e monitorado por FC (monitor cardíaco marca Polar, modelo A1).

Na Fase II (nona a décima oitava ou vigésima semana), o volume da corrida foi mantido entre 50 e 60 minutos, mas com uma progressão da intensidade do treinamento físico.



Figura 7 - Corrida na pista de atletismo com sol e calor

Nesta Fase II, em uma ou duas sessões de treinamento físico realizado por semana, a FC pôde ultrapassar a FC correspondente ao PCR.

A adesão ao protocolo foi de 100%, independente das condições climáticas. No início, alguns se queixaram de dores na região da tíbia, como tratamento imediato, foram submetidos à crioterapia seguida de massagem na Unidade Integrada de Saúde da Escola Superior de Soldados, sendo que se restabeleceram rapidamente e puderam continuar com as atividades normalmente. O fato de que as corridas foram desenvolvidas na pista de atletismo, cujo solo é composto de pó de carvão compactado e o trajeto é plano e circular, minimizou as dores e possíveis lesões.

4.2.6 Análise espectral da variabilidade da frequência cardíaca (VFC)

Para esta análise, a FC foi obtida por meio do registro eletrocardiográfico na derivação II. O sinal do eletrocardiograma foi gravado em computador numa frequência de amostragem de 500 Hz e, em seguida, analisado no programa Windaq. As séries temporais do intervalo R-R foram

extraídas e analisadas pelo *software* Kubios HRV versão 2.0 (Finlândia), pelo método do domínio do tempo, com a estimativa do espectro calculada pelas séries de intervalos R-R, sendo utilizado como índice: RMSSD: diferença das raízes quadradas sucessivas entre os intervalos interbatimentos. O RMSSD reflete as oscilações em altas frequências, relacionadas à atuação vagal. Pelo método do domínio da frequência, o poder espectral foi analisado em três faixas, os componentes da banda de frequência entre 0,04 a 0,15 Hz são considerados baixa frequência (BF), os quais refletem ambos, modulação cardíaca simpática e parassimpática⁹⁶. Os componentes entre 0,15 e 0,40 Hz são considerados alta frequência (AF), e refletem a modulação do parassimpático⁵¹. A interferência da frequência muito baixa (FMB) foi compensada por meio de recursos do *software*⁹⁷, conforme Figuras 8, 9 e 10.

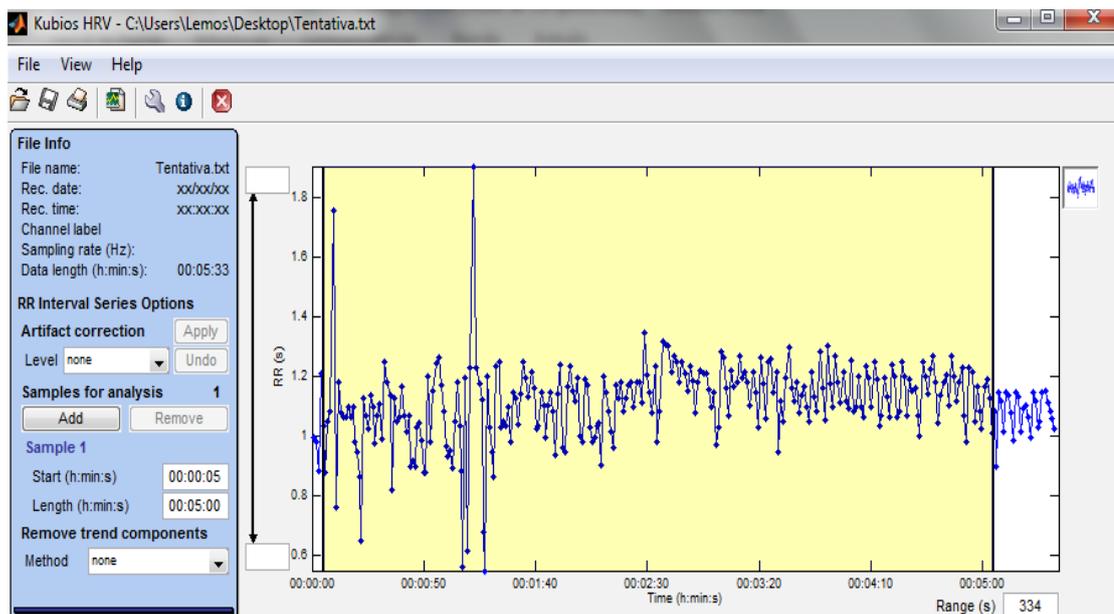


Figura 8 - Processo de compensação da FMB

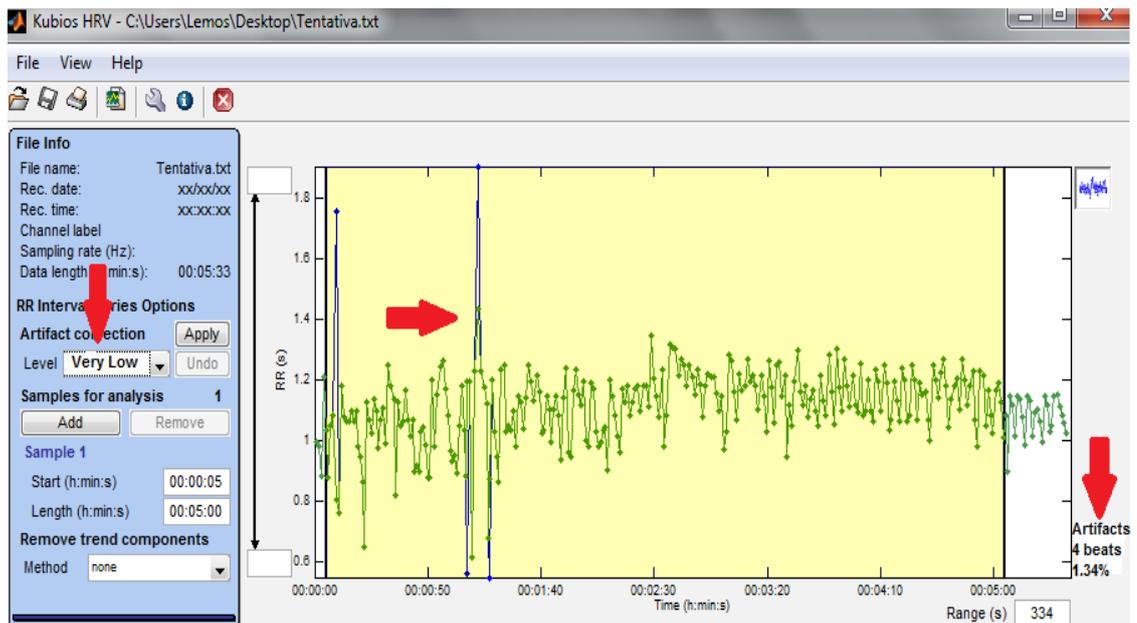


Figura 9 - Correção de artefatos

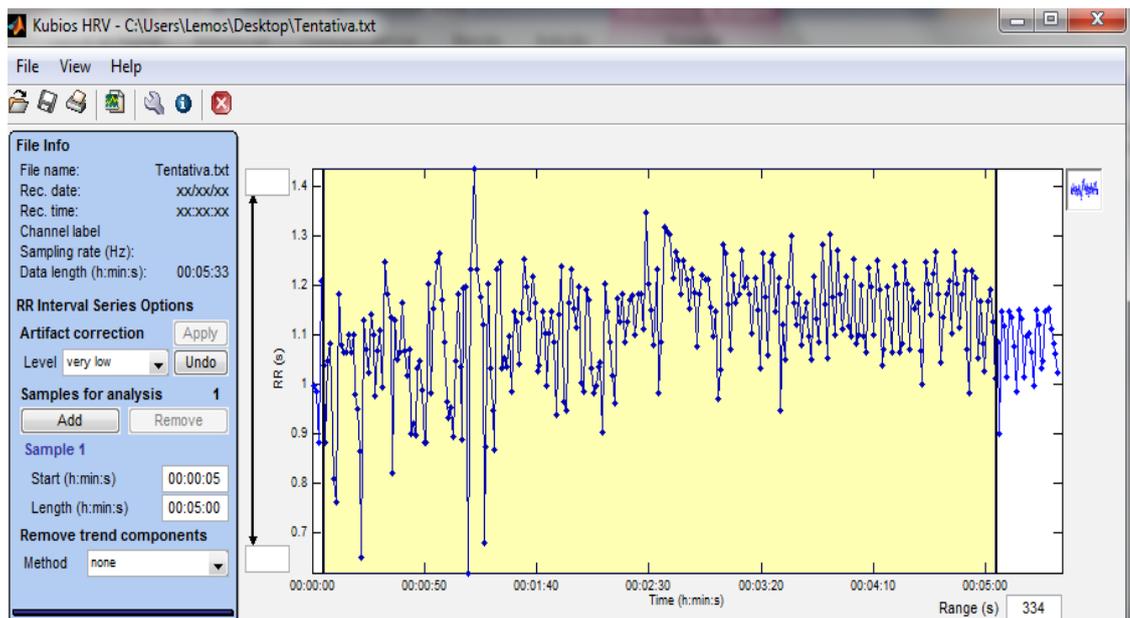


Figura 10 - Influência da MBF compensada e artefatos corrigidos

Além disso, a razão entre BF e AF (BF/AF) foi calculada para a obtenção do balanço simpátovagal.

4.2.7 Avaliação do fluxo sanguíneo muscular

O fluxo sanguíneo muscular foi avaliado pela técnica de pletismografia de oclusão venosa. O braço contralateral (aquele que não estava realizando o exercício isométrico) foi elevado acima do nível do átrio direito para garantir uma adequada drenagem venosa. Um tubo silástico preenchido com mercúrio, conectado a um transdutor de baixa pressão e a um pletismógrafo foi colocado ao redor do antebraço, a 5 cm de distância da articulação úmero-radial e conectado a um pletismógrafo. Um manguito foi colocado ao redor do pulso e outro na parte superior do braço. O manguito do pulso foi inflado a um nível suprassistólico 1 minuto antes de se iniciar as medidas. Em intervalos de 15 segundos, o manguito do braço foi inflado acima da pressão venosa por um período de 7 a 8 segundos. O aumento em tensão no tubo silástico refletiu o aumento de volume do antebraço e, conseqüentemente, sua vasodilatação. O sinal da onda de fluxo muscular foi registrado em tempo real em um computador pelo programa AT/CODAS e WINDAQ, numa frequência de 500 Hz. Ao final, o comportamento do fluxo sanguíneo muscular no antebraço (ml de sangue/min/100ml de tecido) durante o exercício de *Handgrip* (exercício isométrico de preensão de mão) foi avaliado considerando-se a média dos valores apresentados no basal, 1º min, 2º min e 3º min, seguido do cálculo da área sobre a curva.

Fórmula: $\{[(\text{basal} + 1^\circ \text{ min}) + (1^\circ \text{ min} + 2^\circ \text{ min}) + (2^\circ \text{ min} + 3^\circ \text{ min})] * 60\} / 2$.



Figura 11 - Teste de handgrip concomitante a pletismografia de oclusão venosa no antebraço contralateral

4.2.8 Pressão arterial média e FC

A pressão arterial média (PAM) foi monitorada de forma não invasiva e intermitente, utilizando-se um cuff automático e oscilométrico (Dixtal, DX 2710; Brasil, Manaus), posicionado na perna e ajustado para a circunferência dessa. O cuff inflou em ciclos de 30 segundos. A FC foi obtida com o registro eletrocardiográfico. Foram colocados três eletrodos no tórax do indivíduo, na posição bipolar, para registro da derivação MC5. Após este sinal ser pré-amplificado (General Purpose Amplifier/Stemtech, Inc., GPA-4, modelo 2), ele foi convertido de analógico para digital, e, em seguida, analisado em um programa de computador AT/CODAS e WINDAQ, numa frequência de 500 Hz.

4.2.9 Dosagem do BDNF e pró-BDNF circulantes

As amostras de plasma obtidas de indivíduos que compuseram o presente estudo foram armazenadas em freezer -80°C e, posteriormente, descongeladas para avaliação conjunta (pré e pós-treinamento físico) dos níveis de fatores neurotróficos derivados do cérebro (BDNF e pró-BDNF) pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) sanduíche, utilizando-se kits R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA). Em cada poço da placa de ELISA, foram adicionados $100\ \mu\text{L}$ de solução contendo anticorpo monoclonal contra BDNF e pró-BDNF diluídos em solução de PBS (anticorpo de captura). As placas foram incubadas por, pelo menos, 12 horas a 4°C . Os anticorpos não aderidos nas placas foram descartados por inversão e lavagem em PBS–Tween 0,1% (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). Em seguida, bloquearam-se as placas com uma solução contendo albumina de soro bovino (BSA) 1% (Sigma-Aldrich) durante 2 horas à temperatura ambiente ($200\ \mu\text{L}/\text{poço}$). Após nova lavagem das placas (PBS–Tween 0,1%), em cada poço, foi adicionado $100\ \mu\text{L}$ da amostra ou da proteína padrão. As placas foram novamente incubadas por, pelo menos, 12 horas a 4°C e, em seguida, lavadas (PBS–Tween 0,1%). Após a lavagem, incubaram-se as placas com anticorpos conjugados com biotina e diluídos em BSA 0,1%, por duas horas à temperatura ambiente.

