



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Daniel Alexandre Dias Ribeiro

**IMPACTO DO EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO NOS TEORES  
CIRCULANTES DO FATOR NEUOTRÓFICO DERIVADO  
DO CÉREBRO**

**VOLUME 1**

**Dissertação no âmbito do mestrado em Biocinética, orientada pela Professora Doutora Paula Cristina Vaz Bernardo Tavares e pelo Professor Doutor Frederico Guilherme de Sousa da Costa Pereira, apresentada à Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física, da Universidade de Coimbra.**

Outubro de 2021

1 2 9 0



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS DO DESPORTO  
E EDUCAÇÃO FÍSICA  
UNIVERSIDADE DE  
**COIMBRA**

**Impacto do Exercício Físico Aeróbio nos Teores Circulantes do Fator Neurotrófico  
Derivado do Cérebro (BDNF)**

Dissertação de Mestrado em  
Biocinética, apresentado à  
Faculdade de Ciências do Desporto  
e Educação Física da Universidade  
de Coimbra, com vista à obtenção  
do grau de mestre em Biocinética

**Orientadores:** Professora Doutora  
Paula Cristina Vaz Bernardo  
Tavares;  
Professor Doutor Frederico  
Guilherme de Sousa da Costa  
Pereira

**Daniel Alexandre Dias Ribeiro**

## AGRADECIMENTOS

Se as palavras têm, de facto, um potencial expressivo muito maior do que nós, através do texto que se segue, exponho e manifesto a minha profunda gratidão e os meus sinceros agradecimentos a um conjunto de pessoas que, sem qualquer exigência, imposição ou contrapartida, contribuíram e se envolveram, direta ou indiretamente, de forma a que a realização desta dissertação fosse possível.

As primeiras palavras dirigem-se, com toda a justiça, à professora e orientadora Professora Doutora **Paula Cristina Vaz Bernardo Tavares** por me ter despertado um interesse profundo na temática associada à fisiologia do exercício e ao qual se desenvolve o tópico da presente dissertação. Agradeço-lhe, ainda, pela disponibilidade total, orientação, conselhos, ensinamentos e reflexões que me foi proporcionando ao longo destes dois anos que, sem os quais, não seria, efetivamente, possível a concretização deste trabalho. Pelas razões supramencionadas, foi claramente uma satisfação enorme ter feito este percurso sob a sua orientação, esperando, francamente, que o futuro permita a sua persecução.

Ao coorientador, Professor Doutor **Frederico Guilherme de Sousa da Costa Pereira**, por todo o apoio logístico e coorientação que me proporcionou durante o período experimental da dissertação em causa, tendo o mesmo sido executado, graças à sua pessoa, em condições laboratoriais de excelência;

Ao Professor Doutor **Carlos Alberto Fontes Ribeiro**, diretor do Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental, da Faculdade de Medicina de Coimbra, por me ter consentido a possibilidade de desenvolver o trabalho experimental no Instituto supramencionado.

Ao Enfermeiro Veterinário e responsável pelo biotério localizado no Instituto de Investigação Clínica e Biomédica de Coimbra (iCBR), **Nuno Renato Lima**, pelos ensinamentos concernentes aos princípios éticos e comportamentais que devem acompanhar o uso e manuseio de animais de laboratório para fins de investigação científica;

Ao colega de turma e amigo, **Eduardo Miguel Dias de Sousa**, que tão generosamente colaborou na consecução do trabalho laboratorial, treino dos animais e apoio nas diversas vertentes e etapas que envolveram a componente experimental propriamente dita;

Às colegas de laboratório, **Edna Filipa Pais Soares** e **Julie Hélène dos Reis**, que contribuíram e se envolveram nos processos concernentes às recolhas plasmáticas e isolamento ao nível tecidual, assim como, igualmente, ao Doutor **António Francisco Ambrósio**, à **Ana Rita Gonçalves Gaspar** e à **Joana**

**Margarida Martins** pela colaboração e apoio na respetiva análise e leitura dos resultados, por meio do teste sorológico imunoenzimático ELISA;

Aos laços de amizade que Coimbra e que esta faculdade me obsequiaram, sem qualquer intenção de menção individual, de forma a não correr o risco de me esquecer dos múltiplos colaboradores e intervenientes que possibilitaram e participaram na elaboração deste trabalho, a vós, o meu sincero obrigado

Finalizando, agradeço, elevadamente, às pessoas mais importantes da minha vida; aos meus pais, à minha irmã, e às minhas avós por todo o apoio, empenho e incentivo que me foram proporcionando ao longo de todo o meu percurso académico.

A todos, muito obrigado.

Esta dissertação foi financiada pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT, Portugal): Speed, crash and run: exersomes boost neuroenergetics and mood in mice on speed project (MOOD EXERsomes, POCI-01-0145-FEDER-030786; PTDC/SAU-DES/30786/2017), Strategic Projects (UID/NEU/04539/2013 and UID/NEU/ 04539/2019), ), Strategic Project UIDB/04539/2020 and UIDP/04539/2020 (CIBB), COMPETE-FEDER (POCI-01-0145-FEDER-007440) and Centro 2020 Regional Operational Programmes (CENTRO-01-0145-FEDER-000012: HealthyAging2020 and CENTRO-01-0145-FEDER- 000008: BrainHealth 2020)

## RESUMO

**Introdução:** O benefício do exercício físico aparenta estar associado à síntese e libertação de substâncias neurotróficas. Estas substâncias constituem uma família de proteínas diméricas de fatores de crescimento, essenciais na diferenciação, crescimento e sobrevivência dos neurónios dopaminérgicos, colinérgicos e noradrenérgicos do sistema nervoso central, e dos neurónios simpáticos e sensoriais do sistema nervoso periférico. De acordo com a ampla rede de neurotrofinas descobertas e referenciadas, o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) desempenha um importante papel na relação entre o cérebro e o músculo. Contudo, existe uma ausência de evidências no que se refere à relação entre os benefícios da prática regular de atividade física e a cinética, quantificação e distribuição de BDNF -, entre compartimentos (*e.g.* sangue, músculo e cérebro). Neste sentido, pretendemos estudar o impacto de um protocolo aeróbio de longa-duração (quatro semanas), em ratos *Wistar*, nos teores periféricos e centrais de BDNF. Pretende-se, em particular, saber qual a concentração de BDNF no tecido cerebral (hipocampo e córtex cerebral) e no músculo esquelético (solear e gastrocnémios), bem como na circulação cerebral (jugular) e sistémica (veia da cauda).

**Métodos:** Foram utilizados 10 ratos, de estirpe *Wistar*, subdivididos, de forma aleatória, em dois grupos: um primeiro grupo de exercício (n=5), sujeito à prática de um protocolo progressivo de exercício aeróbio, de quatro semanas, e um segundo grupo de controlo (n=5). As colheitas plasmáticas foram recolhidas antes (T=0), durante (T=1, à segunda semana), pós-realização do protocolo (T=2, à quarta semana) e 24 horas após o T2 (T3), tanto para o grupo de exercício, como para o grupo de controlo. Os conteúdos plasmáticos, musculares e cerebrais foram analisados utilizando a técnica ELISA.

**Resultados:** Relativamente aos teores cerebrais, ocorreu uma diminuição significativa de BDNF tanto no córtex, como no hipocampo dos animais pertencentes ao grupo de exercício; em relação ao conteúdo tecidual do BDNF no músculo, verificou-se um aumento significativo tanto no gastrocnémios, como no solear dos animais referentes ao grupo de exercício. No que concerne aos valores plasmáticos, o exercício físico aparenta ter aumentado os valores de BDNF em T1 relativamente aos valores controlo. Os valores circulantes de BDNF regressaram, posteriormente, aos valores basais em T2, mantendo-se inalterados em T3 (24 horas após o fim do protocolo de exercício físico).

**Conclusões:** O exercício aeróbio aumentou os teores de BDNF no músculo esquelético, contudo diminuiu os teores desta neurotrofina nas duas regiões analisadas do cérebro. No entanto, os valores circulantes desta neurotrofina não parecem refletir os seus teores tecidulares, após o protocolo de exercício, no T3. Recorrendo apenas à análise dos níveis plasmáticos de BDNF, no contexto do exercício físico, parece ser insuficiente para se caracterizar a sua dinâmica de síntese e conseqüente libertação.

**Palavras-Chave:** Exercício, Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro, Plasma, Músculo, Cérebro.

## ABSTRACT

**Introduction:** The benefits from physical exercise appear to be associated with the synthesis and release of neurotrophic substances. These substances constitute a family of dimeric growth factor proteins that are essential in the differentiation, growth, and survival of dopaminergic, cholinergic, and noradrenergic neurons of the central nervous system, and of sympathetic and sensory neurons of the peripheral nervous system. According to the extensive network of discovered and referenced neurotrophins, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) seems to play an important role in the relationship between the brain and skeletal muscle; however, there is a lack of evidence concerning the relationship between the benefits of regular physical activity and the kinetics, quantification and distribution of the aforementioned substance - BDNF - between compartments (*e.g.* blood, muscle and brain). Therefore, the purpose is to study the impact of a long-term aerobic protocol (four weeks), in Wistar rats, on the peripheral and central levels of BDNF. We aim, in particular, to investigate the concentration of BDNF in the brain tissue (hippocampus and cerebral cortex) and skeletal muscle (soleus and gastrocnémios), as well as in the cerebral (jugular) and systemic (tail vein) circulation.

**Methods:** 10 Wistar rats were randomly divided into two groups: an exercise group (n=5), subjected to a four-week progressive aerobic exercise protocol, and a second control group (n=5). Plasma samples were collected before (T0), during (T1, at week two), after the protocol (T2, at week four) and 24-hours following T2 (T3), from both the exercise and the control group. Homogenized tissues from the muscle and brain were also analyzed following the sacrifice of animals, by ELISA.

**Results:** Regarding brain levels, there was a significant decrease of BDNF both in the cortex and in the hippocampus of the animals belonging to the exercise group; concerning the tissue content of BDNF in the muscle, there was a significant increase in both the gastrocnémios and the soleus of the animals from the exercise group. With regard to the plasmatic values, exercise appears to have increased BDNF concentration levels in T1, compared to the control values. Circulating BDNF values returned to baseline concentration levels at T2, remaining unchanged at T3 (24 hours after the end of the physical exercise protocol).

**Conclusions:** Aerobic exercise increased the levels of BDNF in the skeletal muscle, however it decreased the concentration levels of this neurotrophin in the two studied regions of the brain. However, the circulating values of this neurotrophic factor do not seem to reflect its tissue values following the exercise protocol, at T3. Merely analyzing BDNF plasma levels, in the context of physical exercise, seems to be insufficient to characterize the dynamics of its synthesis and consequent release.

**Key-Words:** Exercise, Brain-Derived Neurotrophic Factor, Plasma, Muscle, Brain

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>BBB</b>	Barreira Hematoencefálica ( <i>Blood-brain Barrier</i> )
<b>BDNF</b>	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro ( <i>Brain-derived Neurotrophic Factor</i> )
<b>CNS</b>	Sistema Nervoso Central ( <i>Central Nervous System</i> )
<b>DGAV</b>	Direcção-Geral de Alimentação e Veterinária ( <i>Portuguese National Authority for Animal Health</i> )
<b>ELISA</b>	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática ( <i>Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay</i> )
<b>eNOS</b>	Óxido Nítrico Endotelial ( <i>Endotelial Nitric Oxide</i> )
<b>FCDEF-UC</b>	Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física da Universidade de Coimbra ( <i>Faculty of Sport Sciences and Physical Education of the University of Coimbra</i> )
<b>FELASA</b>	Federação das Associações Europeias de Ciência de Animais de Laboratório ( <i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i> )
<b>FMUC</b>	Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra ( <i>Faculty of Medicine of the University of Coimbra</i> )
<b>FNDC5</b>	( <i>Fibroconectin type III Domain-Containing Protein 5</i> )
<b>GC</b>	Grupo de Controlo ( <i>Control Group</i> )
<b>GE</b>	Grupo de Exercício ( <i>Exercise Group</i> )
<b>iCBR</b>	Instituto de Investigação Clínica e Biomédica de Coimbra ( <i>Institute for Clinical and Biomedical Research</i> )
<b>IGF</b>	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 ( <i>Insulin-like Growth Factor</i> )
<b>Kda</b>	Quilodalton ( <i>Kilodalton</i> )
<b>LTD</b>	Depressão a Longo Prazo ( <i>Long-Term Depression</i> )
<b>LTP</b>	Potenciação a longo prazo ( <i>Long-Term Potentiation</i> )
<b>MAPK</b>	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno ( <i>Mitogen Activated Protein Kinases</i> )
<b>mBDNF</b>	Isoforma Madura de BDNF ( <i>Mature Form of BDNF</i> )
<b>mRNA<sup>NT4/5</sup></b>	ARN Mensageiro da NT-4/5 ( <i>RNA Messenger for NT-4/5</i> )
<b>NF-κB</b>	Fator Nuclear Kappa B ( <i>Nuclear Factor Kappa B</i> )



<b>NGF</b>	Fator de Crescimento dos Nervos ( <i>Nerve Growth Factor</i> )
<b>NO</b>	Óxido Nítrico ( <i>Nitric Oxide</i> )
<b>NT-3</b>	Neurotrofina-3 ( <i>Neurotrophin-3</i> )
<b>NT-4/5</b>	Neurotrofina-4/5 ( <i>Neurotrophin-4/5</i> )
<b>p75<sup>NTR</sup></b>	Recetor de Neurotrofina p75 ( <i>p75 neurotrophin receptor</i> )
<b>PBMC's</b>	Célula Sanguínea Periférica Mononuclear ( <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> )
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	Coativador-1 alfa do Recetor Ativado por proliferadores de Peroxissoma gama ( <i>Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator</i> )
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3-quinase ( <i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i> )
<b>PLC<math>\gamma</math>1</b>	( <i>Phospholipase C-<math>\gamma</math>1</i> )
<b>PO<sub>2</sub></b>	Pressão de Oxigénio ( <i>Pressure of Oxygen</i> )
<b>pro-BDNF</b>	Isoforma Proneurotrófica precursora do BDNF ( <i>BDNF Precursor Form</i> )
<b>Rho</b>	<i>Ras Homologous</i>
<b>RNAase</b>	<i>Ribonuclease</i>
<b>SMD</b>	Diferença média padronizada ( <i>Standardized Mean Difference</i> )
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central ( <i>Central Nervous System</i> )
<b>Trk</b>	Recetor de Tirosina Quinase ( <i>Tropomyosin Receptor Kinase</i> )
<b>TrkA</b>	Recetor de Tirosina Kinase A ( <i>Tropomyosin Receptor Kinase A</i> )
<b>TrkB</b>	Recetor de Tirosina Kinase B ( <i>Tropomyosin Receptor Kinase B</i> )
<b>TrkC</b>	Recetor de Tirosina Kinase C ( <i>Tropomyosin Receptor Kinase C</i> )