Em seguida, após nova lavagem (PBS–Tween 0,1%), acrescentou-se $100\ \mu\text{L}/\text{poço}$ de estreptavidina conjugada com peroxidase às placas, que foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, após nova lavagem (PBS–Tween 0,1%), adicionou-se o cromógeno O -fenileno-diamina (OPD) (Sigma-Aldrich) às placas, na ausência de luz. A reação foi interrompida com solução contendo ácido sulfúrico 1M. A leitura da intensidade de marcação foi realizada em leitor de ELISA no λ de 490 nm (SOFTmáx Pro – versão 2.2.1)^{97,98}. Essa análise foi realizada no Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica LIIM – Faculdade de Medicina/UFMG.

4.3 Extração do DNA

O DNA genômico foi extraído a partir do método de precipitação salina conforme descrito a seguir: Oito (8) ml de sangue foram transferidos para um tubo de 50ml e o volume completado para 30ml com tampão A (1mM NH_4HCO_3 + 144mM NH_4Cl). A mistura foi agitada em vórtex por 20 segundos e deixada a 4°C por 10 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado a 4°C por 10 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi submetido ao mesmo procedimento descrito acima. O sedimento leucocitário foi, finalmente, suspenso em 3 mL de tampão B (10 mM Tris-HCl pH 8 + 400 mM NaCl + 2 mM Na_2EDTA pH 8) + 200 μl de SDS 10% + 500 μl de tampão C (50 μl de SDS 10% + 2 μl de Na_2EDTA 0,5 M pH 8 + 488 mL de água destilada) com proteinase K (2 μl de proteinase K 20 mg/mL diluída em 5 mL de tampão C) e deixado a 37°C por, aproximadamente, 12-18 horas. A segunda parte do protocolo começou com a adição de 1 mL de solução D (NaCl 6 M), vigorosamente agitada em vórtex por 1 minuto e, em seguida, centrifugada a 4°C por 20 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo de 15 mL e a ele será adicionado 10 mL de etanol absoluto gelado. Após uma leve agitação, foi visualizada a precipitação do DNA que foi “pescado” e transferido para um eppendorf de 1,5 mL de capacidade contendo 1 mL de etanol 70% gelado. O eppendorf foi, então, centrifugado a 4°C por 15 minutos a 13500 rpm, o etanol descartado e o sedimento (DNA) deixado à temperatura ambiente até ser totalmente seco. Em seguida, este pellet foi suspenso em 1 ml de TE (10 mM Tris- HCl pH 8 + 1 mM EDTA pH 8).

4.3.1 Amplificação do DNA e Genotipagem do polimorfismo Val66Met

O DNA genômico flanqueado para o polimorfismo nucleotídico simples foi amplificado por PCR utilizando os primers 5'-TGATGACCATCCTTTTCCTT- 3' e 5' CACTGGGAGTTCCAATGC-3', cada

reação utilizou 10ng de DNA genômico, 0.5pM de cada primer de oligonucleotídeo, 1 µL x 10 tampão PCR, 250 µM dNTP, 3mM MgCL₂ e 0.25 unidade de i-star taq DNA polimerase e água Milli-Q para um volume total de reação de 10 µL. A ampliação do protocolo consistiu de uma etapa de desnaturação a 95°C por 5 minutos seguido de ciclo de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto repetido 30 vezes e uma extensão final a 72°C por 7 minutos. O polimorfismo Val66Met do gene BDNF (rs6265) foi genotipado pelo método de sequenciamento direto bidirecional, precedido de uma etapa de purificação do produto de PCR com a enzima ExoSAP-IT®.

4.3.2 Análise estatística

Para a normalização dos valores de expressão gênica, foi utilizada regressão não paramétrica denominada LOWESS. Esta estabilizou a relação entre o logaritmo da razão de intensidades e a média do logaritmo das intensidades em cada lâmina (Yang *et al.*, 2002). Na sequência, a significância entre os resultados diferentemente expressos para o gene BDNF, entre os dois momentos que compreendem o estudo, pré e pós-treinamento. Os dados são apresentados como média ± erro padrão. As comparações entre os grupos antes do início do protocolo de treinamento, relativas à composição corporal, perfil lipídico, glicêmico, FC de repouso (FCrep), PAM, fluxo sanguíneo do antebraço (FSA), resistência vascular periférica (RVP), quantidades circulantes de BDNF e pró-BDNF, foram realizadas por teste t de *student* não pareado. Todas as variáveis não dicotômicas foram submetidas a teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, e o BDNF e pró-BDNF circulantes foram normalizados utilizando transformação logarítmica (Log₁₀). A concentração de BDNF e pró-BDNF, a razão BDNF/pró-BDNF, as análises dos testes cardiopulmonares, FSA e RVP, foram analisados utilizando ANOVA de dois caminhos para medidas repetidas. Quando a ANOVA apontou interação, foram realizadas

comparações no post-hoc de Scheffé. Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Os dados de FSA e RVP foram expressos em área sob a curva (ASC).

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Resultados gerais da amostra no período pré-TF

As características gerais, antropométricas, funcionais e hemodinâmicas principais de todos os indivíduos envolvidos no estudo, independente da genotipagem para o BDNF, estão demonstradas na Tabela 2.

Tabela 2 - Características gerais da população estudada (304 indivíduos) nos momentos pré e pós 4 meses de treinamento físico aeróbio

	Pré	Pós	P
Peso (kg)	76,6±10,2	74,7±9,2	0,06
IMC (kg/cm ²)	24,8±3,4	24,2±2,7	0,06
PAMrep (mmHg)	90,3±1,1	88,5±1,2	0,08
FSArep (ml/min/100 ml)	2,4±0,1	2,5±0,1	0,53
RVPrep (mmHg/ ml/min/100 ml)	37,2±2	34,8±2,4	0,26
RMSSD (ms)	58,9±1,9	61,1±2,2	0,43
AF (Hz)	44,7±1,5	44,9±1,7	0,91
BF/AF (Hz)	1,78±0,07	1,68±0,06	0,47

Valores de média ± erro padrão; VO₂pico: consumo máximo de oxigênio; RMSSD: diferença das raízes quadradas sucessivas entre os intervalos interbatimentos; AF: componente de alta frequência; BF/AF: razão baixa frequência/alta frequência; FSA: fluxo sanguíneo do antebraço; ASC: área sobre a curva em resposta aos 3 min de HG a 30% da contração voluntária máxima; rep: medidas no repouso. BDNF: "brain-derived neurotrophic fator".

Houve uma tendência de diminuição no peso e IMC após o TF ($p=0,06$). O TF não resultou em alterações estatisticamente significativas nas medidas de repouso da PAM, FSA, RVP, assim como, nos indicadores do controle autonômico parassimpático cardíaco (RMSSD, HF e razão LF/HF).

O VO₂pico aumentou (8,4%) e a FC de repouso diminuiu significativamente, comprovando a efetividade do treinamento físico (Figuras 12 e 13, respectivamente).

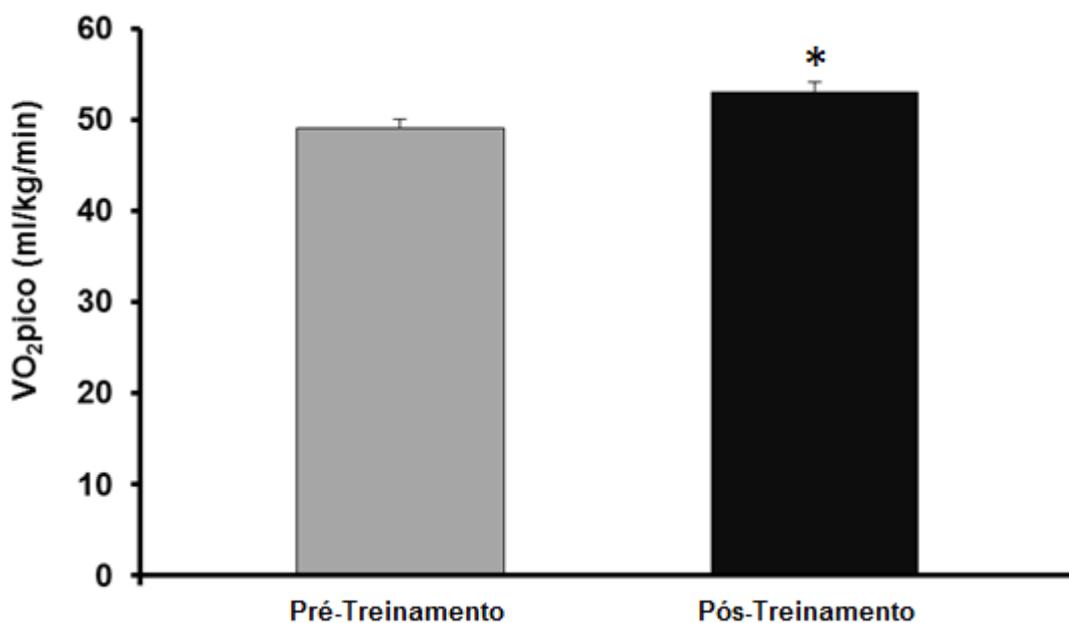


Figura 12 - Efeito do treinamento físico no VO₂pico; * $P=0,001$ vs. pré

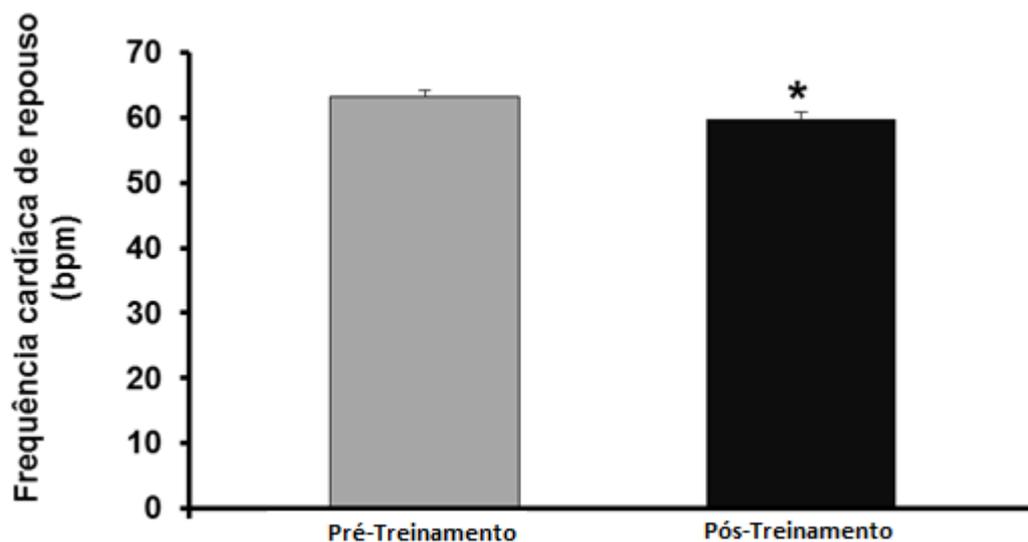


Figura 13 - Efeitos do treinamento físico na FC de repouso; * $P=0,003$ vs. pré

Podemos observar na Figura 14 que houve um incremento da resposta vasodilatadora reflexa ao exercício de *handgrip* como efeito do TF, representado pelo aumento do fluxo sanguíneo do antebraço contralateral, em valores como área sob a curva.

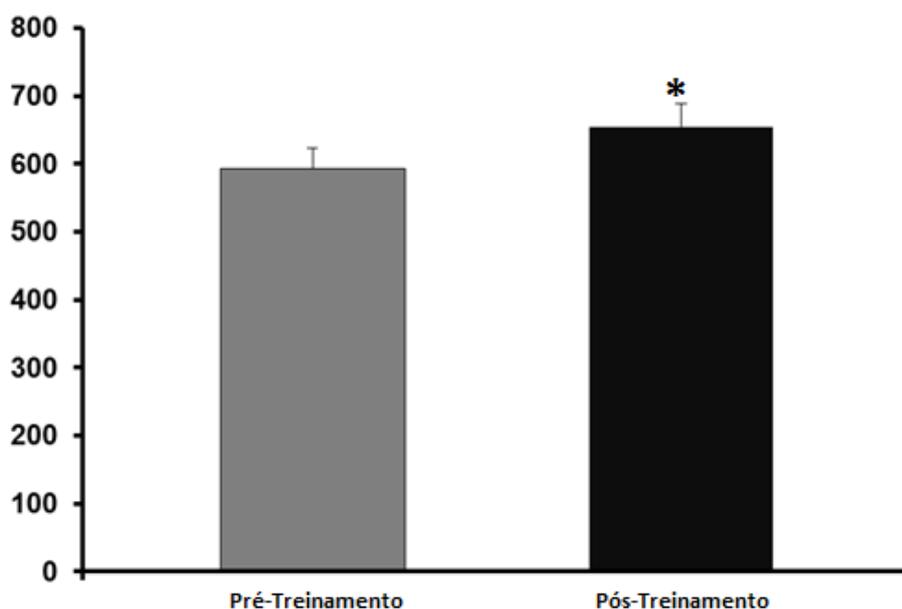


Figura 14 - Efeitos do treinamento físico no FSA (ASC); * $P=0,01$ vs. pré

Podemos observar na Figura 15 que os efeitos do TF de predominância aeróbia se fizeram presentes nas quantidades circulantes da proteína BDNF, na forma madura, com um aumento significativo deste neurotrófico. O mesmo não ocorreu em relação à forma precursora, o pró-BDNF.

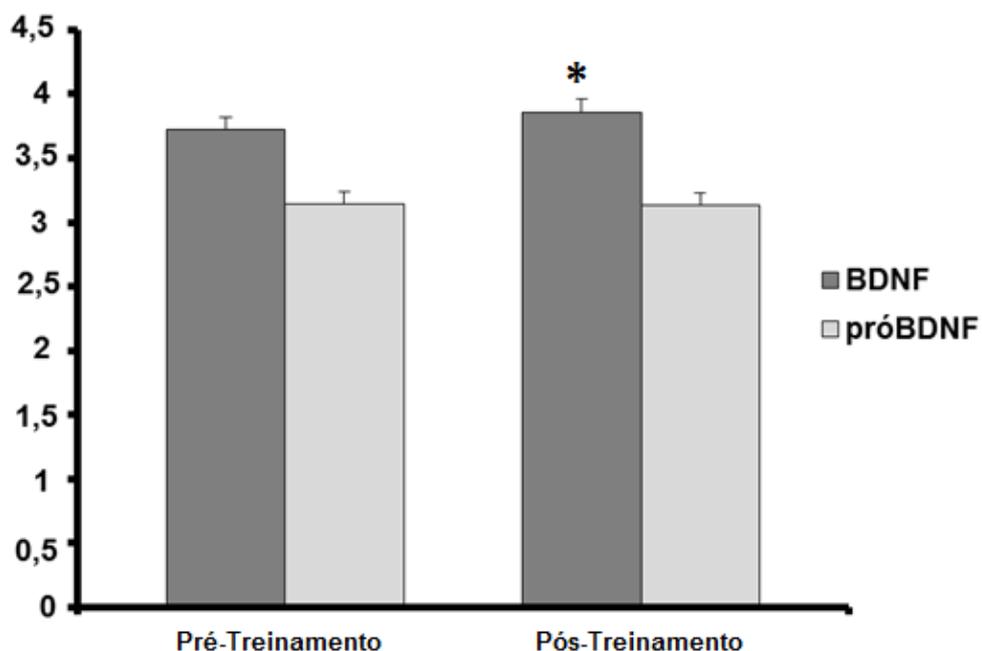


Figura 15 - Efeitos do treinamento físico nas quantidades circulantes de BDNF maduro e pró-BDNF; * $P=0,01$ vs pré

5.2 Genótipo, composição corporal, características metabólicas e hemodinâmicas por grupos

O fluxograma de inclusão de pacientes do estudo é apresentado na Figura 16.

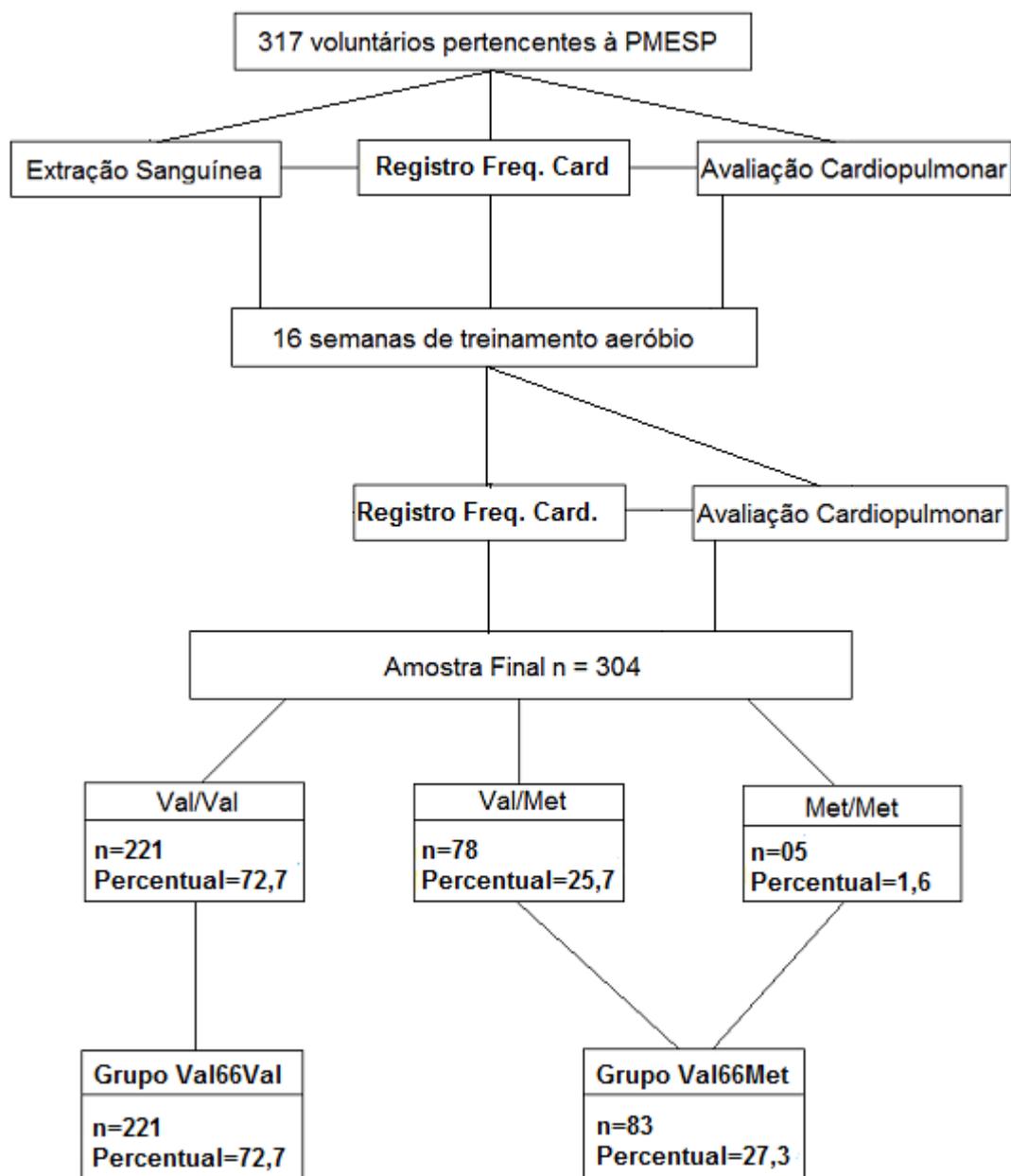


Figura 16 - Fluxograma de distribuição da amostragem

A genotipagem resultou em 72,7% de indivíduos Val66Val, 25,7% Val66Met e 1,6% Met66Met (estando em equilíbrio de Hardy Weinberg ($P=0,555$)). Esta frequência corrobora com os dados apresentados na literatura^{19,20}. Devido à reduzida frequência do alelo Met na população, um pequeno número de indivíduos Met66Met foi encontrado e, assim, nós adotamos uma estratégia utilizada por outros autores⁹⁹, e agrupamos homocigotos e heterocigotos portadores do alelo Met (Met66Met e Val66Met) em um único grupo, designado como Val66Met.

As características antropométricas, perfil lipídico e glicêmico gerais dos grupos Val66Val e Val66Me, estão demonstradas na Tabela 3. Pode ser observado que, antes do início do protocolo de treinamento físico, não houve diferenças significativas entre os grupos Val66Val e Val66Met.

Tabela 3 - Características gerais da amostra por grupos

	Val66Val	Val66Met	P
N	221	83	
Idade (anos)	24±0,4	25±0,7	0,37
Peso (kg)	76±0,7	77±1,6	0,90
Altura (cm)	175±0	176±0	0,40
IMC (kg/m ²)	24,8±0,2	24,6±0,4	0,42
Glicose (mg/dl)	88,4±0,9	92,9±2,5	0,65
Colesterol total (mg/dl)	168±2,5	171±5,7	0,67
LDL-colesterol (mg/dl)	118±2,2	125±5,2	0,21
HDL-colesterol (mg/dl)	41±0,7	38±1,3	0,19
Triglicérides (mg/dl)	106±5,1	118±7,4	0,28

Valores de média ± erro padrão; IMC: índice de massa corporal.

Não houve também diferenças na FC, na PAM, bem como, no FSA e RVP durante o repouso (Tabela 4), e no FSA e RVP em resposta ao teste de *handgrip* (Figura 19 e Figura 20, respectivamente) antes do início do protocolo de TF.

Tabela 4 - Características iniciais hemodinâmicas e BDNF por grupos

	Val66Val	Val66Met	<i>P</i>
N	221	83	
FCrep (bpm)	64±0,7	63±1,2	0,31
PAMrep (mmHg)	91±0,8	89±1,3	0,20
FSArep (ml/min)	2,3±0	2,5±0,1	0,29
RVPrep (mmHg/ml/min)	38,3±1,6	36,2±2,4	0,20
BDNF (pg/ml)	3,65±0,05	3,78±0,06	0,69
pró-BDNF (pg/ml)	3,08±0,05	3,21±0,12	0,27
Razão BDNF/pró-BDNF (pg/ml)	1,16±0,02	1,19±0,05	0,97

Valores de média ± erro padrão; FC: frequência cardíaca; PAM: pressão arterial média; FSA: fluxo sanguíneo no antebraço; RVP: resistência vascular periférica; rep: medidas no repouso; BDNF: "brain-derived neurotrophic fator".

5.3 Efeitos do TF

A aderência ao TF foi de 95,9%. Não houve alterações significativas nos indicadores antropométricos e hemodinâmicos (de repouso), no controle autonômico cardíaco, observadas pelas avaliações da VFC e pró-BDNF em resposta ao TF. Apenas o BDNF apresentou aumento significativo após TF, conforme Tabela 5.

Tabela 5 - Características hemodinâmicas, autonômicas e BDNF por grupos (pré vs. pós-TF)

	Val66Val		Val66Met		<i>P</i>
	(N= 221)		(N=83)		
	Pré	Pós	Pré	Pós	
Peso (kg)	76,2±9,8	74,2±8,7	77±11,2	75,8±10,2	
IMC (kg/m ²)	24,8±2,9	24,3±2,7	24,8±3,1	24,2±2,7	
PAM (mmHg)	91±0,8	89±0,9	89±1,3	88±1,4	
PAM ASC (mmHg)	18318±162	18080±155	18310±243	17784±251	
FSA (ml/min)	2,35±0,08	2,62±0,11	2,52±0,15	2,41±0,16	
RVP (mmHg/ml/min)	38,3±1,6	34,2±2,4	36,2±2,4	35,4±2,4	
RMSSD (ms)	58,2±41,1	60,4±33,3	59,7±32,3	61,7±26,1	
AF (Hz)	45,9±17,4	43,5±17,3	46,7±17,1	46,3±16,4	
BF/AF (Hz)	1,92±0,09	1,74±0,08	1,51±0,11	1,58±0,14	
BDNF (pg/ml)	3,65±0,05	3,87±0,03*	3,78±0,06	3,83±0,07	
pró-BDNF (pg/ml)	3,08±0,05	2,74±0,06	3,21±0,12	3,26±0,11	

Valores de média ± erro padrão; PAM: pressão arterial média; FSA: fluxo sanguíneo no antebraço; RVP: resistência vascular periférica; RMSSD: diferença das raízes quadradas sucessivas entre os intervalos interbatimentos; AF: espectro de alta frequência; BF/AF: razão baixa frequência/alta frequência; BDNF: "brain-derived neurotrophic factor"; ASC: área sobre a curva. * $p < 0,001$ vs pré.

Como resposta a 04 meses de TF, os indivíduos de ambos os grupos, Val66Val e Val66Met, obtiveram melhoras na capacidade funcional, com um aumento de 8% no VO_2 pico ($P < 0,001$) e uma queda na FCrep ($P < 0,001$), conforme Figura 17 e Figura 18, respectivamente.