## ÍNDICE GERAL

LISTA DE ABREVIATURAS .....	iii
ÍNDICE DE TABELAS.....	vii
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	viii
INTRODUÇÃO .....	1
1. REVISÃO DA LITERATURA .....	5
1.1. Neurotrofinas: Breve Caracterização Molecular .....	5
1.1.1. Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) .....	8
1.1.2. Neurotrofina-4/5 (NT-4/5) .....	10
1.2. Compartimentalização das Neurotrofinas .....	12
1.2.1. Compartimentalização do BDNF .....	13
1.2.2. Compartimentalização da NT-4/5.....	14
1.3. Papel do Exercício Físico na Distribuição e Respetiva Quantificação dos Fatores Neurotróficos Entre Compartimentos.....	16
1.3.1. Exercício Físico, Distribuição e Quantificação do BDNF .....	17
1.3.2. Exercício Físico, Distribuição e Quantificação da NT-4/5 .....	22
2. OBJETIVOS.....	23
3. METODOLOGIA .....	24
3.1. Desenho do Estudo .....	25
3.2. Caracterização dos Animais Em Estudo .....	25
3.3. Protocolo de Treino dos Animais .....	26
3.4. Colheitas Sanguíneas .....	27
3.5. Isolamento dos Tecidos.....	28
3.6. Extração e Quantificação de BDNF .....	29
3.7. Análise Estatística.....	30
4. RESULTADOS .....	32
4. DISCUSSÃO .....	35
6. CONCLUSÕES.....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	39

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Clivagem das Proneurotrofinas. ....	6
<b>Figura 2.</b> As Neurotrofinas e os seus recetores. ....	8
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática da especificidade de ligação das isoformas de BDNF e os seus recetores. ....	10
<b>Figura 4.</b> Esquema das ações pleiotróficas do <i>activity-dependent</i> BDNF. ....	21
<b>Figura 5.</b> Organograma experimental. ....	25
<b>Figura 6.</b> <i>Treadmill</i> Control LE 8700 (Harvard Apparatus, s.d.) ....	26
<b>Figura 7.</b> Exemplificação do processo ELISA - Sandwich Assay Procedure. (Rab1138, Sigma-Aldrich, USA). ....	30

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Protocolo de treino dos animais.....	27
-------------------------------------------------------	----

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Evolução da massa corporal (peso) dos animais em estudo ao longo das quatro semanas de treino. ....	32
<b>Gráfico 2.</b> Impacto de quatro semanas de treino aeróbio nos teores de BDNF no Córtex Frontal [A] e no Hipocampo [B]. Os valores de BDNF foram determinados 24h após 4 semanas de exercício. ....	32
<b>Gráfico 3.</b> Impacto de quatro semanas de treino aeróbio nos teores de BDNF no músculo Gastrocnémios [A] e no músculo Solear [B]. Os valores de BDNF foram determinados 24h após 4 semanas de treino.....	33
<b>Gráfico 4.</b> Impacto de quatro semanas de treino aeróbio nos teores plasmáticos de BDNF obtidos da veia da cauda ao longo do tempo de exercício [A] e 24h após o plano de exercício [B]. ....	33
<b>Gráfico 5.</b> Impacto de quatro semanas de treino aeróbio nos teores plasmáticos de BDNF obtidos da veia Jugular [A] e Teores plasmáticos de BDNF obtidos da veia da Cauda no T3 [B]. ....	34

## INTRODUÇÃO

Durante uma grande parte da história da evolução do ser humano, as demandas de sobrevivência exigiram, insufismavelmente, quantidades extraordinárias de esforço físico (Archer e Blair, 2011). Quando o genoma do ser humano foi originalmente formado, o esforço físico diário era, de facto, imperioso, sendo que a sua própria fisiologia terá sido projetada para funcionar em tais circunstâncias em que o dispêndio energético, proveniente da atividade física realizada, era elevado (Eaton e Eaton, 2003). No entanto, o atual desenvolvimento tecnológico e a orientação das condições de vida para um formato tendencialmente mecanizado promoveram, subsequentemente, um estilo de vida sedentário sem precedentes (Eaton e Eaton, 2003). Ao longo do século passado, especialmente ao longo destes últimos 50 anos, as evidências epidemiológicas estabeleceram uma relação de causa-efeito, embora de forma não-intencional, entre a predileção da humanidade na procura de dispositivos que efetivamente economizavam o esforço e o dispêndio físico requerido no trabalho, com a consequente manifestação de múltiplas doenças associadas à inatividade física, aumentando, por sua vez, os níveis de morbidade e de mortalidade.

Assim, tal como supracitado, as evidências científicas sugerem que a inatividade física, profundamente relacionada com os hábitos cada vez mais sedentários da sociedade contemporânea, constitui-se como um fator de risco para o desenvolvimento de uma multiplicidade de doenças, tais como a diabetes, a depressão, as doenças cérebro-cardiovasculares, oncológicas e respiratórias (Dishman, et al., 2006; Serviço Nacional de Saúde, 2017). Em contrapartida, a literatura tem sugerido que a prática regular de atividade física infere, consequentemente, benefícios inquestionáveis sobre a saúde física e psicológica. De acordo com Mrówczyński (2019), a atividade física não evoca apenas mudanças e adaptações nas propriedades morfogénicas, metabólicas e contráteis dos músculos, como exerce, igualmente, efeitos múltiplos nos restantes tecidos e órgãos, melhorando, portanto, a competência física de todo o organismo. Acrescenta-se, ainda, a capacidade da atividade física influenciar a atividade hormonal (Misra, et al., 2016), os sistemas imunitários (Dongmei, et al., 2017), contribuir na redução do risco de incidência da osteoporose (Etherington, et al., 1996) e de diversos tipos de cancro, diabetes tipo 2 (Zembron-Lacny, et al., 2016), assim como participa, igualmente, no processo de plasticidade cerebral através da neurogénese (Cotman, et al., 2007)

Um dos mecanismos que explica as modificações que ocorrem na morfologia e na plasticidade do cérebro é através do exercício e a sua capacidade de estimular a produção, libertação e regulação de fatores de crescimento que, subsequentemente, potenciam as funções neuronais induzindo, por conseguinte, uma cascata de eventos que promovem os processos supramencionados de plasticidade estrutural e funcional do cérebro (Walsh e Tschakovsky, 2018).

Os fatores de crescimento constituem-se como proteínas responsáveis pela regulação de múltiplos aspetos da função celular que, por sua vez, envolvem os processos de sobrevivência, proliferação, migração e diferenciação (Friedman, 2012). Naturalmente, quando considerados no

contexto do sistema nervoso, os fatores de crescimento são frequentemente referidos na literatura como “fator neurotrófico” ou “neurotrofina”, pelo que estas se caracterizam como proteínas essenciais para o adequado desenvolvimento do sistema nervoso (Friedman, 2012). Até à data, quatro membros da família de fatores neurotróficos foram identificados, sendo eles o fator de crescimento dos nervos (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3) e, por fim, a neurotrofina-4 (NT-4), frequentemente designada na literatura contemporânea como neurotrofina-4/5 (NT-4/5) (Al-Qudah e Al-Dwairi, 2016). Cada fator neurotrófico supramencionado vincula-se a duas classes distintas e altamente especializadas de recetores de superfície celular que, posteriormente, lhes permite mediar as suas funções fisiológicas (Lippi, et al., 2019).

O BDNF, um dos fatores neurotróficos mais pormenorizadamente investigados, conecta-se ao recetor de tirosina quinase B (TrkB); a NT-4/5 inicia, também, a sua atividade biológica através da sua ligação ao TrkB (Kashyap, et al., 2018). Ora, pelo facto de quer o BDNF, como a NT-4/5 se ligarem ao mesmo recetor - TrkB -, tem-se admitido que os papéis que desempenham poderão ser, até certo ponto, relativamente semelhantes (Chung, et al., 2013). É de realçar, ainda, o facto de ambos os fatores neurotróficos anteriormente mencionados - BDNF e NT-4/5 - compartilharem mais de 50% da homologia na sua sequência genética (Hölscher, 2017).

Inicialmente, os fatores neurotróficos terão sido predominantemente estudadas no contexto do sistema nervoso, tendo-lhes sido consequentemente atribuído o papel de responsáveis pelo desenvolvimento e adequado funcionamento de todo o sistema nervoso; no entanto, as evidências mais recentes têm sugerido que as substâncias neurotróficas desempenham um papel mais amplo do que inicialmente se julgava (Sakuma e Yamaguchi, 2011); como tal, presentemente, os fatores neurotróficos têm sido alvo de estudo numa pluralidade de populações celulares de diversos sistemas e tecidos, quer de teor neuronal, como de teor não-neuronal (Sakuma e Yamaguchi, 2011; Sariola, 2001; Kashyap, et al., 2018).

Sabe-se, igualmente, que a regulação e expressão de cada transcrição neurotrófica é, frequentemente, modulada por meio de fatores externos como, por exemplo, a atividade neuronal (Madis, et al., 1993), o stress (Lauterborn, et al., 1998), as hormonas (*e.g.* estrogénio) (Singh, et al., 1995), a própria estação do ano (Molendijk, et al., 2012), a prática de exercício (Oliff, et al., 1998), entre outros exemplos.

Assim, embora as evidências na literatura não estejam em total concordância, tem havido, de facto, uma tentativa em examinar o impacto e a relação que o exercício infere na variação dos níveis de concentração e de expressão dos fatores neurotróficos presentes numa panóplia de compartimentos (*e.g.* cérebro, sangue e músculo).

Curiosamente, aparentam existir evidências que reportam o efeito positivo que o exercício aeróbio induz no aumento da expressão e concentração das substâncias neurotróficas, particularmente o BDNF (Mackay, et al., 2017; Maejima, et al., 2018; Lippi, et al., 2019; Jeon e Ha, 2017); por outro lado, contrariamente ao BDNF, a informação respeitante à relação entre os restantes fatores neurotróficos,

nomeadamente a NT-4/5, e o exercício aeróbio, aparenta ser escassa e estar pobremente caracterizada (Lippi, et al., 2019). Acrescenta-se, ainda, que até à data, não aparenta existir qualquer tipo de consenso entre autores no que diz respeito à relação entre o exercício físico, mais especificamente o exercício aeróbio, e a consequente indução de um aumento na concentração da NT-4/5 entre compartimentos.

Naturalmente, uma das possíveis explicações para as inconsistências e as divergências entre conclusões nos diversos estudos respeitantes à variação da concentração neurotrófica por meio da prática de um protocolo aeróbio, deve-se, num primeiro plano, à heterogeneidade das populações em causa para cada estudo, nas diferenças no tipo, intensidade e duração dos protocolos (Dinoff, et al., 2016); e, num segundo plano, deve-se, de acordo com Pareja-Galeano, et al. (2015), aos diversos protocolos de recolha utilizados nos diversos estudos como, por exemplo, as condições de processamento sanguíneo (*e.g.* plasma, soro ou o sangue completo), o momento da recolha, entre outras particularidades dos protocolos experimentais.

Uma das principais unicidades relacionada com o campo de estudo entre a relação do exercício aeróbio e a consequente variação da concentração dos fatores neurotróficos entre compartimentos centrais e periféricos, terá sido a descoberta da barreira hematoencefálica (BBB), estrutura essa que serve como uma interface dinâmica entre a periferia e o sistema nervoso central que permite o *crosstalk* de determinadas substâncias como, por exemplo, de polipeptídeos, nomeadamente de neurotrofinas e citocinas, entre os sistemas centrais e periféricos e *vice-versa* (Pan e Kastin, 1999).

Tal como supradito, tendo em conta que quer o BDNF, como a NT-4/5, iniciam a sua atividade intracelular via um recetor de superfície celular idêntico - TrkB -, torna-se curioso por que razão a relação entre a NT-4/5 e o exercício físico não tem sido tão pormenorizadamente estudada quando comparada com, por exemplo, o BDNF (Orgorn e Gardiner, 2010). Em segundo lugar, de acordo com Pan, et al. (1998), grande parte dos fatores neurotróficos, pertencentes à família neurotrófica dos mamíferos, - na qual se incluem as neurotrofinas BDNF e a NT-4/5 - atravessam a BBB através de sistemas de transporte altamente saturáveis, permitindo-lhes alcançar, de forma intacta, o SNC, sugerindo, portanto, a existência de um determinado mecanismo responsável pela produção neurotrófica induzida pelo exercício (Pedersen, 2019), resultando, consequentemente, num aumento na dificuldade de identificar e compreender qual o contributo e impacto que os tecidos centrais e periféricos, responsáveis pela produção, expressão, armazenamento e libertação de fatores neurotróficos, apresentam na quantificação das substâncias neurotróficas - BDNF e a NT-4/5 -, presentes nos níveis circulantes.

Neste sentido, através da experimentação em ratos machos, adultos, de estirpe *Wistar*, o objetivo deste trabalho é compreender, primeiramente, se ocorre, de facto, uma variação (aumento) na quantificação da substância neurotrófica de BDNF presentes nos teores circulantes como consequência da realização de um protocolo de exercício aeróbio de quatro semanas e, num segundo plano, o propósito é perceber qual o contributo que a circulação cerebral e a circulação periférica apresentam nos níveis circulantes da neurotrofina BDNF após a realização de um protocolo aeróbio de longa-duração.



Pretendemos, também, averiguar qual o contributo da produção cerebral e muscular nos teores circulantes destas substâncias neurotróficas, assim como investigar as diferenças dos valores de concentração de BDNF presentes num músculo maioritariamente constituído por fibras do tipo I (músculo solear) e outro por fibras do tipo II (músculo gastrocnémios).

## 1. REVISÃO DA LITERATURA

O Fator de Crescimento dos Nervos (NGF) terá sido descoberto na década de 1950 pelos cientistas Rita Levy Montalcini e Viktor Hamburger enquanto estudavam o desenvolvimento do sistema nervoso e a sua relação na inervação das estruturas periféricas (Levi-Montalcini, 1987). Os fatores de crescimento constituem-se como proteínas responsáveis pela regulação de múltiplos aspetos da função celular (Friedman, 2012). Quando tidos em conta no contexto do sistema nervoso, os fatores de crescimento são frequentemente referidos na literatura como “fator neurotrófico” ou “neurotrofina”, pelo que estas se caracterizam como proteínas essenciais para o adequado desenvolvimento do sistema nervoso desde os estágios mais embrionários. Ao longo do processo de desenvolvimento embrionário, estes fatores qualificam-se como sendo fundamentais na regulação da sobrevivência neuronal, na determinação do desenlace celular e no estabelecimento de uma conectividade adequada (Friedman, 2012). Desde então, já se identificaram uma multiplicidade de proteínas neurotróficas presentes, tanto no sistema nervoso central (SNC) e periférico, como no exterior do sistema anteriormente referenciado sugerindo, portanto, a existência de uma pluralidade de interações entre fatores de crescimento e populações celulares quer ao longo do período de desenvolvimento, quer durante a vida adulta (Platholi e Lee, 2018; Sariola, 2001).

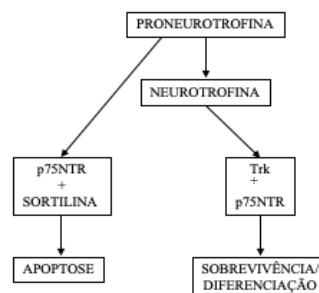
### 1.1. Neurotrofinas: Breve Caracterização Molecular

As neurotrofinas constituem uma família de proteínas diméricas estruturalmente semelhantes de fatores de crescimento responsáveis pela sobrevivência, desenvolvimento, plasticidade e, em determinadas circunstâncias, na conseqüente morte neuronal, expressando-se, naturalmente, de forma diferenciada quer ao nível do SNC, quer ao nível periférico (Binder e Scharfman, 2004; Sahay, et al., 2017). Estas substâncias neurotróficas estão sujeitas a um processo de modificação daquelas que são as características que inicialmente apresentam, ou seja, numa primeira fase, ocorre a síntese dos precursores (proneurotrofinas) que, após a sua clivagem proteolítica, são concludentemente consideradas neurotrofinas maduras, biologicamente ativas (Lee, et al., 2001; Lessman, et al., 2003). A clivagem proteolítica poderá ocorrer no interior da célula por plasmina e furina ou, noutras circunstâncias, no espaço extracelular por metaloproteinase matriz (Kashyap, et al., 2018). Se por um lado os precursores neurotróficos apresentam uma configuração sequencial de sensivelmente 250 aminoácidos e conseqüente peso de 30-35 kDa, por outro, após a clivagem proteolítica, as proteínas neurotróficas maduras tendem a apresentar um formato de sequência de aproximadamente 120 aminoácidos, cujo tamanho tende a rondar os 13 kDa (Kashyap, et al., 2018; Chao, 2003), formando, por sua vez, homodímeros não-covalentemente associados (Skaper, 2017). Em mamíferos, quatro membros da família neurotrófica foram identificados, sendo eles o fator de crescimento dos nervos

(NGF), o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), a neurotrofina-3 (NT-3) e a neurotrofina-4/5 (NT-4/5) (Platholi e Lee, 2018).

As substâncias neurotróficas supramencionadas apresentam propriedades estruturais e químicas similares na medida em que compartilham mais de 50% de homologias de sequência na estrutura primária, pesos moleculares equivalentes, três ligações dissulfeto que por sua vez formam um nó de cisteína e, por fim, pontos isoeletricos que variam de 9 a 10 (Al-Qudah e Al-Dwairi, 2016). Apesar das neurotrofinas apresentarem características bioquímicas semelhantes com domínios variáveis, as mesmas ligam-se a recetores específicos, resultando em efeitos biológicos profundamente diferenciados (Teixeira, et al., 2010). Assim, diferentes tipos de neurotrofinas apresentam especificidades de ligação para recetores próprios, ativando cascatas de sinalização responsáveis pela modulação, desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso de vertebrados (Candalija, et al., 2014). A atividade biológica das neurotrofinas decorre através da sua ligação a dois tipos de recetores de membrana: o recetor de tropomiosina quinase (Trk) e os recetores de neurotrofina p75 (p75<sup>NTR</sup>) (Pincelli, 2017). De uma forma generalizada, se por um lado as formas quer pro-neurotróficas como as maduras são capazes de se vincularem ao recetor p75<sup>NTR</sup>, por outro, apenas as formas neurotróficas maduras apresentam a capacidade de ligação aos recetores Trk (Sánchez-Sánchez e Arévalo, 2017).

O recetor p75<sup>NTR</sup> terá sido o primeiro recetor a ser identificado e associado ao NGF, tendo sido inicialmente caracterizado como um recetor de baixa afinidade para todas as neurotrofinas (Kojima e Mizui, 2017). O mesmo pertence à família de recetores do fator de necrose tumoral (TNFR) (Ruggeri, et al., 2013) todavia, contrariamente à classe de recetores Trk, o p75<sup>NTR</sup> une-se tanto à forma proneurotrófica, como à forma neurotrófica madura de maneira não-seletiva (Janssens, et al., 2017) podendo atuar, também, segundo um co-recetor de alta complexidade dos recetores Trk (Chao, 2003). Assim sendo, as evidências sugerem que as ações biológicas por parte das neurotrofinas podem ser reguladas através da clivagem proteolítica na qual as pro-formas, juntamente com a proteína sortilina, se vinculam, preferencialmente, ao p75<sup>NTR</sup> que, conseqüentemente, origina a apoptose celular ou, por outro lado, subsistir uma ligação do p75<sup>NTR</sup> às substâncias maduras que, por conseguinte, ativam, de forma seletiva, os recetores Trk promovendo a sobrevivência e a diferenciação celular (Chao, 2003).

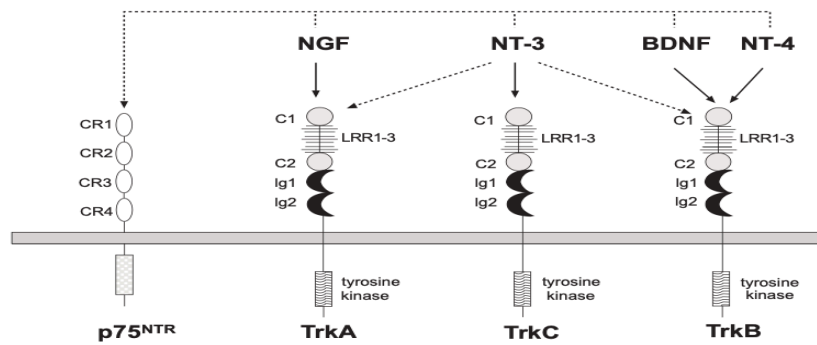


**Figura 1. Clivagem das proneurotrofinas.** As proneurotrofinas ligam-se ao complexo recetor p75<sup>NTR</sup> e à sortilina, induzindo a apoptose; as neurotrofinas maduras ligam-se ao recetor Trk juntamente ao p75<sup>NTR</sup> de forma a promover a sobrevivência e a diferenciação celular (Friedman, 2012).

A ativação do recetor p75<sup>NTR</sup> resulta, subsequentemente, na estimulação de uma panóplia de vias de sinalização, sendo eles o fator nuclear-κB (*NF-κB*), a via *Jun Kinase* e, por último, a ativação do processo de regulação da proteína *Ras Homologous (Rho)* (Kojima e Mizui, 2017; Skaper, 2017). Primeiramente, a ativação do *NF-κB* resulta na transcrição de múltiplos genes que promovem a sobrevivência neuronal; a ligação da *Jun Kinase*, via o recetor p75<sup>NTR</sup>, determina, em consequência, a apoptose neuronal; por fim, através da regulação e envolvimento da atividade de *Rho*, decorre, consequentemente, a motilidade do cone de crescimento (Kojima e Mizui, 2017).

O p75<sup>NTR</sup> aparenta estar amplamente expresso em todo o SNC ao longo da evolução maturacional porém, após o período de desenvolvimento, a sua expressão tende a ser reduzida, sendo que em adultos é apenas encontrado em determinadas zonas do cérebro (Friedman, 2012). Embora o papel do p75<sup>NTR</sup> na promoção da apoptose seja a função melhor descrita nas evidências atuais, a literatura também tem descrito a influência que este recetor desempenha nas inúmeras funções celulares incluindo o crescimento neuronal, a regulação do ciclo celular, a mielização das células especializadas denominadas de “células de Schwann”, assim como a regulação da depressão a longo prazo (LTD) através dos neurónios do hipocampo (Carter, et al., 2004; Friedman, 2012). Pode-se, portanto, concluir que a função deste recetor é profundamente influenciada pelo seu contexto celular (Friedman, 2012).

Quanto ao recetor Trk, o mesmo possui três domínios; um de teor extracelular, um único domínio transmembranar e outro intracelular que contém o domínio de tirosina quinase catalítica (Al-Qudah e Al-Dwairi, 2016). Os domínios anteriormente descritos poderão fazer parte de uma única proteína ou então encontrarem-se distribuídos entre múltiplas proteínas que interagem entre si (Kashyap, et al., 2018). Os recetores Trk apresentam uma atividade-quinase intrínseca, pelo que se dimerizam após a ligação ao ligante dimérico neurotrófico (Friedman, 2012). Existem três membros da família Trk: a tirosina quinase A (TrkA), tirosina quinase B (TrkB) e a tirosina quinase C (TrkC), codificados, respetivamente, pelos genes *Ntrk1*, *Ntrk2*, *Ntrk3* na nomenclatura genómica de ratos e pelos genes *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3* do ser humano (Green, et al., 2012). A ligação das neurotrofinas aos seus respetivos recetores consiste numa etapa essencial para mediar os efeitos desses fatores na sobrevivência e diferenciação neuronal (Friedman, 2012); como tal, cada neurotrofina madura associa-se a um recetor de ligação Trk próprio; assim, o NGF liga-se, preferencialmente, ao TrkA; o BDNF e a NT-4 ao TrkB; e a NT-3 ao recetor TrkC, embora seja igualmente capaz de se ligar aos recetores TrkA e TrkB (Janssens, et al., 2017). Os recetores TrkB e TrkC encontram-se amplamente expressos nas células neuronais quer do SNC, quer do sistema nervoso periférico, no entanto, a expressão do recetor TrkA encontra-se mais circunscrita a subtipos neuronais específicos como, por exemplo, nos neurónios simpáticos do proencéfalo basal (Sobreviela, et al., 1994).



**Figura 2. As neurotrofinas e os seus recetores.** As neurotrofinas maduras exibem interações específicas com três tipos de recetor Trk: o NGF vincula-se ao TrkA, o BDNF e a NT-4 ao TrkB e a NT-3 ao TrkC. Em determinadas situações, a NT-3 pode igualmente ativar o recetor TrkA e/ou TrkB, embora com menor afinidade e eficiência. Todas as neurotrofinas ligam-se ao recetor p75<sup>NTR</sup> (Skaper, 2008).

Como é sabido, e já anteriormente referido, apenas as neurotrofinas maduras ativam os recetores Trk, sendo que resultam, através deste processo de ligação, três vias principais de sinalização: a via *Ras*, *Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)* e a via *Phospholipase C- $\gamma$ 1 (PLC- $\gamma$ 1)* (Huang e Reichardt, 2003). A ativação da via *Ras* controla a sobrevivência e a diferenciação através da ativação das cascatas da proteína quinase ativada pela enzima MAPK; *PI3K* medeia inúmeras funções neuronais como, por exemplo, a sobrevivência e crescimento neuronal por meio da ativação da proteína quinase B, igualmente conhecida como AKT; por último, a ativação da via *PLC- $\gamma$ 1* é responsável, principalmente, pelo controlo da plasticidade sináptica dependente da atividade (Deinhardt e Chao, 2014; Al-Qudah e Al-Dwairi, 2016).

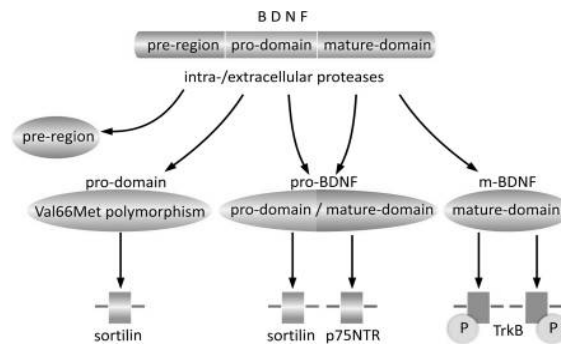
### 1.1.1. Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF)

O Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) afigura-se, na literatura, como uma neurotrofina abundantemente expressa no cérebro, desempenhando um papel relevante na sobrevivência, diferenciação, morfogénese neuronal e na plasticidade sináptica do sistema nervoso (Binder e Scharfman, 2004; Zheleznyakova, et al., 2016). As evidências atuais sugerem um envolvimento do BDNF numa ampla rede de processos neurofisiológicos com base nas características-padrão da sua síntese que envolvem uma multiplicidade de isoformas biologicamente ativos que, como resultado, interagem com diferentes recetores, provocando uma pluralidade de cascatas de sinalização (Kowiański, et al., 2018).

O BDNF é inicialmente biosintetizado no interior do retículo endoplasmático segundo um precursor pre-pro-BDNF (Foltran e Diaz, 2016). Após a translocação no complexo de Golgi, a sequência de sinal da pro-região é clivada, resultando na formação do isoforma proneurotrófico precursor do BDNF (pro-BDNF), com um peso molecular de aproximadamente 32 kDa (Kowiański, et al., 2018; Philips, 2017). Posteriormente, o pro-BDNF é clivado de forma a originar o isoforma maduro deste fator

neurotrófico (mBDNF), representando um peso molecular de, sensivelmente, 14 kDa (Foltran e Diaz, 2016; Philips, 2017). A clivagem proteolítica do pro-BDNF poderá ocorrer ao nível intracelular, através da atividade enzimática - PC7, furina e pró-convertases - (Lu, et al., 2005; Wetsel, et al., 2013) ou, por outro lado, decorrer ao nível extracelular por intermédio das protéases - metaloproteínases e plasmina (Mizoguchi, et al., 2011; Deinhardt e Chao, 2014). Ambas as formas, quer pro-BDNF, como a mBDNF são posicionadas no interior das vesículas para a sua subsequente secreção para o espaço extracelular que, conseqüentemente, permite a manifestação da sua ação fisiológica (Philips, 2017; Kowiański, et al., 2018). A proporção entre o pro-BDNF e o mBDNF no cérebro e nas regiões limítrofes varia de acordo com o estágio de desenvolvimento; assim, enquanto que no período pós-natal inicial se verifique uma concentração elevada de pro-BDNF, o mBDNF aparenta prevalecer em idades mais adultas (Yang, et al., 2014). Acrescenta-se, ainda, que a forma madura do BDNF - mBDNF - é idêntico entre mamíferos (Maisonpierre, et al., 1991). Naturalmente, cada isoforma biológico deste fator neurotrófico apresenta uma função diferenciada; as evidências têm sugerido que o pro-BDNF pode ser considerado um fator relevante na modulação da função cerebral, sobretudo ao longo do processo de desenvolvimento. Segundo Kowiański, et al. (2018), a ligação do pro-BDNF a recetores específicos desencadeia, por sua vez, determinadas vias de sinalização responsáveis por determinar o “destino” neuronal (morte ou sobrevivência neuronal); contrariamente, o mBDNF constitui-se como sendo proeminente para os processos que ocorrem na vida adulta, nomeadamente na neuroprotecção e neuroplasticidade (Kowiański, et al., 2018).