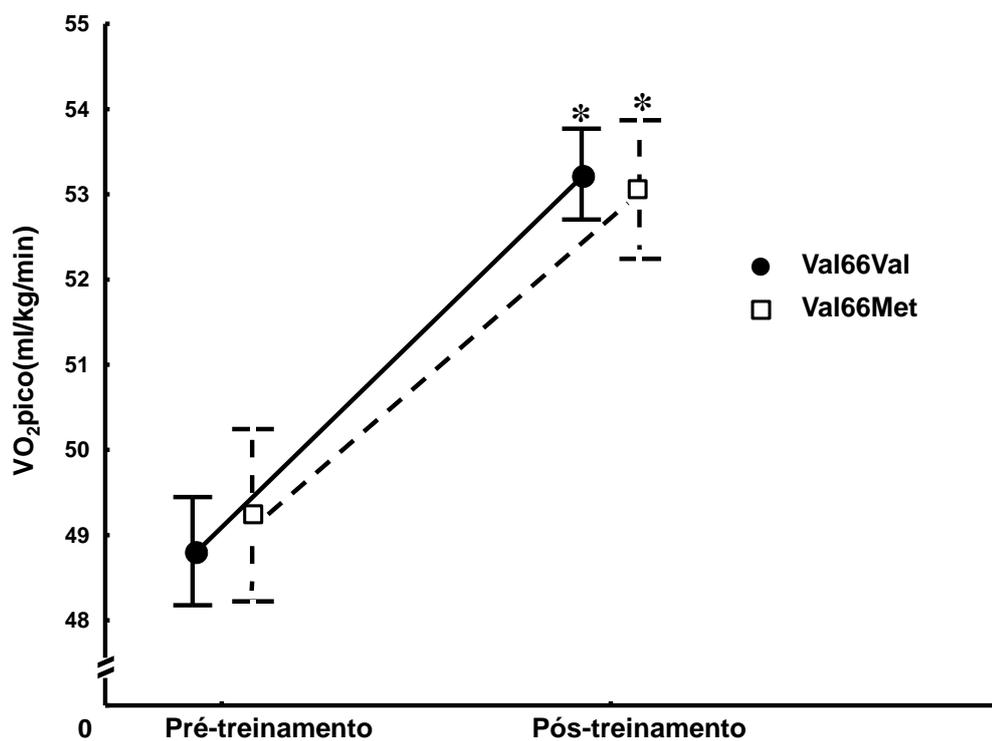


Figura 17 - Ganhos na aptidão aeróbia representados pelo VO₂pico. * $P=0,0001$ vs. pré (Fase na anova para ambos os grupos)

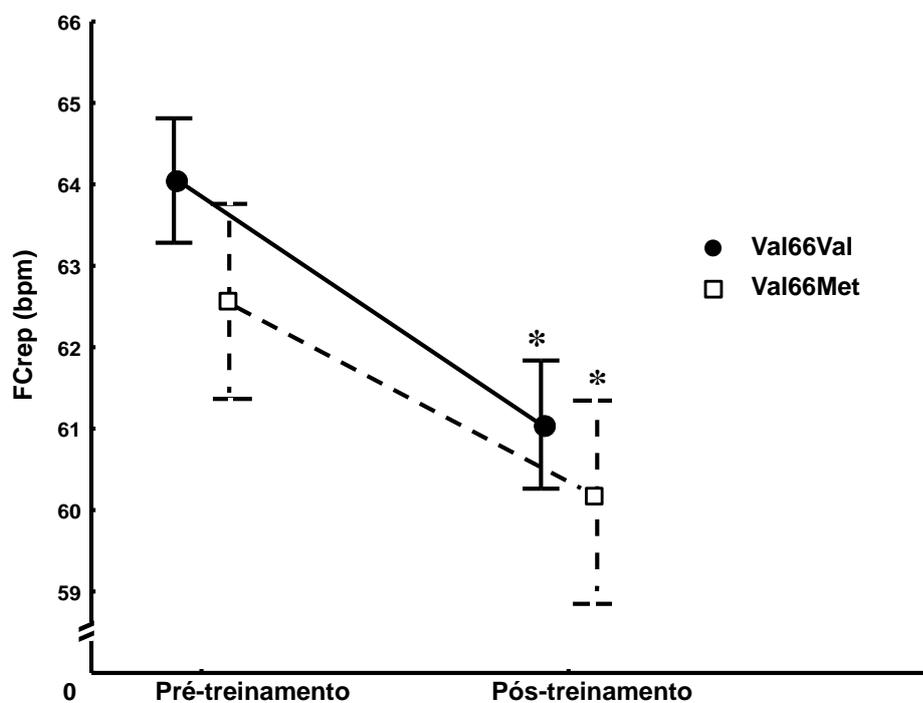


Figura 18 - Queda na FCrep após TF. * $P=0,0003$ vs. pré (Fase na anova para ambos os grupos)

5.3.1 Avaliação da reatividade vascular periférica

No grupo Val66Val, mas não no grupo Val66Met, o TF foi capaz de aumentar o FSA (Figura 19; Interação $P=0,04$,) e diminuiu RVP (Figura 20; Interação $P=0,01$,) em resposta ao teste de *handgrip*.

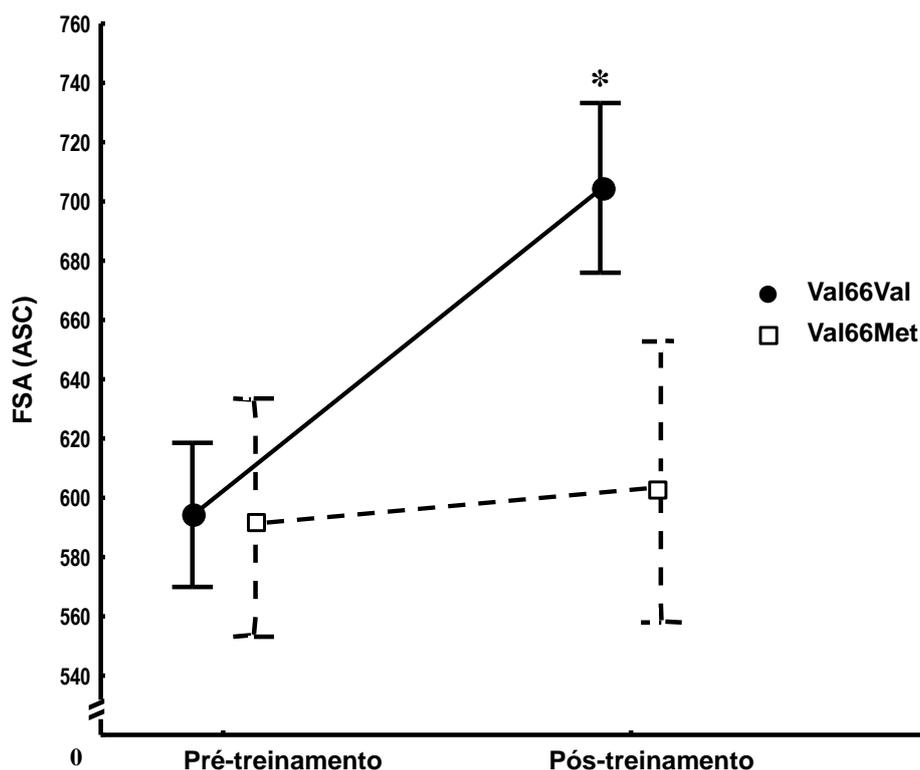


Figura 19 - Responsividade do FSA (ASC, área sobre a curva da resposta a 3 min de *handgrip* a 30% da contração voluntária máxima) pré e pós-TF. Interação $P=0,04$; * $P=0,0003$ vs. pré

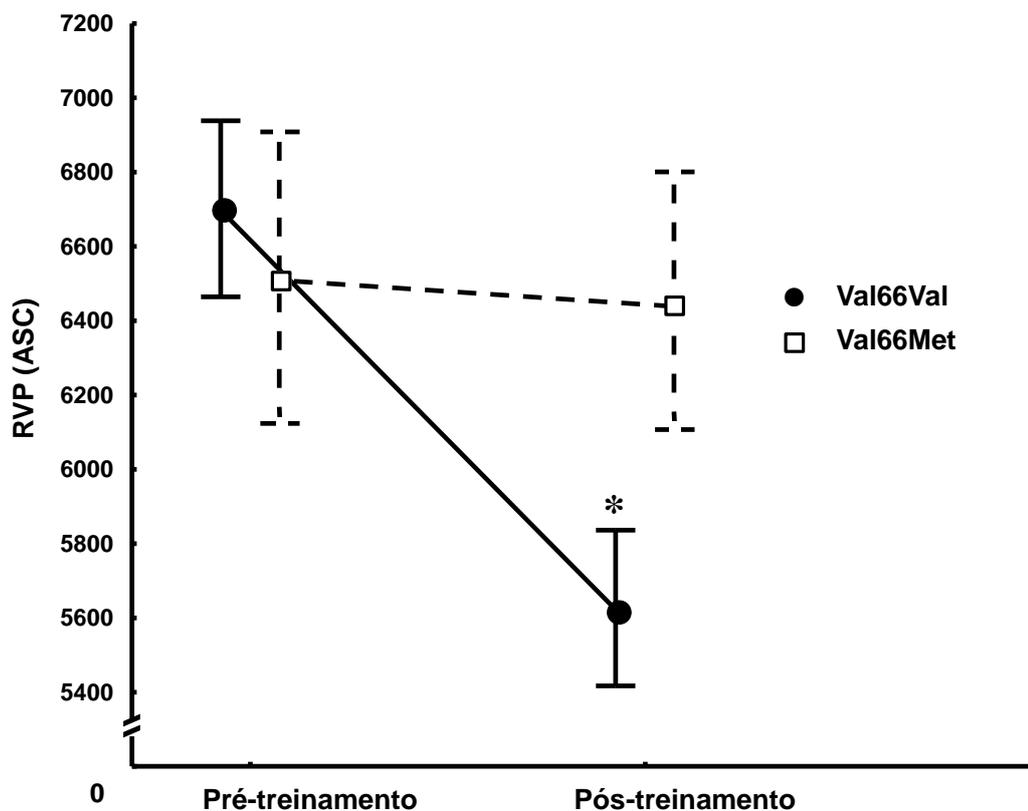


Figura 20 - Responsividade da RVP (ASC, área sobre a curva da resposta a 3 min de handgrip à 30% da contração voluntária máxima) pré e pós-TF. Interação $P=0,01$; * $P=0,0001$ vs. pré

Entretanto, após o TF, não houve mudanças nas respostas da PAM para ambos os grupos, conforme demonstrado anteriormente na Tabela 5, tanto no repouso quanto valores de ASC. O TF foi capaz de aumentar os níveis circulantes de BDNF somente no grupo Val66Val (Tabela 5; “*Post hoc*” de Scheffé; $P<0,001$). Por outro lado, é importante considerar que não houve mudanças nas concentrações de pró-BDNF em ambos os grupos (Tabela 5; $P=0,91$). A razão BDNF/pró-BDNF aumentou no grupo Val66Val ($1,17\pm 0,03$ vs. $1,44\pm 0,05$ pg/ml; “*Post hoc*” de Scheffé; $P<0,001$), porém não houve diferença significativa nos indivíduos Val66Met ($1,20\pm 0,05$ vs. $1,19\pm 0,06$ pg/ml; $P=0,99$, Interação $P=0,001$; Figura 21). Adicionalmente, no período pós-treinamento, os indivíduos Val66Val apresentaram uma maior razão BDNF/pró-BDNF quando comparados com o grupo Val66Met ($1,44\pm 0,06$ vs. $1,19\pm 0,05$ pg/ml; $P=0,02$).