Quanto aos recetores e conseqüente ativação das cascatas de sinalização a partir dos isoformas de BDNF, o pro-BDNF medeia as suas ações biológicas vinculando-se, preferencialmente, ao recetor p75<sup>NTR</sup> através do seu domínio maduro ou, noutros contextos, através do recetor de sortilina via o seu pro-domínio (Kowiański, et al., 2018); por outro lado, o mBDNF une-se, através do seu domínio maduro, ao recetor TrkB - recetor esse tipicamente caracterizado por ser de alta afinidade (Villanueva, 2013; Reichardt, 2006). A literatura tem demonstrado que a ativação de uma complexa via de recetores, formada pela união da forma proneurotrófica ao p75<sup>NTR</sup>, juntamente com a sortilina, interferem na redução da complexidade e densidade da coluna vertebral (Zagrebelsky, et al., 2005), induzem, também, a depressão a longo prazo (Woo, et al., 2005), promovem a apoptose celular (Teng, et al., 2005), assim como participam, por sua vez, no processo de promoção da organização dos circuitos neurais (Villanueva, 2013). Em contrapartida, constata-se que a ligação do mBDNF ao recetor TrkB infere numa extensa rede de modificações como, por exemplo, o aumento da sobrevivência e diferenciação celular, a potenciação a longo prazo (LTP), na plasticidade sináptica e a remodelação das redes neuronais (Philips, 2017).



**Figura 3. Representação esquemática da especificidade de ligação dos isoformas de BDNF e os seus recetores.** Como consequência da clivagem intra/extracelular, a divisão da sequência primária do pre-pro-BDNF é consequentemente dividido em isoformas funcionais biologicamente ativos denominados de: pro-domínio, pro-BDNF e mBDNF, pelo que, cada uma apresenta especificidades de ligação próprias a cada tipo de recetor. O isoforma pro-BDNF, que apresenta dois tipos de sequência (pro-domínio e o domínio maduro), interage com recetores específicos (sortilina e o recetor p75<sup>NTR</sup>, respetivamente). O domínio maduro do BDNF, sendo o único constituinte do isoforma do mBDNF, exibe uma elevada afinidade para com o recetor TrkB que, após uma estimulação, sofre homodimerização e autofosforilação (Kowiański, et al., 2018).

### 1.1.2. Neurotrofina-4/5 (NT-4/5)

A neurotrofina-4 (NT-4), também consignada como neurotrofina-4/5 (NT-4/5), pertencente à família de fatores neurotróficos, constitui-se, na literatura contemporânea, como a neurotrofina menos estudada e compreendida (Zhang, et al., 2000). Esta substância neurotrófica estimula a sobrevivência dos neurónios motores e dos neurónios sensoriais (Gu, et al., 2015), assim como promove, igualmente, a sobrevivência e a diferenciação dos neurónios noradrenérgicos e dopaminérgicos do hipocampo (László, et al., 2019), apresentando, também, uma forte ação na sobrevivência e proliferação das células NIH 3T3 que expressam o TrkB; no entanto, para que as mesmas células expressem o recetor TrkA, a sua atividade torna-se substancialmente reduzida (Fitzgerald, et al., 2001). Este fator neurotrófico desempenha, ainda, uma ação relevante na proteção contra os danos provocados pelo stress oxidativo (Lingor, et al., 2000).

Para além do facto deste peptídeo ter sido o último da família neurotrófica a ser descoberta, assim como a menos estudada, múltiplos aspetos diferenciam a NT-4/5 dos restantes membros da família de fatores neurotróficos (Ibáñez, 1996). Assim, apesar da sua expressão ser ubiquamente presente e menos influenciada pelos fatores externos, a NT-4/5 encontra-se presente em níveis substancialmente inferiores quando comparada com qualquer outro fator neurotrófico (Timmusk, et al., 1993).

A NT-4/5 terá sido originalmente identificada nos *Xenopus/Viper* sendo que, posteriormente, terá sido descoberta em ratos e humanos (Fitzgerald, et al., 2001). Do ponto de vista da sua biologia molecular, as formas maduras da NT-4/5 do rato e a do ser humano, apresentam uma identidade de sequência de 95% (Fitzgerald, et al., 2001). De acordo com as propriedades físico-químicas da NT-4/5, o precursor desta substância neurotrófica apresenta uma cadeia de 210 aminoácidos em seres humanos e de 209 em ratos, respetivamente, pelo que, após a sua clivagem proteolítica e consequente remoção

da sua forma pre-pro-peptídica, a configuração madura desta neurotrofina constitui uma cadeia de 130 aminoácidos tanto no humano, como no rato (Fitzgerald, et al., 2001), com um peso molecular de aproximadamente 14 kDa (Dąbkowska, et al., 2017). Ambas as espécies - humano e rato - apresentam uma configuração de três ligações dissulfeto, tal como se verifica, semelhantemente, nas estruturas neurotróficas NGF, BDNF e a NT-3 (Fitzgerald, et al., 2001).

Após a translocação e clivagem da forma pre-pro-peptídica da NT-4/5 e consequente libertação da mesma segundo uma proteína madura, biologicamente ativa, responsável por atuar conforme um homodímero não-covalentemente ligado, a mesma desencadeia, por sua vez, a fosforilação do recetor TrkB traduzindo, assim, os seus efeitos tróficos nos neurónios (Berkemeier, et al., 1991; Pasutto, et al., 2009).

Desta forma, é possível constatar que a especificidade de ligação dos fatores neurotróficos do BDNF e da NT-4/5, nas suas formas maduras, são, preferencialmente, o mesmo recetor de ligação: TrkB (Robinson, et al., 1999), porém, apesar de ambas as neurotrofinas apresentarem especificidades de ligação ao mesmo recetor - TrkB -, a posterior ativação das mesmas ao recetor difere dependendo do grau de ubiquitinação de cada fator neurotrófico; como tal, apesar dos mecanismos responsáveis pelo fenómeno não serem inteiramente conhecidos, sabe-se que o BDNF induz uma ubiquitinação mais rápida ao recetor TrkB; antagonicamente, a NT-4/5 desencadeia uma ubiquitinação mais lenta (Proença, et al., 2016; Sánchez-Sánchez e Arévalo, 2017).

Contrariamente à sua forma madura, a forma pro-neurotrófica da NT-4/5 conecta-se, preferencialmente, ao recetor p75<sup>NTR</sup> (Meeker e Williams, 2015).



## 1.2. Compartimentalização das Neurotrofinas

Os fatores neurotróficos representam uma família de polipeptídeos que, em consequência, se agregam a um grupo denominado de “fatores de crescimento” (Sahay, et al., 2017). Para além dos fatores neurotróficos apresentarem, entre si, semelhanças na estrutura, na utilidade de recetor, assim como nas atividades fisiológicas, constituem-se, igualmente, como proteínas essenciais para o desenvolvimento do sistema nervoso (Tometten, et al., 2005). Embora um vasto leque de evidências sugiram que uma multiplicidade de moléculas de sinalização multifuncionais como, por exemplo, os fatores de crescimento de fibroblastos, fatores de crescimento transformadores e proteínas morfogénicas ósseas atuem, de facto, segundo fatores neurotróficos, a classe propriamente dita dos fatores neurotróficos pressupõe e geralmente apenas inclui as moléculas que incidam, preferencialmente, sobre as células neuronais, porém, esta definição causa, de certa forma, um determinado grau de ambiguidade visto que alguns fatores neurotróficos típicos como a NT-3, o BDNF, entre outros, afetam igualmente processos morfogénicos críticos que ocorrem no exterior do sistema nervoso, inclusive em determinadas estruturas celulares de teor não-neuronal (Yamamoto, et al., 1996; Sariola, 2001; Xiao e Le, 2016).

Pelo facto destas substâncias neurotróficas serem conhecidas particularmente pela sua função ao nível da determinação e desenlace neuronal, a comunidade científica debruçou e cingiu a sua atenção, predominantemente, para o contexto e relação que estas substâncias apresentavam no sistema nervoso, contudo, a produção científica mais recente tem sugerido que as neurotrofinas desempenham, de facto, um papel mais amplo do que aquilo que inicialmente se julgava (Sakuma e Yamaguchi, 2011). Assim sendo, para além de se constatar que estas substâncias e os seus respetivos recetores estejam efetivamente presentes e sejam consequentemente expressas no sistema nervoso, sabe-se, também, que as mesmas se encontram presentes através da sua produção, expressão e armazenamento no exterior do sistema anteriormente referenciado, através das células não neuronais (Matsuda, et al., 1988; Sariola, 2001; Höglund, et al., 2002; Dagnell, et al., 2010) que, por sua vez, atuam num conjunto diversificado de cascatas de sinalização e mecanismos responsáveis pela ativação de determinados processos como, por exemplo, a indução de efeitos anti-inflamatórios, assim como de proliferação e diferenciação nos tecidos não-neuronais (Prakash, et al., 2010; Xiao e Le, 2016). Conclui-se, portanto, que uma pluralidade de sistemas, compartimentos e estruturas celulares periféricos sejam também responsáveis pela secreção de fatores neurotróficos, assim como na consequente expressão dos recetores dos mesmos (Ghinelli, et al., 2003; Nockher e Renz, 2005; Al-Qudah e Al-Dwairi, 2016). De entre a multiplicidade de sistemas, estruturas e células periféricas responsáveis pela produção e expressão dos fatores neurotróficos e os seus respetivos recetores -  $p75^{NTR}$  e Trk - destacam-se, por exemplo, o sistema imunitário, os sistemas gastrointestinal e geniturinário, a mucosa nasal, os queratinócitos, o tecido epitelial visceral, as células endoteliais e os fibroblastos, o músculo cardíaco e, por fim, uma variedade de músculos esqueléticos (Nockher e Renz, 2003; Nockher e Renz, 2005; Prakash, et al., 2010; Al-Qudah e Al-Dwairi, 2016).

### 1.2.1. Compartimentalização do BDNF

O BDNF terá sido originalmente identificado através de homogeneizado de cérebro de porco, através do qual, terá sido reconhecido e atribuído o seu papel e função no crescimento e sobrevivência dos neurónios sensoriais (Barde, et al., 1982).

Atualmente, reconhece-se uma extensa rede de tecidos responsáveis pela produção, expressão e consequente libertação de fatores neurotróficos (Walsh e Tschakovsky, 2018; Tarassova, et al., 2020). As evidências verificaram que tanto o BDNF como o seu recetor correspondente, TrkB, são amplamente expressos quer no sistema nervoso em desenvolvimento, quer no sistema nervoso adulto (Kashyap, et al., 2018), porém, apesar das funções exaustivamente descritas desta substância neurotrófica no que concerne ao seu papel no crescimento, desenvolvimento e sobrevivência neuronal no sistema nervoso (Lommatzsch, et al., 1999), sabe-se que este fator neurotrófico também é produzido, expresso e armazenado no exterior deste sistema (Yamamoto, et al., 1996; Nakagomi, et al., 2015) a partir de tecidos não-neuronais (Leßmann e Brigadski, 2009), contribuindo, dessa forma, para o desenvolvimento de processos como a homeostasia metabólica e outros que ocorrem, por exemplo, nos sistemas imunitário e vascular (Dechant e Neumann, 2003; Bathina e Das, 2015; Nakagomi, et al., 2015).

Em relação ao padrão de expressão do BDNF no cérebro e sistema nervoso central, detetaram-se elevados níveis do mesmo no hipocampo, amígdala, cerebelo e córtex cerebral - tanto para os roedores, como em humanos - com uma expressão tendencialmente superior encontrada nos neurónios do hipocampo (Timmusk, et al., 1993; Miranda, et al., 2019); contudo, detetou-se a presença da mesma, embora em quantidades relativamente inferiores, numa panóplia de estruturas periféricas como, por exemplo, no fígado, coração, pulmões, rins, bexiga, músculo esquelético, células endoteliais, monócitos, plaquetas, soro, plasma, assim como nos linfócitos T e B (Yamamoto e Gurney, 1990; Maisonpierre, et al., 1991; Karege, et al., 2002; Fujimura, et al., 2002; Schimdt e Duman, 2010 (Kerschensteiner, et al., 1999) que, conseqüentemente, poderão ser, também, parcialmente responsáveis pelas respetivas alterações na quantificação desta substância neurotrófica nos teores circulantes, assim como na quantificação do mesmo nas restantes estruturas centrais e periféricas, através de um mecanismo de intercâmbio de substâncias denominado de *crosstalk* neurotrófico (Schimdt e Duman, 2010; Szuhany, et al., 2015; Pedersen, 2019). Quanto ao sangue, o BDNF encontra-se maioritariamente armazenado nas plaquetas sendo que o mesmo é, por norma, apenas libertado mediante um determinado estímulo (Karege, et al., 2002; Radka, et al., 1996). As plaquetas, no entanto, por si só, não produzem BDNF pelo que são, predominantemente, responsáveis pelo armazenamento do mesmo (Teixeira, et al., 2010). O plasma possui, também, embora em níveis substancialmente inferiores, BDNF, sendo que se tem hipotetizado que o mesmo - BDNF plasmático - poderá desempenhar um papel fisiológico caracteristicamente diferente de, exemplificativamente, aquele presente nas plaquetas (Fujimura, et al., 2002; Lommatzsch, et al., 2005; Tarassova, et al., 2020). Radka, et al. (1996), que visou compreender os níveis de BDNF no plasma e no soro do ser humano, concluiu que as plaquetas são, de facto, a fonte

prevalente de BDNF no soro, pelo que, segundo Rosenfeld, et al. (1995) e Fujimura et al. (2002), os níveis de BDNF presentes no soro são, sensivelmente, 200 vezes superior ao valor presente no plasma. Assim, numa circunstância em que o objetivo seja efetivamente estudar os níveis circulantes de BDNF, considera-se mais apropriado que se recorra à análise serológica ao invés de utilizar, por exemplo, o plasma como forma de mensuração e de quantificação (Teixeira, et al., 2010).

É de realçar, uma vez mais, que o BDNF circulante origina de múltiplas fontes localizados quer na periferia - *e.g.* músculo, células endoteliais, *etc.* -, quer de fontes centrais - *e.g.* o cérebro -, através da BBB que é, por sua vez, permeável em ambas as direções (Baliotti, et al., 2018; Fujimura, et al., 2002; Nakahashi, et al., 2000; Tarassova, et al., 2020), tanto em modelos animal (Pan, et al., 1998), como em humanos (Krabbe, et al., 2007). Destaca-se, ainda, que em estudos realizados em humanos *in vivo*, a forma mais viável de avaliar e quantificar as variações ao nível do BDNF é medindo, por sua vez, o BDNF periférico presente ou no plasma, ou, então, naquele presente no soro sanguíneo (Tarassova, et al., 2020).