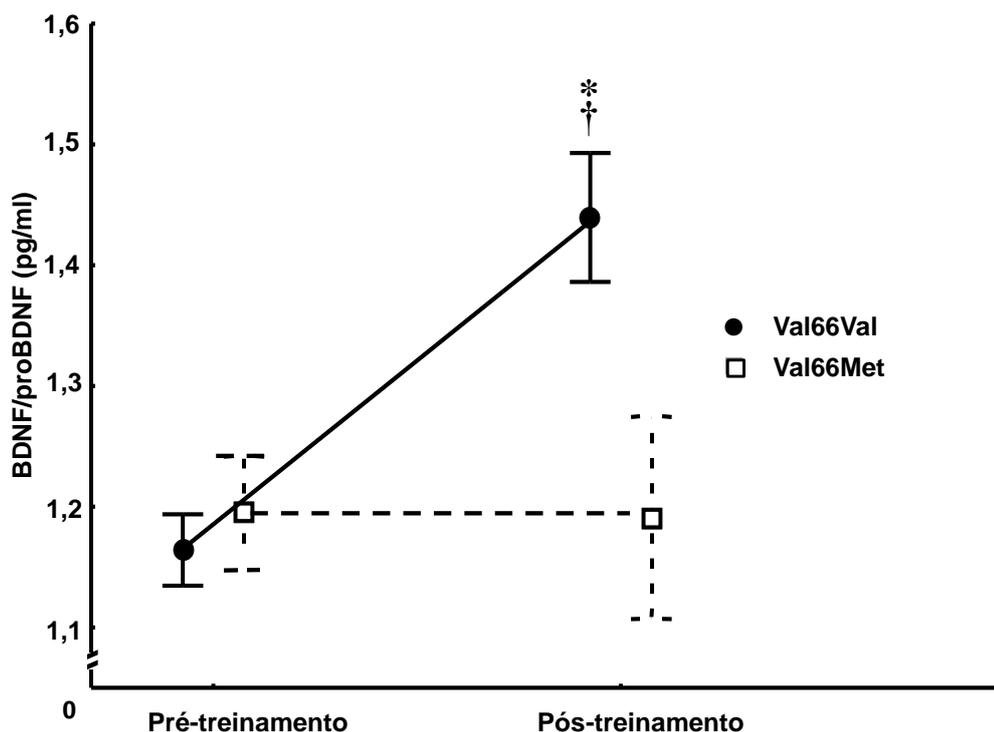


Figura 21 - Comportamento da razão BDNF/pró-BDNF em resposta ao TF. Interação $P=0,001$; * $P=0,0001$ vs. pré; † $P=0,02$ vs. Val66Met

5.4 Associação entre a razão BDNF/pró-BDNF e reatividade vascular periférica

O modelo utilizado para verificar a associação considerou o delta (período pós menos período pré-treinamento) entre as variáveis. Para tanto, os indivíduos foram pareados nos períodos pré e pós-treinamento. Houve uma associação positiva entre o delta da razão BDNF/pró-BDNF e o delta do FSA como ASC ($r=0,64$, $P<0,001$, Figura 22, painel A). Da mesma forma, houve uma associação negativa entre o delta da razão BDNF/pró-BDNF e RVP como ASC ($R=-0,58$, $P<0,001$, Figura 22, painel B).

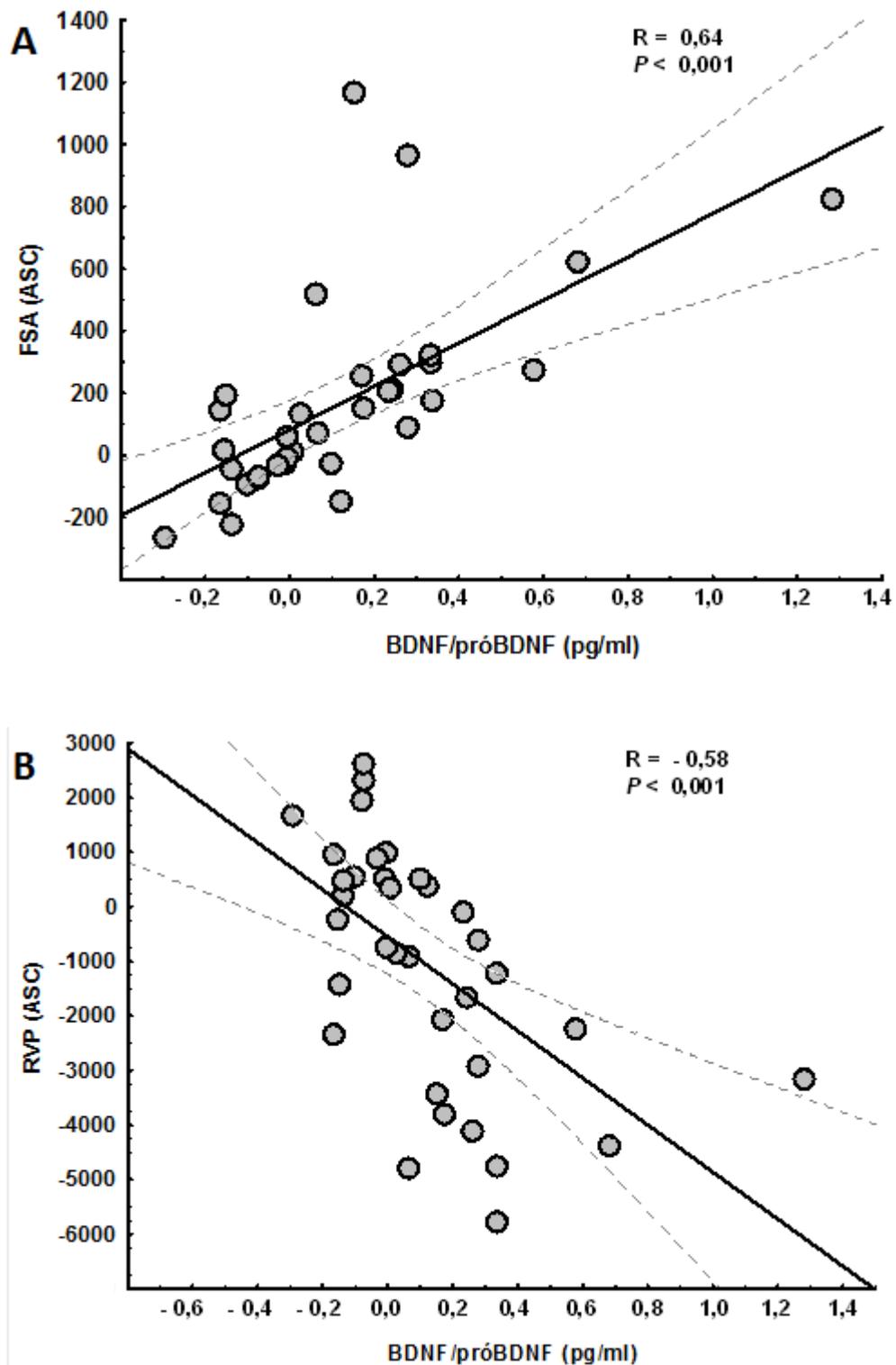


Figura 22 - A: Correlação positiva entre a razão BDNF/pró-BDNF e o FSA (ASC) mediada pelo TF, ($R=0,64$; $P<0,001$). B: Correlação negativa entre razão BDNF/pró-BDNF e RVP (ASC) mediada pelo TF, ($R = -0,58$; $P < 0,001$).

Com a finalidade de verificar a influência mútua exercida pelos fatores pró-BDNF e BDNF, em resposta ao TF, foi realizada regressão linear entre ambos. Como resultado, foi observada uma correlação positiva entre o delta do precursor pró-BDNF e o delta da proteína madura BDNF ($R = 0,43$, $P < 0,001$, Figura 23).

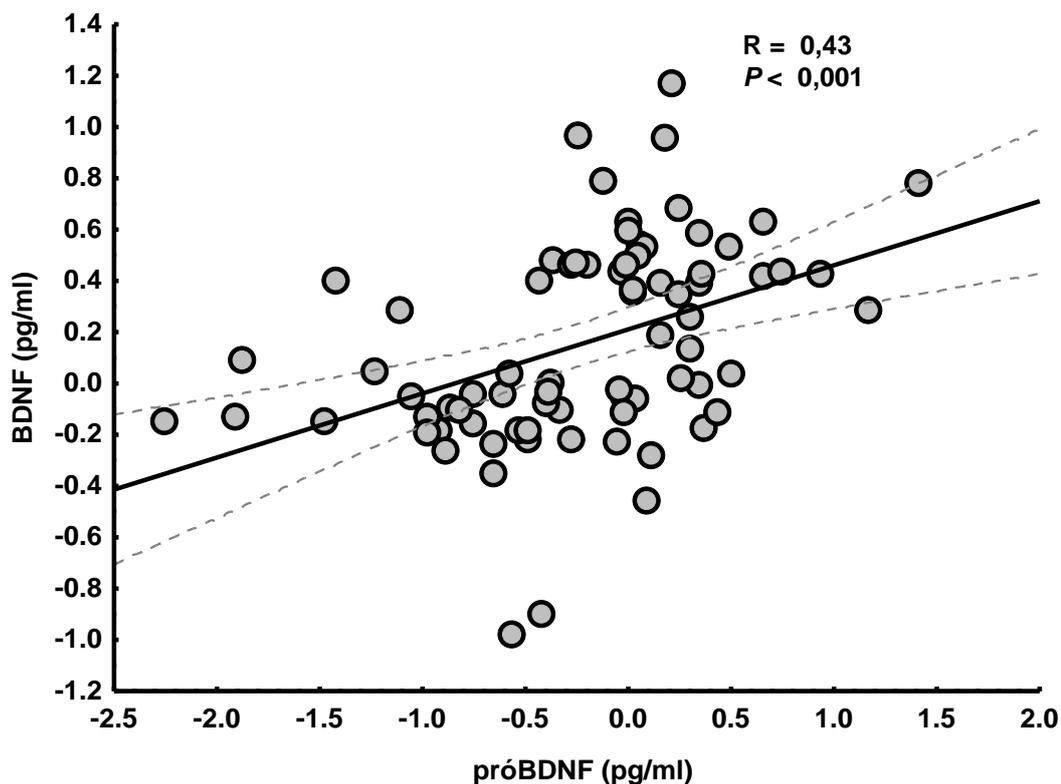


Figura 23 - Correlação positiva entre o precursor pró-BDNF e o BDNF maduro mediada pelo TF, ($R = 0,43$; $P < 0,001$)

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Os principais achados do presente estudo são:

1. As quantidades circulantes de BDNF, representadas pela razão BDNF/pró-BDNF, contribuem significativamente na modulação do fluxo sanguíneo periférico;
2. O TF é capaz de aumentar a razão BDNF/pró-BDNF circulante, somente nos indivíduos Val66Val;
3. A presença do alelo Met do polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* prejudica as adaptações na reatividade vascular periférica, em resposta ao TF.

Iniciando-se pelas análises gerais antes da genotipagem da população amostral, foi observada, no princípio do protocolo, uma média de idade de $26,3 \pm 4,4$ anos e os dados de IMC ($24,8 \pm 3$), valores que indicaram que a maioria dos sujeitos não tinha sobrepeso. Os níveis iniciais de VO_2 pico ($49,03 \pm 0,83$ ml/kg/min) sugerem que a maioria de nossos voluntários era fisicamente inativa, pois, conforme demonstrado na Tabela 1, indivíduos apresentando níveis de VO_2 pico entre 43 e 52 ml/kg/mim, na faixa etária entre 20 e 29 anos, são caracterizados como sedentários⁴².

Segundo Denadai⁴², os fatores determinantes do VO_2 pico são: gênero, idade, estado de treinamento e genética. Dentro do que estes fatores preconizam, homens jovens treinados têm maior VO_2 pico, pois a estrutura muscular e hormonal dos homens, entre outros fatores, lhes propiciam isso; durante a juventude, o sistema cardiovascular funciona mais efetivamente, pois indivíduos idosos têm menor VO_2 pico em consequência de um débito cardíaco máximo consideravelmente diminuído¹⁰⁰; quanto menos treinado, mais treinável¹⁰².

O perfil dos indivíduos que compuseram nossa amostra, inserido no que foi descrito por dois destes fatores acima (idade e nível de treinamento), nos indicava que haveria uma dificuldade nos ganhos no consumo de oxigênio, pois, como já mencionado, eram jovens e não eram totalmente destreinados. Entretanto, 04 meses de TF foram suficientemente capazes de elevar, de forma significativa, o VO_2pico da amostra como um todo em 8,4%, conforme Figura 12. Outro marcador de efeito do TF é a diminuição da FC de repouso. Neste sentido, além do aumento do VO_2pico ($49,03 \pm 0,83$ vs. $53,14 \pm 0,74$ ml/kg/min; $P=0,001$), foi observada uma diminuição da FCrep da amostra após a intervenção TF ($63 \pm 1,0$ vs. $59 \pm 1,0$ bpm; $P=0,003$), conforme Figura 13. Além disso, houve uma elevação do FSA em resposta ao *handgrip* (ASC) ($593,80 \pm 30,16$ vs. $654,99 \pm 33,23$; $P=0,01$), conforme Figura 14, o que indica uma melhora na reatividade vascular periférica. Este conjunto de resultados aponta que o protocolo de exercícios adotado neste experimento foi efetivo, mesmo com o possível nível de treinamento prévio de nossos voluntários, em virtude da possível preparação anterior às provas físicas de ingresso para a PMESP.

Houve um aumento significativo das quantidades de BDNF circulante na amostra como um todo ($3,72 \pm 0,1$ vs. $3,86 \pm 0,1$ pg/ml; $P=0,01$), como efeito do TF. Este aumento não ocorreu em relação ao pró-BDNF ($3,14 \pm 0,1$ vs. $3,13 \pm 0,1$ pg/ml; $P>0,05$), conforme Figura 15.