Conclui-se, portanto, segundo a análise de Maisonpierre, et al. (1991), que a distribuição de BDNF entre compartimentos - sistema nervoso e tecidos periféricos - aparenta ser relativamente semelhante entre a espécie humana e a dos ratos corroborando, dessa forma, com a premissa de que o BDNF dispõe, de facto, de um papel fisiológico semelhante entre as duas espécies de mamíferos anteriormente citados.

### 1.2.2. Compartimentalização da NT-4/5

Quanto à NT-4/5, esta proteína caracteriza-se como sendo o membro menos estudado da família de substâncias neurotróficas em mamíferos porém, os seus efeitos tróficos nos neurónios quer ao nível central, quer ao nível periférico, têm sido robustamente evidenciados tanto nos estudos que têm recorrido ao método *in vitro*, como naqueles que têm utilizado o método *in vivo* (Ibáñez, 1996; Zhang, et al., 2000). A NT-4/5 distingue-se das restantes neurotrofinas pela sua expressão ser, embora em quantidades substancialmente inferiores, ubiquamente presente e menos influenciada pelos fatores externos (Ibáñez, 1996).

Contrariamente aos restantes fatores neurotróficos - BDNF, NGF e a NT-3 -, as informações respeitantes aos locais de síntese da NT-4/5 eram, de acordo com Timmusk, et al. (1993), pouco estudadas e, em consequência, pobremente caracterizadas. Até então, tinham sido detetados baixos níveis de secreção de mRNA<sup>NT4/5</sup> nos embriões de rato, no cérebro do rato adulto, assim como em determinados tecidos periféricos tanto no humano, como no rato (Berkemeier, et al., 1991; Ip, et al., 1992). Mais tarde, numa tentativa de explorar a síntese, expressão e distribuição da NT-4/5 entre os tecidos, Timmusk, et al. (1993) recorreu, numa primeira fase, à técnica *Northern Blot* e, numa segunda, à técnica de medição quantitativa de RNAase (ribonuclease), na qual se pôde efetivamente constatar a presença deste fator neurotrófico numa totalidade de 12 tecidos periféricos - *e.g.* coração, fígado,

músculo esquelético, pele, glândulas endócrinas, rins, timo, testículos, *etc* -, assim como nas múltiplas zonas integrantes do sistema nervoso central, maioritariamente ao nível cerebral; contudo, em concordância com as evidências anteriores, constatou-se a presença da mesma em quantidades substancialmente reduzidas quando comparada com qualquer outro fator neurotrófico. Segundo Friedman, et al. (1998), no que diz respeito à localização desta substância neurotrófica no cérebro do rato em desenvolvimento e no rato considerado adulto, comprovou-se a presença da mesma no hipocampo e no córtex cerebral de ambos, embora com ligeiras variações ao nível da sua quantificação. Szczepankiewicz, et al. (2012) detetou a presença desta substância neurotrófica nos níveis séricos em humanos.

Por conseguinte, conclui-se que o mRNA<sup>NT4/5</sup> se encontra presente e é secretado através de numa panóplia de sistemas e tecidos do ser humano (Ip, et al., 1992), assim como na maior parte dos tecidos constituintes de rato (Berkemeier, et al., 1991), porém, tal como anteriormente referenciado, para além da quantificação da sua expressão ser significativamente inferior quando comparada a qualquer outra substância neurotrófica, aparenta, também, subsistir uma redução da sua expressão como consequência do processo de desenvolvimento maturacional (Timmusk, et al., 1993; Laurenzi, et al., 1994; Funakoshi, et al., 1995; Kashyap, et al., 2018).

Pode-se, por sua vez, depreender que a literatura respeitante à compartimentalização da NT-4/5, contrariamente àquela disponível em relação ao BDNF, é efetivamente limitada e, comparativamente ao BDNF, pouco clara aquando da comparação desta substância neurotrófica - NT-4/5 - entre as duas espécies em questão (rato/humano).

### 1.3. Papel do Exercício Físico na Distribuição e Respetiva Quantificação dos Fatores Neurotróficos Entre Compartimentos

As evidências presentes na literatura contemporânea sugerem uma relação positiva entre a prática regular de exercício físico - particularmente o exercício aeróbio (Mrówczyński, 2019) - e a consequente indução de uma cascata de processos celulares, moleculares, estruturais e comportamentais, responsáveis pela promoção de múltiplos benefícios, quer do ponto de vista fisiológico, quer da perspectiva psicológica - tanto em humanos, como em modelos animais - (Griffin, et al., 2011; Coelho, et al., 2013); todavia, uma grande parte dos mecanismos pelos quais o exercício físico confere os benefícios anteriormente referenciados não estão totalmente elucidados (Rasmussen, et al., 2009).

De acordo com a multiplicidade de benefícios subjacentes à relação entre a prática crónica de exercício físico e a saúde, destacam-se, por exemplo, as alterações ao nível cerebral (Sleiman, et al., 2016). Presentemente, as evidências têm concluído que uma maior aptidão aeróbica está, naturalmente, associada a maiores volumes do córtex pré-frontal e do hipocampo em populações mais idosas (Erickson, et al., 2014); num processamento neural mais eficiente (Voss, et al., 2011); assim como numa maior integridade da substância branca em crianças (Chaddock-Heyman, et al., 2014). Consequentemente, o exercício físico tem sido igualmente associado ao desenvolvimento das capacidades de cognição, aprendizagem, memória e atenção; na velocidade de processamento e das funções executivas; no tempo de reação e aprendizagem de novas línguas; no desenvolvimento das habilidades motoras; assim como uma predisposição para um maior sucesso académico em adolescentes (Pedersen, 2019).

Curiosamente, é considerado consensual dizer-se que as conclusões relativas à produção científica ditam que o exercício físico, enquanto mediador molecular, estimula, de facto, a produção e a libertação de determinadas substâncias, quer por parte do CNS, quer pelo sistema nervoso periférico servindo, a título de exemplo, os neurotransmissores e fatores neurotróficos - nomeadamente o BDNF e a NT-4/5 (Rasmussen, et al., 2009; Chung, et al., 2013) - que atuam de uma forma *activity-dependent* e, concludentemente, potenciam a função neuronal induzindo, por conseguinte, uma cascata de eventos que promovem a plasticidade estrutural e funcional do cérebro (Cotman, et al., 2007; Gligoroska e Manchevska, 2012; Wrann, et al., 2013; Lippi, et al., 2019).

A combinação das duas observações anteriormente apresentadas concernentes à contribuição e impacto que as substâncias neurotróficas induzem no cérebro, assim como a relação que a prática de exercício físico infere nas funções cognitivas leva-nos, portanto, à hipotética suposição de que poderá existir uma analogia entre a prática de exercício físico que, em consequência, aumenta a produção e libertação de substâncias neurotróficas culminando, por sua vez, num desenvolvimento adequado da funcionalidade cerebral (Lippi, et al., 2019).

Não obstante dos benefícios supramencionados no que diz respeito à relação entre a prática de exercício físico e a consequente síntese e expressão de substâncias neurotróficas ao nível central, torna-

se, no entanto, relevante realçar as alterações que ocorrem, também, ao nível da expressão destas substâncias neurotróficas nos compartimentos periféricos, de teor não-neuronal, por meio do exercício físico. Assim, apesar do mecanismo não ser inteiramente conhecido, a literatura contemporânea tem comprovado, embora com alguma inconsistência, que o exercício contribui na variação da dinâmica e na cinética da expressão neurotrófica (Orgorn e Gardiner, 2010), assim como aparenta elevar os níveis neurotróficos de BDNF e de NT-4/5 presentes nos teores circulantes (Domínguez-Sánchez, et al., 2018; Mrówczyński, 2019).

### **1.3.1. Exercício Físico, Distribuição e Quantificação do BDNF**

O BDNF constitui-se, tal como referenciado na secção anterior - **1.1.1.** -, como a neurotrofina mais representada no cérebro, nomeadamente nas zonas do hipocampo, córtex cerebral, hipotálamo e cerebelo (Lu, et al., 2005).

De acordo com a pluralidade de substâncias neurotróficas presentemente conhecidas, o processo de transcrição de BDNF aparenta ser extraordinariamente suscetível a possíveis alterações na consequente regulação e oscilação, particularmente ao nível cerebral (Oliff, et al., 1998), por meio da prática de exercício físico (Knaepen, et al., 2010). Do ponto de vista central, o exercício provoca uma captação do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) por parte do cérebro que, consequentemente, estimula o aumento da expressão de mRNA do BDNF (Carro, et al., 2000); deve-se, no entanto, ter em consideração que as regiões do cérebro, responsáveis pelo mecanismo de produção desta substância neurotrófica, ainda não são conhecidas (Rasmussen, et al., 2009).

Concentrações elevadas de BDNF no cérebro aparentam potenciar um aumento do crescimento e da sobrevivência neuronal, assim como do processo de sinaptogénese resultando, subsequentemente, em benefícios cognitivos e afetivos que são claramente observáveis após a prática de exercício físico (Arancibia, et al., 2008; Cotman e Berchtold, 2007; Qiang, 2008; Scharfman, et al., 2005; Tolwani, et al., 2002; Dinoff, et al., 2017). Acrescenta-se, ainda, o facto de que o BDNF periférico aparenta ser encontrado em quantidades substancialmente inferiores, tanto em indivíduos com perturbações do foro psiquiátrico (Green, et al., 2010; Fernandes, et al., 2014; Polyakova, et al., 2015), como naqueles que apresentam transtornos ao nível metabólico (Krabbe, et al., 2007); assim, o desenvolvimento e evolução de disfunções cognitivas, intimamente associados ao próprio processo de envelhecimento, poderão derivar, por conseguinte, como consequência da diminuição dos valores de concentração de BDNF (Lommatzsch, et al., 2005; Ziegenhorn, et al., 2007; Tapia-Arancibia, et al., 2008). Como tal, as conclusões supramencionadas sugerem que um nível reduzido de BDNF circulante poderá servir como um preditor eficaz tanto no potencial desenvolvimento de problemas ao nível metabólico, como na ocorrência de doenças neurodegenerativas, resultantes de um desenvolvimento neuronal inadequado e,

ainda, ao nível de distúrbios nos processos concernentes à plasticidade neuronal (Angelucci, et al., 2004; Mrówczyński, 2019; Mrówczyński, 2019).

Como consequência das anteriores observações, as intervenções que aparentam aumentar os níveis de concentração de BDNF têm assumido, de facto, um papel relevante no interesse por parte da comunidade científica (Lanctôt, 2017). Consequentemente, a produção científica contemporânea tem vindo a direccionar a sua atenção particularmente para a relação e o impacto que o exercício físico apresenta na variação e na cinética das concentrações neurotróficas, nomeadamente do BDNF - tanto em animais, como em humanos -, nos múltiplos compartimentos centrais e periféricos, de teor neuronal e não-neuronal (*e.g.* cérebro, sangue e músculo esquelético) (Dinoff, et al., 2016).

Apesar do mecanismo e origem celular não ser inteiramente conhecido, sabe-se que o exercício físico, em particular o exercício aeróbio, estimula a produção e concentração desta substância neurotrófica no hipocampo e no córtex cerebral tendo-lhe sido atribuído, fruto dessa relação, a função de, possivelmente, se constituir responsável pelos processos supraditos de aumento da neurogénese e sinaptogénese, no processo de prevenção de perda neuronal e contribuição de benefícios cognitivos, assim como na diminuição de sintomas do foro psiquiátrico (Coelho, et al., 2013; Dinoff, et al., 2016; Dinoff, et al., 2017; Feter, et al., 2019).

Não obstante da presença deste fator neurotrófico ao nível central, sabe-se, também, que tanto o BDNF como o seu respetivo recetor - TrkB - foram igualmente identificados numa panóplia de tecidos periféricos não neuronais (Walsh e Tschakovsky, 2018). De entre a heterogeneidade de tecidos, constatou-se, em múltiplos estudos, que a prática de exercício físico aumentou a síntese e concentração de BDNF nalgumas das estruturas periféricas supramencionadas na secção anterior - **1.2.1.** -, designadamente no músculo esquelético (Dupont-Versteegden, et al., 2003; Mrówczyński, 2019); conquanto, noutras investigações, não se detetou qualquer tipo de alteração significativa na quantificação desta substância neurotrófica nos tecidos periféricos após a realização de um determinado protocolo de exercício físico (Huang, et al., 2013; Dinoff, et al., 2017).

Em relação à presença e concentração deste fator neurotrófico na circulação periférica, as evidências têm reportado efeitos inconclusivos (Dinoff, et al., 2017); se por um lado existem, de facto, resultados que indicam que ocorre um aumento desta substância neurotrófica após a realização de um determinado protocolo aeróbio - agudo e/ou crónico - (Huang, et al., 2013), há outros que não têm apresentado qualquer tipo de alteração significativa nas concentrações presentes na circulação (Dinoff, et al., 2016; Erickson, et al., 2011; Schmolesky, et al., 2013), pelo que, de acordo com Castellano e White (2008), considera-se necessária a realização de mais investigações de forma a elucidar qual o impacto do exercício na produção, secreção e resposta por parte dos tecidos-alvo ao nível neurotrófico.

Naturalmente, tal como anteriormente referido, uma das possíveis explicações para a inconsistência na determinação dos valores neurotróficos presentes na circulação deve-se, num primeiro plano, à heterogeneidade das populações de estudo; nas diferenças no tipo, intensidade e duração dos

protocolos (Dinoff, et al., 2016); e, num segundo plano, deve-se, segundo Pareja-Galeano, et al. (2015), aos diversos protocolos de recolha utilizados nos diversos estudos como, por exemplo, as condições de processamento sanguíneo (*e.g.* plasma, teores séricos, ou o sangue completo), o momento da recolha, entre outras particularidades protocolares.

Tal como já terá sido mencionado, subsiste, na literatura contemporânea, uma incerteza acerca da origem celular responsável pela indução de um aumento de concentração de BDNF nos tecidos através do exercício (Knaepen, et al., 2010), nomeadamente ao nível dos teores circulantes (Rasmussen, et al., 2009). Rasmussen, et al. (2009) apresentou evidências que apontam para uma libertação de BDNF por parte do cérebro que, subsequentemente, aparenta atravessar a BBB, corroborando com as conclusões apresentadas por Pan, et al. (1998) na medida em que o BDNF se caracteriza como uma substância neurotrófica capaz de atravessar a BBB, estrutura essa de elevada complexidade, que consiste na união de células endoteliais, formadas a partir de moléculas de adesão celular (Bors e Erdő, 2019), cuja função se destina na separação do CNS dos tecidos periféricos, assim como na manutenção da homeostasia do CNS através do controlo de materiais, nutrientes e da transferência celular via bidirecional, ou seja, via sangue-cérebro e vice-versa (Małkiewicz, et al., 2019).

Segundo Rasmussen, et al. (2009), concluiu-se que o cérebro se constitui como o principal produtor de BDNF quer em repouso, quer ao longo de um período prolongado, porém agudo, de exercício aeróbio (*i.e.* verifica-se um aumento da concentração de BDNF a variar aproximadamente entre 2 a 3 vezes o valor reportado em repouso) em sujeitos considerados saudáveis. Em concordância com estes resultados, Ferris, et al. (2007) sugeriu, semelhantemente, que a aplicação de um protocolo agudo de exercício aeróbio em humanos considerados saudáveis, infere, inquestionavelmente, num aumento dos níveis de BDNF presente nos teores circulantes.

Assim sendo, de acordo com o único estudo que peremptoriamente visou compreender a origem celular responsável pela indução de um aumento de concentração de BDNF ao nível dos teores circulantes através do exercício aeróbio, pôde-se, indubitavelmente, concluir que o cérebro contribui para sensivelmente 70-80% do BDNF presente na circulação, sugerindo que o próprio é o principal, porém, não o único contribuinte para o BDNF circulante em sujeitos saudáveis (Rasmussen, et al., 2009). Para além do cérebro, tem-se presumido que os principais tecidos potencialmente responsáveis pelo aumento dos níveis circulantes de BDNF são o músculo esquelético, as células sanguíneas periféricas mononucleares (PBMC's), as células endoteliais e/ou as plaquetas (Walsh e Tschakovsky, 2018).

Através de uma série de procedimentos experimentais com recurso a animais e em contexto celular, Matthews, et al. (2009) observou que, embora a contração muscular aumentasse irrefutavelmente a expressão de BDNF ao nível intramuscular, o fator neurotrófico em causa aparentava atuar de uma forma autócrina/parácrina. No entanto, segundo Wrann, et al. (2013), não se pode excluir o papel que o músculo esquelético poderá influenciar na expressão de BDNF no hipocampo através do



*crosstalk* via órgãos, pois, a contração muscular resulta na clivagem da *fibronectin type III domain-containing protein 5* (FNDC5), uma proteína do sarcolema, que é posteriormente secretada na circulação via uma miocina, designada irisina; por sua vez, a irisina qualifica-se, de acordo com Wrann, et al. (2013), como uma miocina capaz de estimular a expressão de BDNF no hipocampo, através da via coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PGC-1 $\alpha$ ).

As PBMC's, para além dos seus efeitos neurológicos, configuram-se como sendo uma possível fonte de produção e de secreção de BDNF induzido pelo exercício (Brunelli, et al., 2012). Segundo Kerschensteiner, et al. (1999), as evidências sugerem que este tipo de célula poderá ser igualmente responsável pela produção de BDNF na resposta provocada pelo stress fisiológico (*e.g.* no processo de inflamação), através da reparação e remodelação de tecidos. É necessário, no entanto, procurar elucidar, de forma mais pormenorizada, até que ponto estas células imunitárias são, em parte, responsáveis e se efetivamente se correlacionam com a secreção de BDNF presente nos teores circulantes.

O endotélio constitui-se como um forte candidato e uma fonte relevante na secreção de BDNF circulante durante o exercício (Prigent-Tessier, et al., 2013; Monnier, et al., 2016; Guo, et al., 2008). A secreção de BDNF por parte das células endoteliais é dependente da magnitude do estímulo. Estas células expressam, proeminentemente, os recetores TrkB, sendo que a sinalização do BDNF aparenta funcionar como uma espécie de circuito positivo autoregulatório; ocorre, após a ativação do recetor TrkB por meio do BDNF, um aumento da atividade de síntese de óxido nítrico endotelial (eNOS) estimulando, por sua vez, a produção rápida de óxido nítrico (NO) de uma forma dose-dependente (Meuchel, et al., 2011). A produção de BDNF na microvasculatura cerebral é dependente da atividade eNOS (Monnier, et al., 2016); assim sendo, conclui-se que a ativação do recetor TrkB, através do BDNF circulante, aumenta a produção de BDNF endotelial resultando, concludentemente, em possíveis implicações ao nível cerebral e ao nível dos valores circulantes. Dada a distribuição ubíqua das células endoteliais no sistema cardiovascular, e tendo em conta que quer a tensão de cisalhamento, como uma redução da pressão de oxigénio (PO<sub>2</sub>) no sangue se afiguram como duas das condições consideradas “primárias” para a produção e libertação de BDNF, considera-se, assim, o endotélio vascular como uma fonte celular responsável pelo contributo parcial de BDNF ao longo da realização de exercício físico (Walsh e Tschakovsky, 2018).

A literatura tem comprovado que as concentrações de BDNF observadas no soro, mais especificamente nas plaquetas, são manifestamente superiores àquelas encontradas no plasma (Fujimura, et al., 2002; Radka, et al., 1996). As plaquetas, componentes celulares não nucleados de reduzida dimensão, de aproximadamente 3  $\mu$ m, originam dos megacariócitos, da medula óssea, onde são conseqüentemente libertadas para a corrente sanguínea (Serra-Millàs, 2016). A função das plaquetas na cinética e variação do BDNF é, frequentemente, vista como sendo única e exclusivamente um compartimento responsável pelo armazenamento daquela substância neurotrófica, sendo que o seu papel

tem sido, no contexto do aumento de BDNF por meio da realização de exercício físico, negligenciada; no entanto, para além da sua função no que diz respeito ao armazenamento de grande parte do BDNF circulante, as plaquetas caracterizam-se, também, pela sua resposta na libertação rápida de BDNF de uma forma dose-dependente a estímulos, nomeadamente farmacológicos (*e.g.* antidepressivos) (Türck e Frizzo, 2015) e fisiológicos (Fujimura, et al., 2002). Yamamoto e Gurney (1990) afirmaram que plaquetas contêm, de facto, mRNA do BDNF derivado do citoplasma e dos megacariócitos, pelo que estas estruturas são responsáveis pela libertação de BDNF após a presença de um estímulo; assim, acredita-se que as plaquetas possam constituir-se como sendo capazes de sintetizar, embora de forma relativamente limitada, BDNF (Knaepen, et al., 2010; Nakahashi, et al., 2000).

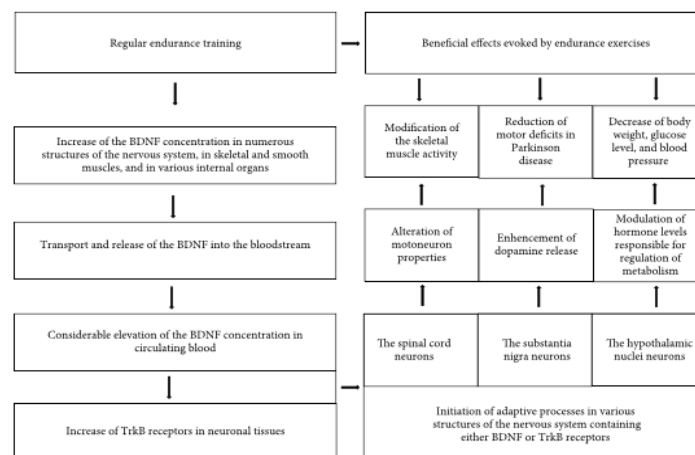


Figura 4. Esquema das ações pleiotróficas do *activity-dependent* BDNF (Mrówczyński, 2019)

Conclui-se que a literatura contemporânea tem evidenciado, embora com alguma inconsistência, incongruência e limitação de resultados, uma panóplia de tecidos, estruturas e sistemas, ao nível central e periférico, responsáveis pela secreção de BDNF nos teores circulantes após a execução de um protocolo de exercício aeróbio; no entanto, mantém-se por elucidar qual a quantificação e contributo que os tecidos centrais e periféricos aparentam apresentar na totalidade de BDNF presente na circulação, quer num momento pré-protocolar, quer após a aplicação de um protocolo aeróbio de longa duração.

Como tal, do ponto de vista do tema concernente à quantificação e contributo que os tecidos centrais e periféricos, responsáveis pela libertação de BDNF, apresentam nos teores circulantes, pode-se concluir que as evidências são notavelmente limitadas. Segundo Rasmussen, et al. (2009), após a realização de um exercício aeróbio, executado de forma pontual, se constatou que o cérebro seria o principal produtor e contribuidor de BDNF presente nos teores circulantes (70-80%); por outro lado, no que concerne à quantificação do BDNF circulante, através do contributo dos tecidos centrais e periféricos, após a realização de um protocolo aeróbio crónico - de longa duração -, concluiu-se que não existe qualquer tipo de evidência científica, presente na literatura contemporânea, respeitante ao tema em causa, sendo que se requer mais investigações que efetivamente visem elucidar a comunidade

científica sobre os mecanismos responsáveis pela secreção de BDNF na circulação e, em segundo lugar, que determinem, de forma clara, a origem e o contributo dos tecidos centrais e periféricos no BDNF presente nos teores circulantes.

### **1.3.2. Exercício Físico, Distribuição e Quantificação da NT-4/5**

Se as evidências e dados disponíveis sobre a relação entre o BDNF e o exercício físico são relativamente limitadas, aparenta, pois, existir uma ausência praticamente total de produção de literatura no que concerne à relação entre os restantes fatores neurotróficos, nomeadamente a NT-4/5, e a sua subsequente distribuição e respetiva quantificação entre compartimentos antes e após a aplicação de um protocolo de exercício físico aeróbio crónico (Lippi, et al., 2019).

Do ponto de vista da sua distribuição entre compartimentos, tal como supramencionado na secção anterior - **1.2.2.** -, segundo Timmusk, et al. (1993), constatou-se, embora em níveis substancialmente reduzidos, a presença deste fator neurotrófico num total de 12 tecidos periféricos, assim como na totalidade das 10 regiões do cérebro analisadas.

No que concerne à quantificação e variação deste fator neurotrófico nos tecidos centrais e periféricos, por meio da prática de exercício físico aeróbio, a literatura, para além de limitada, tem reportado efeitos inconclusivos.

A primeira tentativa de estabelecer uma relação entre a prática de exercício físico aeróbio e a possível variação na quantificação do fator neurotrófico NT-4/5 presente no cérebro, terá sido através da pesquisa realizada pelo Chung, et al. (2013). O autor, em conjunto com a sua equipa de investigação, concluíram que a realização de um protocolo aeróbio, que pressupunha a colocação de ratos numa passadeira ao longo de 12 dias, com um incremento de velocidade nos primeiros três dias, durante 30 minutos, induzia, de facto, num aumento de concentração de NT-4/5 no hemisfério contralateral nos ratos submetidos a um acidente vascular cerebral isquémico.

Um segundo estudo, que consistiu na colocação de 6 ratos, de estirpe *Wistar*, numa passadeira, a percorrer um total de 1000 metros/dia, a uma velocidade a variar entre os 20-25 cm/s, ao longo de um período de quatro semanas (de segunda a sexta-feira), concluiu, através dos resultados imunocitoquímicos, que um protocolo de exercício aeróbio moderado, de longa duração - um mês -, potenciou, similarmente, a expressão e sinalização do fator neurotrófico NT-4/5 (Skup, et al., 2002).

Concludentemente, conclui-se, uma vez mais, que para além da literatura concernente à relação entre a prática de exercício físico e consequente variação da NT-4/5 entre compartimentos ser praticamente inexistente, pôde-se, igualmente, constatar uma ausência total de evidências presentes na literatura na tentativa de estabelecer uma relação entre o aumento do fator neurotrófico NT-4/5 presente na circulação e a origem e contributo que a NT-4/5, proveniente do sangue da circulação cerebral e do sangue periférico, apresenta na quantificação da substância nos níveis circulantes.

## 2. OBJETIVOS

A lacuna observada na literatura correspondente a uma possível relação entre um protocolo de exercício aeróbio crónico e a consequente variação dos teores circulantes de BDNF sugere a necessidade de estudar este fenómeno.

Neste sentido, pretendemos estudar o impacto de um protocolo aeróbio de longa-duração (quatro semanas), em ratos *Wistar*, nos teores periféricos e centrais de BDNF.

Pretende-se, em particular, saber qual a concentração no tecido cerebral (hipocampo e córtex cerebral) e no músculo esquelético (solear e gastrocnémios), bem como na circulação cerebral e sistémica.

### 3. METODOLOGIA

A contínua evolução do conhecimento humano, nomeadamente o da biologia, como das medicinas humana e veterinária, refletiu-se, por sua vez, no desenvolvimento de ações que envolveram a criação e a experimentação animal. Os animais de laboratório, utilizados na investigação biomédica há mais de um século, são responsáveis por uma pluralidade de descobertas, quer na prevenção de doenças e a sua cura, quer no desenvolvimento de novas técnicas de tratamento clínico e cirúrgico (Andrade, et al., 2002; Festing e Wilkinson, 2007; Franco, 2013).

Assim, o presente estudo experimental decorreu no Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental, da subunidade de ensino, localizado no Pólo das Ciências da Saúde - Pólo III -, da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC), entre os meses de fevereiro e março de 2020 que, no entanto, fruto das medidas de contingência associadas ao SARS-CoV-2 e consequente encerramento, por tempo indeterminado, do ensino superior, comprometeu o trabalho desenvolvido e levou a que os resultados obtidos até então fossem considerados inválidos para a presente dissertação; posteriormente, numa conjuntura em que se estabeleceu uma estratégia de levantamento de medidas de confinamento, no âmbito do combate à pandemia da doença COVID-19, e consequente reabertura do ensino superior e atividades letivas presenciais, entre os meses de Maio e Junho de 2020, deu-se, uma vez mais, início ao protocolo experimental, dispondo, por sua vez, de um conjunto de animais novos.

A realização deste protocolo de exercício esteve, naturalmente, dependente da aprovação do conselho científico da Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física, da Universidade de Coimbra (FCDEF-UC), assim como foi estritamente acompanhado pelo Órgão Responsável pelo Bem-Estar dos Animais (ORBEA 08/2018), órgão esse “consultivo e independente, criado por despacho do Diretor da FMUC, com a finalidade de acompanhar a criação e a utilização de animais na investigação científica e em atividades pedagógicas, de promover o bem-estar dos animais, de emitir pareceres, e de assegurar a conformidade ética e o cumprimento das regras relativas ao bem-estar animal na investigação e no ensino realizados na FMUC” (Universidade de Coimbra, s.d.).

É de realçar que quer as orientações da Comunidade Europeia (86/609/CEE), como as normas técnicas de proteção dos animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos, presentes na Portaria nº 1005/92 de 23 de Outubro e pela Portaria no 1131/97 de 7 de Novembro, foram estritamente respeitadas.