Após a genotipagem e subsequente divisão da amostra em 02 grupos (Val66Val e Val66Met), foram observadas características homogêneas quanto aos perfis lipídico, glicêmico e hemodinâmico, não havendo diferenças significativas entre os grupos, conforme Tabela 3, sendo que tais fatores poderiam ter exercido alguma influência em nossos resultados, pois hipercolesterolemia tem sido correlacionada com disfunção do vasorrelaxamento endotélio-dependente, pela menor produção de $\text{NO}^{5,102}$ e com níveis diminuídos de BDNF circulante¹⁰³. Quanto à aptidão aeróbia e condições cardiovasculares, ambos os grupos também partiram do mesmo patamar (Tabela 3, Figuras 17 e 18).

Independente da presença do polimorfismo Val66Met do gene *BDNF*, o TF foi capaz de melhorar a capacidade funcional de ambos os grupos e seus efeitos foram bem repercutidos na população amostral, havendo um aumento significativo do VO_2 pico e diminuição da FC de repouso (Figura 17 e Figura 18), respectivamente. De forma curiosa, os efeitos do TF sobre as concentrações circulantes de BDNF e sobre a reatividade vascular periférica não seguiram a mesma tendência.

Após a intervenção TF, as concentrações de BDNF, representadas pela razão BDNF/pró-BDNF, aumentaram significativamente somente nos indivíduos Val66Val (Figura 21). Ao analisar isoladamente os dois fatores, nota-se que não houve alterações significativas quanto às quantidades circulantes de pró-BDNF em ambos os grupos e que o BDNF aumentou significativamente somente no grupo Val66Val (Tabela 5). Logo, este aumento na razão BDNF/pró-BDNF mencionado anteriormente, observado somente no grupo que não possui o polimorfismo, foi devido ao aumento do BDNF circulante.

Um dado importante verificado neste estudo é que, contrariando a expectativa suscitada por alguns estudos anteriores, de aumento de BDNF pelo TF em indivíduos jovens e saudáveis submetidos a treinamento de endurance^{26,104}, neste trabalho, somente os indivíduos Val66Val aumentaram as concentrações de BDNF após TF (Tabela 5). Nossos resultados reforçam a ideia de que o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* tem um papel importante na modulação do BDNF circulante pelo TF. Similarmente aos nossos resultados, um recente estudo cuja amostra foi composta por indivíduos idosos com leve comprometimento cognitivo verificou que somente o genótipo selvagem (Val66Val) exibiu aumentos significativos nos níveis periféricos de BDNF em resposta a exercícios físicos¹⁰⁵. De fato, a maioria dos estudos sobre a mediação do polimorfismo Val66Met na expressão do gene *BDNF* menciona um prejuízo na atividade regulada, devido à interferência do alelo Met na clivagem intracelular do pró-BDNF^{24,106}. Curiosamente, tem sido reportado que a inibição da clivagem intracelular do pró-BDNF não interfere significativamente nas quantidades

circulantes de BDNF, mas, por outro lado, quando a clivagem extracelular é impedida, ocorre uma diminuição nas concentrações do BDNF maduro¹⁰⁷. Conforme observado na Figura 23, houve uma correlação positiva e estatisticamente significativa entre o delta (aumento pelo TF) do precursor pró-BDNF e o delta do neurotrófico BDNF maduro ($R=0,43$, $P<0,001$), o que indica uma relação diretamente proporcional entre ambos. Entretanto, como verificado na Tabela 2, após a intervenção TF, apenas o BDNF aumentou significativamente na amostra como um todo. Logo, é possível inferir que ocorreu um aumento expressivo da clivagem do pró-BDNF, propiciando sua transformação em BDNF maduro. Portanto, é provável que os aumentos no BDNF circulante no repouso verificados no presente estudo estejam vinculados a um realce do perfil enzimático responsável pela clivagem extracelular do pró-BDNF e que o TF tenha um papel fundamental neste contexto constitutivo. Tem sido divulgado que a prática crônica de exercícios parece estar intimamente ligada à ativação das matrizes metaloproteinases¹⁰⁸ e ao aumento da plasmina¹⁰⁹, os quais são os principais responsáveis pela clivagem extracelular do pró-BDNF, para resultar o BDNF maduro^{18,107}, e estão relacionados aos processos de angiogênese resultantes de aumentos do BDNF circulante^{14,110}. Nossos resultados apontam que os indivíduos Val66Val possivelmente obtiveram um aumento das enzimas de clivagem que, conseqüentemente, propiciou um aumento reflexo nos níveis circulantes do BDNF maduro. O realce na reatividade vascular periférica após o TF foi observado somente nos indivíduos Val66Val, nos quais a FSA aumentou e a RVP diminuiu significativamente, durante o exercício isométrico de *handgrip*, enquanto que a mesma resposta não foi encontrada no grupo Val66Met (Figura 19 e Figura 20, respectivamente). Não houve alterações significativas na PAM ou nos índices de funcionamento do sistema parassimpático da VFC em ambos os grupos (Tabela 5). Conseqüentemente, o aumento detectado na reatividade vascular periférica do grupo Val66Val não foi influenciado por diferenças na pressão arterial ou por adaptações simpáticas e parassimpáticas entre os grupos.

Durante a prática de exercícios físicos, ajustes no fluxo sanguíneo periférico podem ser modulados por influências simpatoadrenais, atuando por meio da biodisponibilidade de catecolaminas¹¹¹ ou por estruturas da parede vascular endotelial, as quais produzem substâncias vasoativas como o NO, sob a influência de circunstâncias fisiológicas específicas como o estresse de cisalhamento¹¹². Nossos resultados demonstram que o eixo desta vasodilatação melhorada em resposta ao TF observada nos indivíduos Val66Val, mas não no grupo Val66Met, é endotélio-dependente, influenciada, principalmente, pelo aumento da razão BDNF/pró-BDNF, capitaneado pelo aumento do BDNF circulante.

Alguns estudos muito recentes têm demonstrado que as concentrações de BDNF influenciam angiogênese e vasodilatação endotélio dependente^{8,14} em células humanas. Estes estudos obtiveram sucesso em demonstrar “*in vitro*” as adaptações no endotélio moduladas pelo BDNF circulante, mas nenhum deles confirmou esta resposta “*in vivo*”, ou analisou o papel do polimorfismo Val66Met do gene *BDNF*, sob influência do TF neste contexto.

Complementarmente, nosso trabalho realizou regressão linear comparando os valores dos deltas da razão BDNF/pró-BDNF e os deltas das adaptações na reatividade vascular periférica, representadas pelo FSA e RVP expressos como área sob a curva (conforme Figura 22, painéis A e B), após o TF. Nossos resultados demonstram que os aumentos na razão BDNF/pró-BDNF estão positiva e significativamente associados com os ajustes na responsividade do fluxo sanguíneo ($R=0,64$; $P<0,001$,) e negativamente associados com a resistência vascular periférica ($R=-0,58$; $P<0,001$).

Desta maneira, estes resultados apontam consistentemente que houve uma melhora na vasomotricidade e sugerem que o polimorfismo Val66Met do gene BDNF pode ser um dos fatores que interferem no efeito do TF sobre a reatividade vascular endotélio dependente.

O mecanismo de vasodilatação, conforme ilustrado na Figura 24, pode ser desencadeado pela estimulação do estresse de cisalhamento proveniente da atividade física, que induz a liberação de BDNF pela ativação

das plaquetas¹². Este círculo virtuoso é maximizado pela produção endotelial de BDNF¹¹, que, por sua vez, resulta no aumento da expressão de VEGF, estimulando a angiogênese^{14,113} e este aumento no VEGF contribui para um marcante aumento da produção endotelial de NO¹¹⁴. Este mesmo NO, que já é conhecido por ser largamente produzido pelas células endoteliais durante o estresse oxidativo⁸, vai estimular ainda mais a expressão do BDNF¹¹⁵, numa alça de retroalimentação positiva, protagonizada pelos níveis de BDNF circulante.

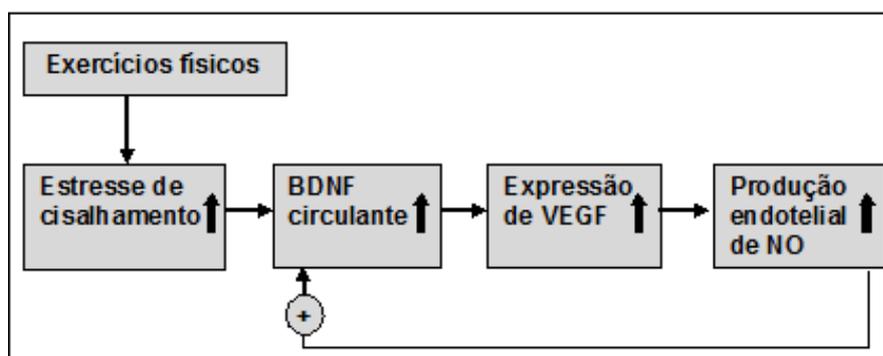


Figura 24 - Sugestão da mecânica molecular protagonizada pelo BDNF, numa suposta alça de retroalimentação positiva, para vasodilatação durante o exercício

Dentro deste cenário, é razoável deduzir que o aumento na produção do BDNF circulante, influenciado pelo TF, desencadeou, de forma parácrina, esta alça de retroalimentação positiva, que induz benefícios à vasculatura periférica. De acordo com os dados obtidos em nosso estudo, nos indivíduos Val66Val, este conjunto de fatores contribuiu decisivamente para as melhoras no fluxo vascular periférico em resposta ao TF, mediado pelos níveis de BDNF circulante.

6.1 Limitações do estudo

Este estudo teve algumas limitações que merecem ser citadas.

Este estudo foi realizado num único centro e, portanto, seus resultados podem não ter condições de ser extrapolados para outras populações.

Os indivíduos que compuseram nossa amostra eram jovens, saudáveis e do sexo masculino, o que também pode se constituir num fator limitador para a extrapolação de nossos resultados, pois não se sabe se os padrões observados neste estudo poderiam ser influenciados pelo ciclo hormonal mensal em mulheres.

Tem sido reportado pela literatura que as influências da variante genética Val66Met se fazem mais contundentes em indivíduos Met66Met⁵⁵, entretanto, o percentual da população caucasiana com este perfil é pequeno ($\approx 3\%$), mas, na população asiática, é mais expressivo ($\approx 25\%$). Possivelmente, numa amostra composta por um maior percentual de Met66Met, nossos resultados seriam mais expressivos.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

A presença do alelo Met da variante genética Val66Met do gene BDNF prejudicou o aumento de BDNF circulante e a melhora na reatividade vascular periférica em resposta ao TF. Vários estudos têm reportado que a presença do neurotrófico BDNF se traduz em saúde aos neurônios e melhora na plasticidade sináptica. Este estudo amplia a atual visão ao demonstrar que a proteína BDNF desempenha também um papel importante nas adaptações ocorridas no fenótipo de reatividade vascular.

Este trabalho foi o pioneiro a demonstrar “*in vivo*” a influência do BDNF nas adaptações do leito vascular periférico. Futuros estudos poderão aprofundar o conhecimento e elucidar os mecanismos moleculares envolvidos nesta variabilidade fenotípica.

A disfunção endotelial é um tópico importante na etiologia das doenças cardiovasculares, o treinamento físico aeróbio foi capaz de melhorar a capacidade funcional e vascular dos integrantes de nossa amostra, o que pode se traduzir num efeito protetor ao endotélio e, assim, retardar ou mesmo evitar o surgimento de doenças cardiovasculares no efetivo da Polícia Militar do Estado de São Paulo, bem como, da população em geral.

8 ANEXOS

8 ANEXOS

7.1 ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética Médica

HC

APROVAÇÃO

O Coordenador da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 14/02/2011, **APROVOU ad-referendum** o Protocolo de Pesquisa nº **0714/10**, intitulado: "**ANÁLISE GENÔMICA DOS FENÓTIPOS DE BOA FORMA FÍSICA RELACIONADA À SAÚDE E DE PERFORMANCE FÍSICA HUMANA**" apresentado pela **Comissão Científica do INCOR**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: José Eduardo Krieger
Pesquisador (a) Executante: Rodrigo Gonçalves Dias

CAPPesq, 14 de Fevereiro de 2011


PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO
16 / 02 / 2011
Debecia

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492
e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

7.2 ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

.....

CEP:.....TELEFONE: DDD (.....).....

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

.....

BAIRRO: CIDADE:

.....