Para a realização deste trabalho experimental, recorreu-se a um conjunto de ratos, de estirpe *Wistar*, provenientes do biotério do Instituto de Investigação Clínica e Biomédica de Coimbra (ICBR), da FMUC, sendo que os mesmos terão sido transferidos, posteriormente, para um biotério de manutenção sediado no Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental da FMUC. O biotério - uma instalação dotada de características próprias (Andrade, et al., 2002), apresenta, de acordo com a Universidade de Coimbra (s.d.), como principal incumbência “assegurar a criação e a manutenção dos

animais em condições sanitárias e de bem-estar condizentes com os elevados padrões exigidos na investigação e no ensino de excelência”. Acrescenta-se, ainda, que todos os procedimentos efetuados terão sido realizados na presença de indivíduos devidamente habilitadas, *i.e.*, com o curso válido pela Federação Europeia das Associações Científicas e de Experimentação Animal (FELASA), com certificação por parte da Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV).

### 3.1. Desenho do Estudo

De forma a alcançar os objetivos projetados para o presente estudo, foram utilizados dez ratos, de estirpe Wistar, machos, subdivididos, aleatoriamente, em dois grupos de cinco ratos cada: um grupo de controlo (GC) e um segundo grupo sujeito a um protocolo de exercício físico aeróbio (GE), com uma duração de quatro semanas, alongando-se desde o dia 25 de Maio ao dia 19 de Junho. O organograma que se segue, presente na **Figura 5**, representa o esquema geral do trabalho desenvolvido.

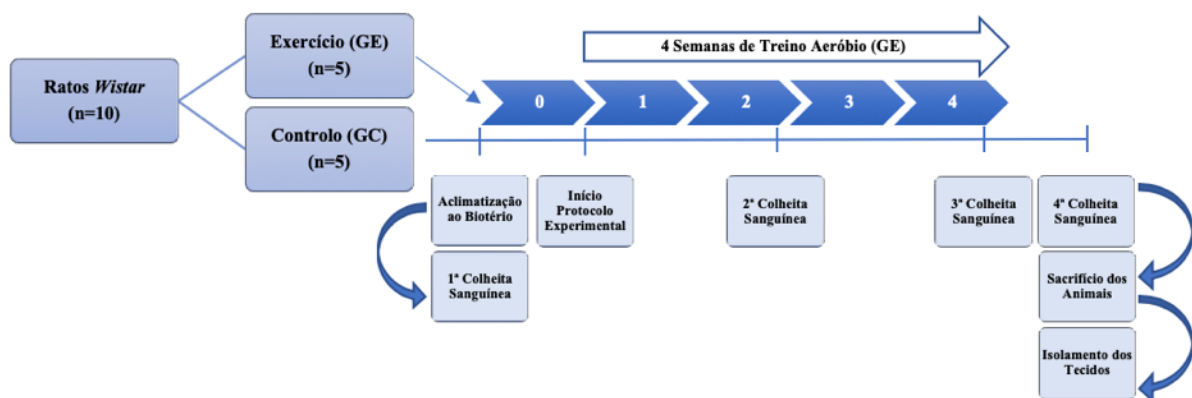


Figura 5. Organograma Experimental.

### 3.2. Caracterização dos Animais Em Estudo

Concebeu-se e realizou-se o estudo com recurso a modelos animais que, neste caso, terão sido ratos, de estirpe Wistar (n=10), machos, adultos (com uma massa corporal inicial que variou entre as 241 g e as 389 g).

Os animais foram divididos, de forma aleatória, em dois grupos: um primeiro grupo denominado de “grupo de controlo” (GC) e um segundo grupo, sujeito a um protocolo de exercício aeróbio, durante um período de quatro semanas, designado por “grupo de exercício” (GE).

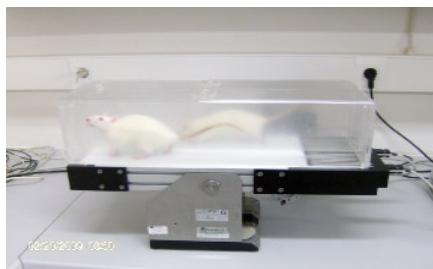
Os ratos foram mantidos sob condições constantes de ventilação, temperatura  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , humidade  $50 \pm 10\%$ , ciclos de luz de 12/12 horas (luz/escuro), assim como lhes foi fornecida comida sintética padronizada - ração 4RF25 - e água, *ad libitum*, de acordo com os parâmetros estabelecidos para a espécie em questão. Os animais terão sido instalados entre 1 a 2 por gaiola, pertencentes ao mesmo grupo (GC ou GE), de acordo com a legislação em vigor. Apesar de todos os animais usufruírem

de livre acesso à comida, *ad libitum*, para avaliar possíveis alterações da massa corporal durante o estudo entre grupos (control vs exercício), o consumo da ração foi controlado por uma pesagem diária da mesma ao longo de todo o procedimento experimental. Os animais terão sido sujeitos a um período de adaptação e de aclimatização ao biotério durante cerca de uma semana antes de se ter dado início ao procedimento experimental. A massa corporal dos animais foi avaliada nos momentos que precederam à primeira recolha sanguínea, no tempo 0, e semanalmente, previamente à realização do exercício diário, com recurso a uma balança digital *Kern & Sohn GmbH, Germany*, modelo *CB 6 KI*.

As colheitas sanguíneas, quer dos animais pertencentes ao GC, como daqueles pertencentes ao GE, serão sido efetuadas em quatro tempos distintos: no tempo 0 [T0] (que precedeu o início do protocolo experimental), no tempo 1 [T1] (após o término da segunda semana de treino), no tempo 2 [T2] (posteriormente à conclusão do protocolo experimental, à quarta semana), e no tempo 3 [T3] (24 horas após a última sessão de treino).

### 3.3. Protocolo de Treino dos Animais

O protocolo de exercício foi desenvolvido num tapete rolante próprio para o tipo de animal sob análise, sendo que o modelo do equipamento empregue terá sido um *LE 8710 RTS Treadmill Control*, (*Panlab s.l.*, Barcelona, Espanha) (*Harvard Apparatus, s.d.*), conectada a um processador informático que, por sua vez, monitorizava e apresentava, em tempo real, os dados de treino como, por exemplo, o tempo de treino, a velocidade, a quantidade de choques elétricos aplicados, assim como o somatório da duração do tempo acionado no que diz respeito aos choques elétricos. O *treadmill* utilizado, representado na **Figura 6.**, apresentava uma configuração de 5 pistas, possibilitando que todos os animais do mesmo grupo pudessem correr de forma simultânea.



**Figura 6.** *Treadmill. Control LE 8700 (Harvard Apparatus, s.d.)*

(**NOTA:** pelo facto do choque elétrico provocar um stress lancinante nos animais, e tendo em conta que se tem colocado a hipótese, no contexto do modelo neurotrófico, que o stress pode, de facto, levar à diminuição e conseqüente variação incomensurável dos níveis neurotróficos do BDNF, bem como de NGF e NT-3 (Dahlman, et al., 2019; Duman e Monteggia, 2006), optou-se por, ao invés de recorrer ao choque elétrico de forma a possivelmente enviesar, involuntariamente, os resultados das recolhas sanguíneas, utilizar técnicas alternativas menos radicais e cruciantes como, por exemplo, pressionar, de

forma ligeira, a ponta da cauda do animal de modo a estimular o próprio a colaborar nas tarefas respeitantes ao protocolo; segundo, visto que os ratos apresentam uma organização circadiana extraordinariamente expressiva e uma predisposição do período de vigília que perdura maioritariamente durante a noite e, contrariamente, um sono que ocorre durante o dia (sendo que é, tendencialmente, no escuro que se atinge a acrofase dos múltiplos parâmetros biológicos) (Sidlo, et al., 1995; Hoshino, et al., 2016; Luijtelaar e Coenen, 1984), decidiu-se, unanimemente, a colocação de uma tela que impedisse a passagem de luz por cima do último terço da passadeira com intuito de estimular os ratos a manterem-se na zona mais distante da zona de choques que, embora estivesse desligada, servia, frequentemente, como uma plataforma de repouso para os animais em análise).

Quer os animais do GC, como os animais pertencentes ao GE, foram sujeitos a uma sessão inicial de adaptação que constou numa caminhada a uma velocidade de 6 cm/s, ao longo de um período de 8 minutos. Semanalmente, à sexta-feira, durante as quatro semanas, o GC realizava um plano de exercício que consistia na colocação dos mesmos na passadeira rolante a uma velocidade de 6 cm/s, durante 8 minutos, com uma inclinação de 0°.

No que diz respeito ao protocolo experimental de treino, após a sua validação, o mesmo terá sido colocado em prática de acordo com o exposto na **Tabela I**. O GE, sujeito ao protocolo de treino, realizou um treino aeróbio durante os cinco dias úteis da semana, de segunda a sexta-feira, ao longo de quatro semanas. O protocolo utilizado consistiu num treino progressivo, com o incremento gradual da velocidade de corrida, dos tempos de corrida, assim como da própria inclinação do tapete rolante.

*Tabela 1. Protocolo de treino dos animais*

Protocol				
Week	Max Velocity (cm.s-1)	Time at Max Vel. (min)	Section Time (min)	Treadmill Slop (degrees)
1	15	10	12	0
2	20	12	14	0
3	35	15	20	0
4	50	5	35	15

### 3.4. Colheitas Sanguíneas

Para a quantificação das neurotrofinas plasmáticas, provenientes da circulação cerebral, procedeu-se à colheita sanguínea através da veia da jugular; consecutivamente, para a quantificação dos valores sistémicos, o sangue terá sido colhido via veia da cauda. Para a extração sanguínea da jugular e da cauda, recorreu-se a uma agulha Terumo, NEOLUS, Bélgica; 21G x 1'', 0,8 x 25.

O sucesso da aplicação e de todo o protocolo que envolve a anestesia está manifestamente dependente de uma série de procedimentos a ter em conta quer nos momentos pré-operatório, como nos



momentos operatório e pós-operatório (Andrade, et al., 2002); considera-se, assim, o manuseio cuidadoso do animal, realizado por um investigador devidamente habilitado para o efeito, imperativo de forma a reduzir o stress provocado ao mesmo, principalmente nos momentos que antecedem a aplicação da anestesia e consequente recolha das colheitas sanguíneas.

Previamente à recolha, introduziu-se um anticoagulante (EDTA a 6%) na seringa. Relativamente às colheitas sanguíneas da veia da cauda, após a anestesia por via intraperitoneal, o animal foi colocado numa manta de aquecimento de forma a promover uma vasodilatação facilitando, naturalmente, o processo da colheita sanguínea. Recorreu-se, por vezes, a par da técnica da manta de aquecimento, outras práticas próprias que promovessem, igualmente, a vasodilatação cutânea como, por exemplo, de massagens superficiais nas zonas de recolha sanguínea (Fromy, et al., 2000).

A anestesia foi efetuada através de uma combinação de duas substâncias anestésicas, sendo elas a Xilazina (7 mg/kg I.P) e a Ketamina (80 mg/kg I.P), via intraperitoneal.

No pós-cirúrgico - ulteriormente à anestesia e colheitas do sangue da veia jugular, assim como da veia da cauda - os animais foram, de forma individual, monitorizados ao longo de um período de sensivelmente 48 horas, sendo que terão sido verificados, periodicamente, fatores como o calor, a depressão respiratória, equilíbrio de fluídos, perdas sanguíneas e plasmáticas, a urina e as fezes, massa corporal, assim como o estado dos pontos cirúrgicos e a própria cicatrização da zona envolvente às incisões cirúrgicas. Nomeadamente ao nível da zona de recolha da veia jugular que, devido ao grau profundamente complexo da técnica de acesso cirúrgico vascular, implicou uma incisão cutânea de maior relevo.

Após a recolha, o sangue foi transferido para tubos de ensaio de polipropileno para a sua posterior centrifugação a 3500 rpm, durante 10 minutos, a 4°C; após o processo de centrifugação e do sangue total, isolou-se, individualmente, o plasma para tubos de microcentrífuga (1.5 ml) de plástico transparentes, tendo os mesmos sido colocados no congelador, a uma temperatura de -80°C, para a sua subsequente análise laboratorial, por meio de *kits* comerciais que permitem a técnica de ELISA - ensaio de imunoabsorção enzimática.

### **3.5. Isolamento dos Tecidos**

Em relação aos tecidos, 24 horas após a última sessão de treino, os ratos foram novamente anestesiados através da combinação das substâncias anestésicas de Xilazina (7 mg/kg I.P) e a Ketamina (80 mg/kg I.P), via intraperitoneal, e, posteriormente, sacrificados, via decapitação. Para cada animal, extraiu-se, a nível cerebral, o hipocampo e o córtex frontal; a nível muscular, recorreu-se ao isolamento dos músculos gastrocnémios e solear, uma vez que a adaptação do músculo esquelético ao exercício

difere de acordo com os tipos de fibra muscular (Egan e Zierath, 2013). Os tecidos, aquando da sua remoção, foram prontamente colocados sobre papéis de filtro e criopreservados com recurso a gelo seco. Os tecidos foram armazenados, tal qual as amostras plasmáticas, a  $-80^{\circ}\text{C}$ , até à posterior análise e quantificação dos mesmos.

A preparação das amostras de tecidos foi efetuada através da sua homogeneização em tampão de lise, com a seguinte concentração final: 140 mM NaCl, 50 mM EDTA, 10% glicerol, 1% NP-40, 20 mM Tris e pH 7.5. De forma individual, cada amostra (cerebral e muscular) foi homogeneizada com recurso a um homogeneizador de tecidos, método esse que envolve a aplicação de ultrassom para quebrar as interações intermoleculares. O sonicador caracteriza-se como sendo o aparelho responsável pela agitação de partículas contidas num determinado recipiente, cujo propósito é o de acelerar a dissolução de determinadas substâncias num solvente. Após o processo de homogeneização, as amostras de tecido, foram colocadas em tubos de 1.5 ml, na centrífuga, a 3500 rpm, durante 10 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$ . De seguida, quer as amostras plasmáticas como os sobrenadantes normalizados pela quantidade de proteína cerebral (hipocampo e córtex frontal) e muscular (gastrocnémios e solear) foram novamente armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até à determinação das quantificações de BDNF por meio da técnica ELISA.