CEP: TELEFONE: DDD

(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: ANÁLISE GENÔMICA DOS FENÓTIPOS DE BOA FORMA FÍSICA RELACIONADA À SAÚDE E DE *PERFORMANCE* FÍSICA HUMANA.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: José Eduardo Krieger

CARGO/FUNÇÃO: Diretor INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº: 61539

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular

PESQUISADOR EXECUTANTE: Rodrigo Gonçalves Dias

CARGO/FUNÇÃO: Pós-doutorado

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 5 anos

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Exercícios físicos normalmente são praticados para fins de saúde, com a intenção de prevenir doenças e até mesmo curar uma doença já existente. O interessante é que nem todos os indivíduos se beneficiam em mesmo grau quando praticam exercícios físicos, exemplificando, alguns podem adquirir maior aptidão física do que outros, uma característica importante na profissão de Policial Militar. **Você está sendo convidado** para participar de um estudo que tem como objetivo compreender como os genes regulam as funções do nosso organismo quando praticamos exercícios físicos. Para isso, obrigatoriamente, você não pode ser portador de doenças que limitem a prática de exercícios físicos. Caso aceite ser um voluntário deste estudo, você será submetido à prática supervisionada de exercício físico (3 sessões semanais de 60 minutos cada sessão, sendo esta dividida em: aquecimento, alongamento, corrida e alongamentos finais), durante o período de 5 meses a partir do seu ingresso à corporação da PM. Este treinamento será realizado respeitando o cronograma das aulas de educação física pré-estabelecido pela Escola Superior de Soldados. O treinamento será supervisionado pelo Capitão José Ribeiro Lemos Júnior. No InCor, os exames listados abaixo serão realizados em dois momentos. No início do estudo e após os 5 meses de treinamento físico.

DESCRIÇÃO DOS EXAMES:

1. **Ergoespirometria:** Exame realizado em esteira ergométrica para avaliação da aptidão física. Eletrodos são colocados no peito para monitoramento dos batimentos do coração durante o exercício e uma máscara no rosto para mensuração do consumo de oxigênio. Embora não haja histórico de eventos cardiovasculares em policiais militares participantes deste estudo, e que caracterize risco, eventualmente a interrupção do exame pode acontecer como consequência de anormalidades no eletrocardiograma. O único desconforto deste exame está relacionado ao cansaço físico;
2. **Ecocardiograma:** Exame realizado para análise do coração. Um gel é espalhado na pele, na face anterior do tórax, próximo da mama esquerda. Um dispositivo de metal (transdutor) é deslizado sobre o gel e uma imagem do coração é gerada num computador. Não há riscos e desconfortos relacionados a este exame;
3. **Doppler vascular:** Exame realizado para análise dos vasos sanguíneos. O equipamento utilizado e os procedimentos adotados neste exame são os mesmos do Ecocardiograma. Neste caso, as imagens geradas no computador são das artérias do corpo. Não há riscos e desconfortos relacionados a este exame;
4. **Pletismografia:** Exame realizado para a medição da quantidade de fluxo de sangue nos vasos. Serão colocados dois manguitos (semelhante àquele aparelho utilizado durante a medição da pressão arterial), um no braço e um no punho. Não há riscos, porém um possível desconforto deste exame está relacionado a um leve e passageiro formigamento nas mãos;
5. **Exames laboratoriais:** Uma veia do braço será puncionada para coleta de sangue, como se faz no laboratório normalmente. Este sangue será utilizado para dosagem de hormônios, colesterol, glicose e também para coleta do DNA e RNA (material genético), que serão utilizados para a pesquisa e

armazenados no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração – InCor (HCFMUSP), sob responsabilidade do diretor deste Laboratório. Embora não haja históricos de ocorrências, poderá ocorrer risco de infecção pela manipulação no local, apesar de todos os cuidados de assepsia que serão tomados. O desconforto esta relacionado à introdução da agulha para punção sanguínea;

- 1 **Benefícios em ser voluntário:** A participação neste estudo lhe confere benefícios imediatos e a médio/longo prazo. A assiduidade e controle do treinamento lhe propiciará excelente condicionamento físico, condição esta exigida para a prova do TAF (Teste de Aptidão Física) da PM e para o exercício da profissão. Durante estes 6 meses de treinamento supervisionado você será incentivado e terá a oportunidade de aprender como manter a máxima condição física adquirida, fato este que lhe trará conforto diante das exigências físicas durante as ações policiais, ajudando ainda na prevenção de doenças como, por exemplo, obesidade, pressão alta e depressão.
 - 2 **Garantia de acesso:** Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. José Eduardo Krieger que pode ser encontrado no endereço: InCor; Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular – av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44 - 10 andar, bloco II. Ou nos telefones (11) 3069 5579/5329/5511. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br.
- ✓ É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
 - ✓ Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;
 - ✓ Você terá direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;
 - ✓ Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
 - ✓ O material coletado e o resultado dos exames serão utilizados somente para esta pesquisa.
 - ✓ Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “ANÁLISE GENÔMICA DOS FENÓTIPOS DE BOA FORMA FÍSICA RELACIONADA À SAÚDE E DE PERFORMANCE FÍSICA HUMANA”.

Eu discuti com o Dr. José Eduardo Krieger sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Participação no exame de biopsia muscular. Sim () Não ()

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

José Eduardo Krieger Data ____/____/____

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Laurenti R, Buchalla CM, Caratin CVS. Doença isquêmica do coração. Internações, em tempo de permanência e gastos. Brasil, 1993 a 1997. *Arq Bras Cardiol.* 2000;74:483-7.
2. Ramos RLO, Scandar Neto WJ, Simões PCM, Tai DW, Magalhães MS, Pereira CA, et al. *Pesquisa nacional de saúde.* IBGE, 2013.
3. O'Keefe JH, Nelson J. Life-style change for coronary artery disease. *Postgrad Med.* 1996:89-106.
4. Merino P. *Mortalidade em efetivos da Polícia Militar do Estado de São Paulo* [Dissertação] - Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, 2010.
5. Luz PLD, Laurindo FRM, Chagas ACP. *Endotélio e doenças cardiovasculares.* São Paulo Atheneu, 2005.
6. Linke A, Schoene N, Gielen S, Hofer J, Erbs S, Schuler G, Hambrecht R. Endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: systemic effects of lower-limb exercise training. *J Am Coll Cardiol.* 2001 Feb;37(2):392-7.
7. Hempstead BL. Dissecting the diverse actions of pro- and mature neurotrophins. *Curr Alzheimer Res.* 2006;3:19-24.
8. Usui T, Naruo A, Okada M, Hayabe Y, Yamawaki H. Brain-derived neurotrophic factor promotes angiogenic tube formation through generation of oxidative stress in human vascular endothelial cells. *Acta Physiol.* 2014;211:385-94.
9. Erickson KI, Miller DL, Roecklein KA. The aging hippocampus: interactions between exercise, depression, and BDNF. *Neuroscientist.* 2012;18:82-97.
10. Hashimoto K, Shimizu E, Iyo M. Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders. *Brain Res Rev.* 2004;45:104-14.
11. Zoladz JA, Pilc A. The effect of physical activity on the brain derived neurotrophic factor: from animal to human studies. *J Physiol Pharmacol.* 2010;61:533-41.
12. Fujimura H, Altar CA, Chen R, Nakamura T, Nakahashi T, Kambayashi JI, et al. Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. *Thromb Haemost.* 2002;87:728-34.

13. 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 Mar 24;470:113-7.
14. Lin CY, Hung SY, Chen HT, Tsou HK, Fong YC, Wang SW, Tang CH. Brain-derived neurotrophic factor increases vascular endothelial growth factor expression and enhances angiogenesis in human chondrosarcoma cells. *Biochem Pharmacol.* 2014;91:522-33.
15. Wang S, Bray P, McCaffrey T, March K, Hempstead BL, Kraemer R. p75NTR mediates neurotrophin-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol.* 2000;157:1247-58
16. Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, et al. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci.* 2005;25:5455-63.
17. Ilchibaeva TV, Kondaurova EM, Tsybko AS, Kozhemyakina RV, Popova NK, Naumenko VS. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its precursor (proBDNF) in genetically defined fear-induced aggression. *Behav Brain Res.* 2015 Sep 1;290:45-50.
18. Södersten K, Pålsson E, Ishima T, Funa K, Landén M, Hashimoto K, et al. Abnormality in serum levels of mature brain-derived neurotrophic factor(BDNF) and its precursor proBDNF in mood-stabilized patients with bipolar disorder: a study of two independent cohorts. *J Affect Disord.* 2014;160:1-9.
19. Pivac N, Kim B, Nedić G, Joo YH, Kozarić-Kovačić D, Hong JP, et al. Ethnic differences in brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism in croatian and korean healthy participants. *Genomics.* 2009;50:43-8.
20. Shimizu E, Hashimoto K, Iyo M. Ethnic differences of the BDNF 196 G/A (val66met) polymorphism frequencies: the possibility to explain ethnic mental traits. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr.* 2004;126:122-6.
21. Knaepen K, Goekint M, Heyman EM, Meeusen R. Neuroplasticity - exercise-induced response of peripheral brain-derived neurotrophic factor. *Sports Med.* 2010;40:765-801.
22. 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;112:257-69.
23. Chen ZY, Bath K, McEwen B, Hempstead B, Lee F. Impact of genetic variant BDNF (Val66Met) on brain structure and function. *Novartis Found Symp.* 2008;289:180-95.

24. Chen ZY, Patel PD, Sant G, Meng CX, Teng KK, Hempstead BL, et al. Variant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Met66) alters the intracellular trafficking and activity-dependent secretion of wild-type BDNF in Neurosecretory cells and cortical neurons. *J Neurosci*. 2004;24:4401-11.
25. Seifert, T, Brassard P, Wissenberg M, Rasmussen P, Nordby P, Stallknecht B, et al. Endurance training enhances BDNF release from the human brain. *Am J Physiol Regul Integr*. 2010;298:372-7.
26. Zoladz JA, Pilc A, Majerczak J, Grandys M, Zapart-Bukowska J, Duda K. Endurance training increases plasma brain-derived neurotrophic factor concentration in young healthy men. *J Physiol Pharmacol*. 2008;59:119-32.
27. Souza CAD, Shapiro LF, Clevenger CM, Dinunno FA, Monahan KD, Tanaka H, et al. Regular aerobic exercise prevents and restores age-related declines in endothelium-dependent vasodilation in healthy men. *Circulation*. 2000;102:1351-7.
28. Pohl U, Holtz J, Busse R, Bassenge E. Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension*. 1985;8:37-44.
29. Sullivan MJ, Knight JD, Higginbotham MB, Cobb FR. Relation between central and peripheral hemodynamics during exercise in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 1989;80:769-81.
30. Paschoal MA, Volanti VM, Pires CS, Fernandes FC, Variabilidade da frequência cardíaca em diferentes faixas etárias. Faculdade de Fisioterapia da Pontifícia Universidade Católica de Campinas. *Rev Bras Fisioter*. 2006;10:413-9.
31. Fronchetti L, Nakamura F, Aguiar C, Oliveira F. Indicadores de regulação autonômica cardíaca em repouso e durante exercício progressivo. Aplicação do limiar de variabilidade da frequência cardíaca. *Rev Port Cien Desp*. 2006;6:21-8.
32. Hjalmarson AK. Heart rate: an independent risk factor in cardiovascular disease. *Eur Heart J Suppl*. 2007;9:3-7.
33. Farah BQ, Christofaro DGD, Balogopal PB, Cavalcante BR, Barros MBVG, Ritti-Dias RM. Association between resting heart rate and cardiovascular risk factors in adolescents. *Eur J Pediatr*. 2015.
34. Caetano J, Alves JD. Heart rate and cardiovascular protection. *Eur J Intern Med*. 2015;26:217-22.
35. Armstrong N, Welsman JR. Developmental of aerobic fitness during childhood and adolescence. *Pediatric Exerc Sci*. 2000;12:128-49.

36. Whaley MH, Brubaker PH, Otto RM. *ACSM's guidelines for exercise testing and prescription*. 7th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
37. Messinger-Rapport B, Pothier Snader CE, Blackstone EH, Yu D, Lauer MS. Value of exercise capacity and heart rate recovery in older people. *J Am Geriatr Soc*. 2003;51:63-71.
38. Myers J, Prakash M, Froelicher V, Do D, Partington S, Atwood JE. Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing. *N Engl J Med*. 2002; p. 793– 801.
39. Araújo DSMS, Araújo CGSD. Aptidão física, saúde e qualidade de vida relacionada à saúde em adultos. *Rev Bras Med Esporte*. 2000;6:194-203.
40. LaMonte MJ, Barlow CE, Jurca R, Kampert JB, Church TS, Blair SN. Cardiorespiratory fitness is inversely associated with the incidence of metabolic syndrome: a prospective study of men and women. *Circulation*. 2005;112:505-17.
41. Haskell WL. Physical activity and health: need to define the required stimulus. *Am J Cardiol*. 1985;55:4D-90.
42. Denadai BS. Consumo máximo de oxigênio: fatores determinantes e limitantes. *Rev Bras Ativ Fis Saúde*. 1995;1:85-94.
43. Alves CR, Alves GB, Pereira AC, Trombetta IC, Dias RG, Mota GFA, et al. Vascular reactivity and ACE activity response to exercise training are modulated by the +9/-9 bradykinin B2 receptor gene functional polymorphism. *Physiol Genomics*. 2013;45:487-92.
44. Lauer T, Kleinbongard P, Kelm M. Indexes of NO bioavailability in human blood. *N Physiol Sci*. 2002;17:251-5.
45. Clarkson P, Montgomery HE, Mullen MJ, Donald AE, Powe AJ, Bull T, et al. Exercise training enhances endothelial function in young men. *J Am Coll Cardiol*. 1999;33:1379-85.
46. Rinder MR, Spina RJ, Ehsani AA. Enhanced endothelium-dependent vasodilation in older endurance-trained men. *J Appl Physiol*. 2000;88:761-6.
47. Challapalli S, Kadish A. H, Horvath G, Goldberg JJ. Differential effects of parasympathetic blockade and parasympathetic withdrawal on heart rate variability. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 1999; p. 1192-9.
48. Aires MDM. *Fisiologia*. Guanabara Koogan. Vol. 3ª edição. 2008.

49. Arai Y, Saul JP, Albrecht P, Hartley LH, Lilly LS, Cohen RJ, Colucci WS. Modulation of cardiac autonomic activity during and immediately after exercise. *Heart Circ Physiol*. 1989;256:132-41.
50. Acharya UR, Joseph PK, Lim CM, Suri JS. Heart rate variability: a review. *Med Biol Eng Comput*. 2006;44:1031-51.
51. Malik M, Camm AJ. Heart rate variability: from facts to fancies. *J Am Coll Cardiol*. 1993;22:566-8.
52. Ross R. Molecular and mechanical synergy: cross-talk between integrins and growth factor receptors. *Cardiovasc Res*. 2004;63:381-90.
53. Almeida MB, Araujo CGS. Efeitos do treinamento aeróbico sobre a frequência cardíaca. *Rev Bras Med Esporte*. 2003;9:104-12.
54. William DWJ, Berne RM, Levy MN, Koeppe BM. *Sistema nervoso autônomo e seu controle central. Fisiologia*. 5a edição: Elsevier Editora Ltda; 1991. p.215-33.
55. Yang AC, Chen TJ, Tsai SJ, Hong CJ, Kuo CH, Yang CH, Kao KP. BDNF Val66Met polymorphism alters sympathovagal balance in healthy subjects. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2010;153:1024-30.
56. Barde Y.A, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J*. 1982;1:549-53.
57. Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Ann Rev Neurosci*. 2001;24:1217-81.
58. Hohn A, Leibrock J, Bailey K, Barde YA. Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain derived neurotrophic factor family. *Nature*. 1990;344:339-41.
59. Berkemeier LR, Winslow JW, Kaplan DR, Nikolicks K, Goeddel DV, Rosenthal A. Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron*. 1991;7:857-66.
60. Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J*. 1982;1:549-53.
61. Vancini RL, De Lira CA, Arida RM. Efeito da atividade física sobre a aptidão cerebral. Centro de Estudos de Fisiologia do Exercício, 2008.
62. Cotman CW, Berchtold NC. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci*. 2002;25:295-301.
63. Davis M. Ethanol-BDNF interactions: Still more questions than answers. *Pharmacol Ther*. 2008;118:36-57.

64. Frey BN, Andreazza AC, Cereser KM, Martins MR, Valvassori SS, Reus GZ, et al. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. *Life Sci.* 2006;3:281-7.
65. Chuang DM, Chen RW, Chalecka-Franaszek E, Ren M, Hashimoto R, Senatorov V, et al. Neuroprotective effects of lithium in cultured cells and animal models of disease. *Bipolar Disord.* 2002;4:129-36.
66. Avissar S, Barki-Harrington L, Nechamkin Y, Roitman G, Schreiber G. Reduced beta-adrenergic receptor-coupled Gs protein function and Gs alpha immunoreactivity in mononuclear leukocytes of patients with depression. *Biol Psychiatry.* 1996;9:755-60.
67. Gomez-Pinilla, Ying Z, Opazo P, Roy RR, Edgerton VR. Differential regulation by exercise of BDNF and NT-3 in rat spinal cord and skeletal muscle. *Eur J Neurosci.* 2001;13:1078-84.
68. Dowlatshahi D, MacQueen GM, Wang JF, Reisch JS, Young LT. Protein-coupled cyclic AMP signaling in post mortem brain of subjects with mood disorders: effects of diagnosis, suicide, and treatment at time of death. *J Neurochem.* 1999;3:1121-7.
69. Wang HY, Friedman E. Enhanced protein kinase C activity and translocation in bipolar affective disorders brains. *Biol Psychiatry.* 1996;7:568-75.
70. Akagi S, Mizoguchi A, Sobue K, Nakamura H, Ide C. Localization of synapsin I in normal fibers and regenerating axonal sprouts of the rat sciatic nerve. *Histochem Cell Biol.* 1996;105:365-73.
71. Lisman J, Schulman H, Cline H. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioral memory. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3:175-90.
72. Liu M, Simon MI. Regulation by cAMP-dependent protein kinase of a G protein-mediated phospholipase C. *Nature.* 1996;382:83-90.
73. Zhao WQ, Cheng H, Quon MJ, Alkon DL. Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory. *Eur J Pharmacol.* 2005;490:71-81.
74. Lommartzsch 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;26:115-23.
75. Fenrich K, Tessa G. Axonal regeneration in the peripheral and central nervous systems; current, issues and advances. *Can J Neurol Sci.* 2004;31:142-56.

76. Linnarsson S, Björklund A, Ernfors P. Learning deficit in BDNF mutant mice. *Eur J Neurosci.* 1997;12:2581-7.
77. Nielsen B, Nybo L. Cerebral changes during exercise in the heat. *Sports Med.* 2003;33:1-11.
78. Tang SW, Chu E, Hui T, Helmeste D, Law C. Influence of exercise on serum brain-derived neurotrophic factor concentrations in healthy human subjects. *Neurosci Lett.* 2008;431:62-65.
79. White LJ, Castellano V and W. LJ., Exercise and brain health-implications for multiple sclerosis: part II immune factors and stress hormone. *Sports Med.* 2008;38:179-86.
80. Gold SM, Schulz KH, Hartmann S, Mladek M, Lang UE, Hellweg R, et al. Basal serum levels and reactivity of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor to standardized acute exercise in multiple sclerosis and controls. *J Neuroimmunol.* 2003;138:99-105.
81. Vega RS, Struder HK, Vera Wahrman B, Schmidt A, Bloch W, Hollmann W. Acute BDNF and cortisol response to low intensity and following ramp incremental exercise to exhaustion in humans. *Brain Res.* 2006;1121:59-65.
82. Schiffer T, Schulte S, Hollmann W, Bloch W, Strüder HK. Effects of strength and endurance training on brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor 1 in humans. *Horm Metab Res.* 2009;41:250-4.
83. Sarchielli P, Greco L, Stipa A, Floridi A, Gallai V. Brain-derived neurotrophic factor in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2002;132:180-8.
84. Poduslo JF, Curran GL. Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. *Brain Res Mol Brain Res.* 1996;36:280-6.
85. Cosmas AC, Kernan K, Buck E, Fernhall B, Manfredi TG. Exercise and dietary cholesterol alter rat myocardial capillary ultrastructure. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1997;75:62-9.
86. Wisløff U, Støylen A, Loennechen JP, Bruvold M, Rognum Ø, Haram PM, et al. Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients. *Circulation.* 2007;115:3086-94.
87. Delp M.D, McAllister RM, and L. MH., Exercise training alters endothelium-dependent vasoreactivity of rat abdominal aorta. *J Appl Physiol.* 1993;75:1354-63.

88. Mohandas N, Chasis JA. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Semin Hematol.* 1993;3:171-92.
89. Cheeran B, Talelli P, Mori F, Koch G, Suppa A, Edwards M, et al. A common polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor gene (BDNF) modulates human cortical plasticity and the response to rTMS. *J Physiol.* 2008;586:5717-25.
90. Pezawas L, Beth A, Verchinski, Venkata S, Joseph H, Bhaskar S, et al. The brain derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and variation in human cortical morphology. *J Neurosci.* 2004;45:10099-102.
91. Bueller JA, Aftab M, Sen S, Gomez-Hassan D, Burmeister M, Zubieta JK. BDNF Val(66)met allele is associated with reduced hippocampal volume in healthy subjects. *Biol Psychiatry.* 2006;59:812-7.
92. Kim B, Kim C.Y, Hong J.P, Kim S.Y, Lee C, Joo YH. Brain-derived neurotrophic factor Val/Met polymorphism and bipolar disorder association of the met allele with suicidal behavior of bipolar patients. *Neuropsychobiology.* 2008;58:97-103.
93. 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;127:4531-40.
94. Rasmussen P, Brassard P, Adser H, Pedersen MV, Leick L, Hart E, et al. Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise. *Exp Physiol.* 2009;54:1062-9.
95. Skinner JS, McLellan TM. The transition from aerobic to anaerobic metabolism. *Res Q Exerc Sport.* 1980;1:234-48.
96. Tarvainen MP, Niskanen JP, Lipponen JA, Ranta-Aho PO, Karjalainen PA. Heart rate variability analysis software. *Comput Methods Programs Biomed.* 2014;113:210-20.
97. Forlenza OV, Diniz BS, Teixeira AL, Ojopi EB, Talib LL, Mendonça VA, et al. Effect of brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and serum levels on the progression of mild cognitive impairment. *World J Biol Psychiatry.* 2010;11:774-80.
98. Martins LB, Duarte H, Ferreira AV, Rocha NP, Teixeira AL, Domingues RB. Migraine is associated with altered levels of neurotrophins. *Neurosci Lett.* 2015;587:6-10.

99. Hariri AR, Goldberg TE, Mattay VS, Kolachana BS, Callicott JH, Egan MF, et al. Brain-Derived neurotrophic factor val66met polymorphism affects human memory-related hippocampal activity and predicts memory performance. *J Neurosci.* 2003;23:6690-4.
100. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiologia médica.* Guanabara Koogan, 2002. 10ª Edição. p. 915-6.
101. Powers SK, Howley ET. *Fisiologia do exercício - teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho.* Manole, 2002. 3ª Edição. p. 393-4.
102. Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001;280:193-206.
103. 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? *Progr Brain Res.* 2004;146:279-89.
104. Huang T, Larsen KT, Ried-Larsen M, Møller NC, Andersen LB. The effects of physical activity and exercise on brain-derived neurotrophic factor in healthy humans: a review. *Scand J Med Sci Sports.* 2013;24(1):1-10.
105. Nascimento CM, Pereira JR, Pires de Andrade L, Garuffi M, Ayan C, Kerr DS, et al. Physical exercise improves peripheral BDNF levels and cognitive functions in elderly mild cognitive impairment individuals with different BDNF Val66Met genotypes. *J Alzheimers Dis.* 2015;43(1):81-91.
106. Lu B, Pang PT, Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nature Rev.* 2005. 6(Neuroscience): 603-13.
107. Nagappan G, Zaitsev E, Senatorov VV, Yang J, Hempstead BL, Lu B. Control of extracellular cleavage of ProBDNF by high frequency neuronal activity. *PNAS.* 2009;106:1267-72.
108. Ribeiro F, Ribeiro IP, Alves AJ, do Céu Monteiro M, Oliveira NL, Oliveira J, et al. Effects of exercise training on endothelial progenitor cells in cardiovascular disease: a systematic review. *Am J Phys Med.* 2013;92:1020-30.
109. Hilberg T, Gläser D, Reckhart C, Prasa D, Stürzebecher J, Gabriel HH. Blood coagulation and fibrinolysis after long-duration treadmill exercise controlled by individual anaerobic threshold. *Eur J Appl Physiol.* 2003;90:639-42.

110. Lin CY, Chang SL, Fong YC, Hsu CJ, Tang CH. Apoptosis signal-regulating kinase 1 is involved in brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-enhanced cell motility and matrix metalloproteinase 1 expression in human chondrosarcoma. *Cells Int J Mol Sci.* 2013;14:15459-78.
111. Zelis R, Longhurst J, Capone RJ, Mason DT. A comparison of regional blood flow and oxygen utilization during forearm exercise in normal subjects and patients with congestive heart failure. *Circulation.* 1974;50:137-43.
112. Niebauer J, Cooke JP. Cardiovascular effects of exercise: role of endothelial shear stress. *J Am Coll Cardiol.* 1996;28:1652-60.
113. Chen J, Zhang C, Jiang H, Li Y, Zhang L, Robin A, et al. Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005;25:281-90.
114. Youn JY, Wang T, Cai H. An Ezrin/Calpain/PI3K/AMPK/eNOSs1179 signaling cascade mediating VEGF-dependent endothelial nitric oxide production. *Circulation Res.* 2008;104:50-9.
115. Cheng A, Wang S, Cai J, Rao MS, Mattson MP. Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain. *Dev Biol.* 2003. 258;319-33.