### **3.6. Extração e Quantificação de BDNF**

A técnica de ELISA (“*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*”), desenvolvida recentemente, representa um progresso significativo ao nível tecnológico, assim como no que diz respeito às ferramentas sorológicas imunoenzimáticas existentes (World Health Organization, 1976). A técnica em causa apresenta a capacidade de detetar e quantificar substâncias solúveis, como peptídeos, proteínas, anticorpos e hormonas. O ELISA baseia-se na capacidade de um anticorpo se ligar ao seu antígeno, através de reações enzimáticas (Clark, et al., 1986). Subsequentemente, a presença de antígenos/anticorpos na amostra é revelada pela produção de cor aquando da adição do substrato da enzima e de uma substância cromógena, sugerindo, por sua vez, uma reação positiva. A quantidade de antígeno nas amostras é proporcional à cor gerada na conseqüente reação. A determinação é feita através da medição da densidade ótica da solução no espectrofotómetro. Os resultados são calculados de acordo com a referência da curva padrão dos kits.

As concentrações de BDNF nas amostras plasmáticas e nos sobrenadantes dos tecidos foram determinados, em duplicado, através da técnica de ELISA - *Sandwich Assay Procedure* - de acordo com as indicações do fabricante (Rab1138, Sigma-Aldrich, USA).

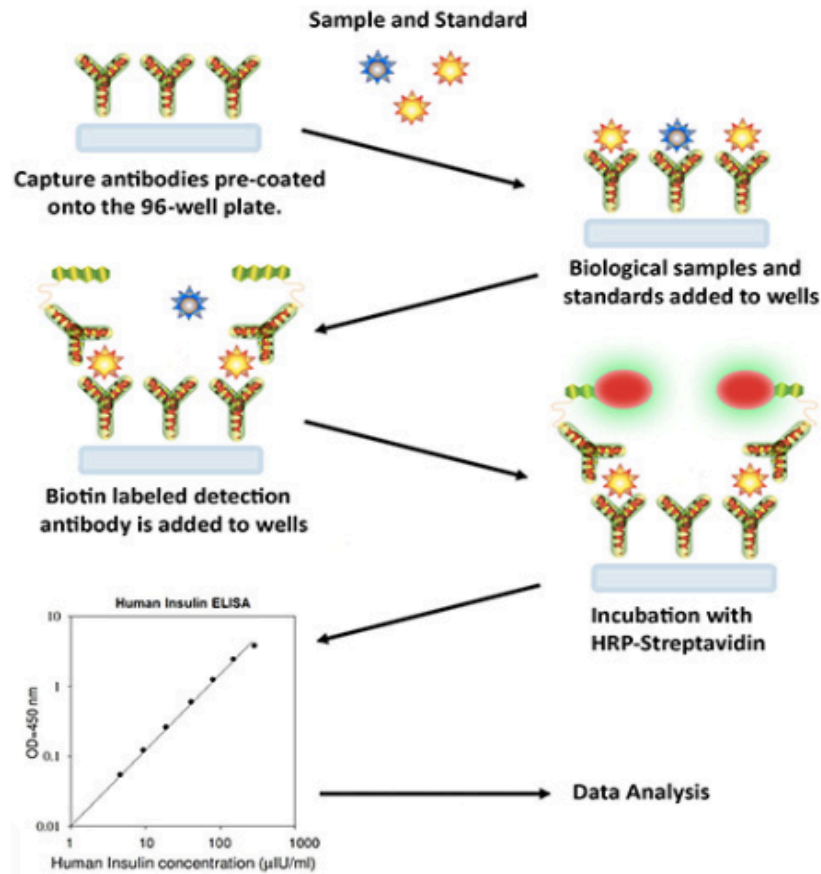


Figura 7. Exemplificação do processo ELISA - Sandwich Assay Procedure. (Rab1138, Sigma-Aldrich, USA).

Os níveis de BDNF foram calculados por interpolação de uma curva padrão a uma densidade ótica de 450 nm no leitor de placas.

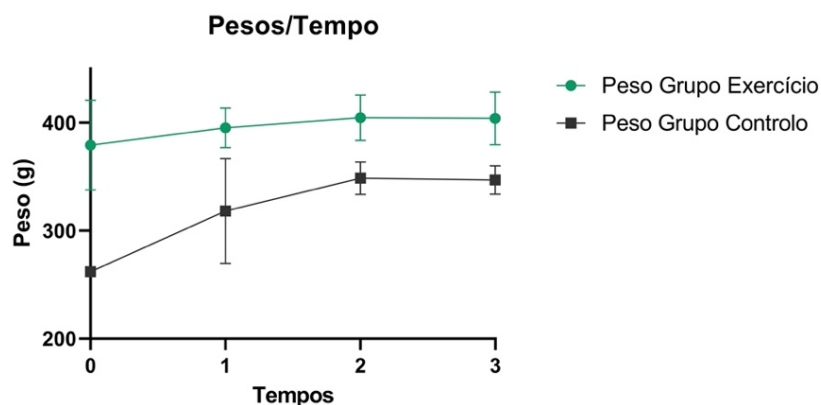
### 3.7. Análise Estatística

A análise estatística, ao nível tecidual, foi escolhida tendo em consideração o número da amostra e a sua distribuição de normalidade (*Shapiro-Wilk Test*) que, por conseguinte, obrigou à realização do teste paramétrico de *T-Student*; com o intuito de proceder a uma análise comparativa da evolução dos conteúdos plasmáticos entre grupos (Treino vs. Control), nos 4 momentos (de T0 a T3), recorreu-se a uma segunda análise estatística, tendo sido usado, no que concerne ao plasma da veia jugular, o teste não-paramétrico de *Friedman*; quanto aos conteúdos plasmáticos, em relação à veia da cauda, entre grupos (Treino vs. Control), nos 4 momentos (de T0 a T3), utilizou-se o teste paramétrico, *Two-way ANOVA*; em relação à análise estatística do T3, concernente aos conteúdos plasmáticos da veia da jugular, recorreu-se ao *Mann-Whitney Test*; ; para a análise estatística do T3, concernente aos conteúdos plasmáticos da veia da cauda, utilizou-se o *T-Student*. Foram considerados significativos os

valores comparados ao nível de significância de  $p \leq 0,05$ . Para o tratamento estatístico dos dados, foi utilizado o *GraphPad Prism* versão 9.1.1 (223).

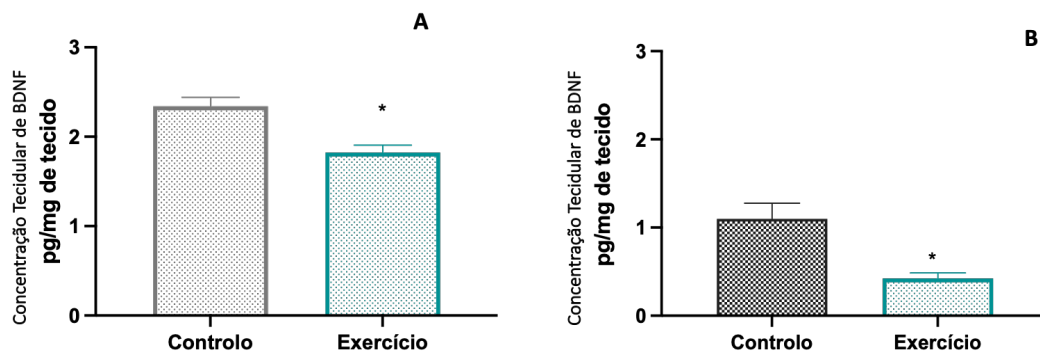
#### 4. RESULTADOS

Tal como descrito na secção referente à metodologia utilizada, o presente estudo foi desenvolvido tendo como base um protocolo aeróbio, progressivo, cuja duração foi de quatro semanas. A avaliação da massa corporal dos animais (GC e GE) decorreu no tempo 0, (que precedeu o início do protocolo experimental), no tempo 1 (após o término da segunda semana de treino), no tempo 2 (posteriormente à conclusão do protocolo experimental, à quarta semana), e no tempo 3 (24 horas após o tempo 2). O **Gráfico 1**. reporta a variação da massa corporal dos animais entre grupos ao longo do tempo.



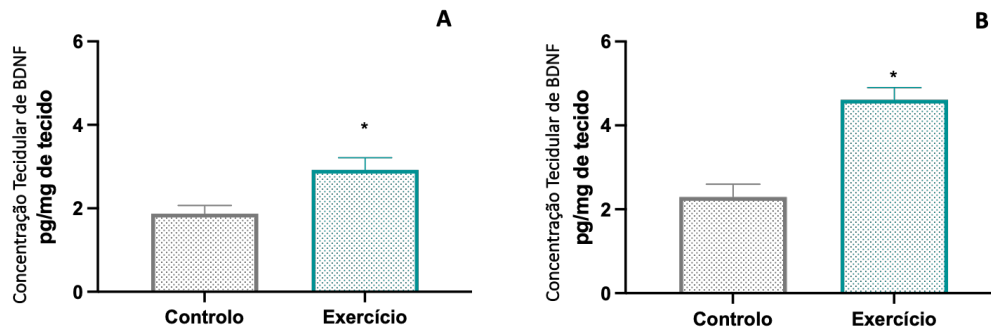
**Gráfico 5.** Evolução da massa corporal (peso) dos animais em estudo ao longo das quatro semanas de treino. *Tempos 0: pré-treino; 1: segunda semana de treino; 2: quarta semana de treino; 3: 24h pós-quarta semana de exercício. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (SEM), n=5.*

Analisando o efeito do exercício físico sobre os teores cerebrais de BDNF verifica-se que, 24 horas após a quarta semana de exercício, ocorre uma diminuição significativa, face ao grupo controlo, tanto no córtex frontal (**Gráfico 2A.**), como no hipocampo (**Gráfico 2B.**). De notar que os valores tecidulares de BDNF são superiores no córtex do que os encontrados no hipocampo.



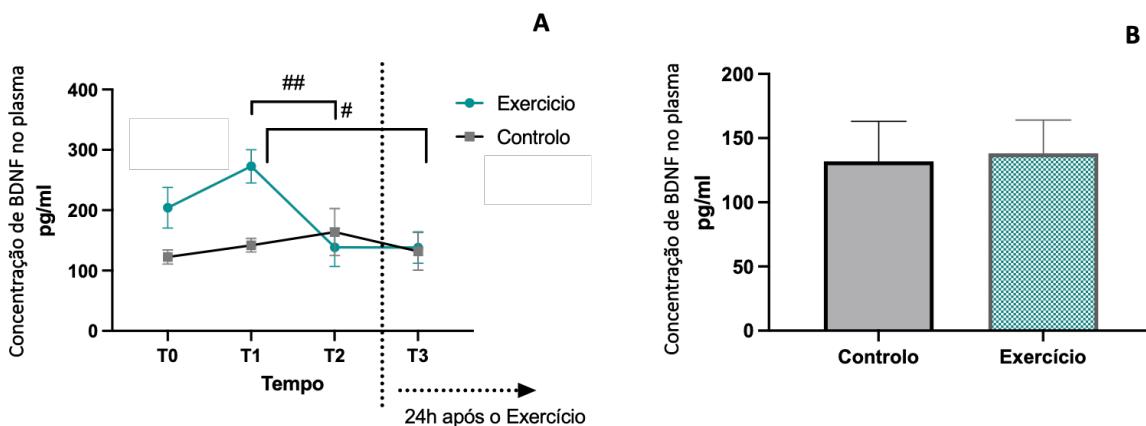
**Gráfico 2.** Impacto de quatro semanas de treino aeróbio nos teores de BDNF no Córtex Frontal [A] e no Hipocampo [B]. Os valores de BDNF foram determinados 24h após 4 semanas de exercício. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (SEM); n=5. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controlo.

No entanto, quando analisamos os teores de BDNF no tecido muscular, verificou-se um efeito totalmente contrário; tanto no músculo gastrocnémios (**Gráfico 3A.**), como no músculo solear (**Gráfico 3B.**) dos animais exercitados, o exercício aeróbio aumentou, de forma significativa, em 50 e 92 pontos percentuais, respetivamente, os teores de BDNF. Com efeito, no músculo solear, constituído maioritariamente por fibras tipo I, os teores de BDNF (em pg/mg de tecido) são mais elevados do que aqueles encontrados no músculo gastrocnémios, maioritariamente constituído por fibras tipo II, nos animais submetidos a exercício físico.



**Gráfico 3.** Impacto de quatro semanas de treino aeróbio nos teores de BDNF no músculo Gastrocnémios [A] e no músculo Solear [B]. Os valores de BDNF foram determinados 24h após 4 semanas de treino. Os resultados são apresentados como média +/- erro padrão da média (SEM); n=5. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controlo

No que concerne aos valores circulantes de BDNF, e considerando que o plasma obtido da veia da cauda reflete os teores sistémicos desta neurotrofina, verificou-se que os teores de BDNF circulantes à segunda semana são significativamente superiores aos valores circulantes medidos à quarta semana de exercício. Isto sugere que existe, de facto, um aumento dos valores no grupo do exercício em relação ao grupo controlo (ainda que não tenha atingido significância estatística). Os valores do grupo do exercício regressaram, à quarta semana, aos valores pré-exercício, permanecendo estáveis 24h pós-exercício continuado (**Gráfico 4A.**). Quanto ao grupo controlo, os valores plasmáticos de BDNF mantiveram-se, tal como seria de esperar, constantes, uma vez que nenhum dos animais foi sujeito a qualquer outro estímulo.

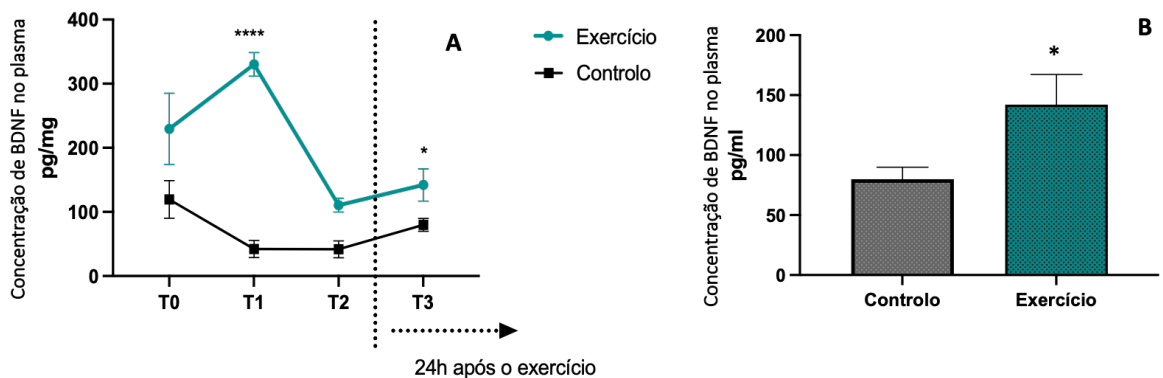


**Gráfico 4.** Impacto de quatro semanas de treino aeróbio nos teores plasmáticos de BDNF obtidos da veia da cauda ao longo do tempo de exercício [A] e 24h após o plano de exercício [B]. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (SEM); n=5. Tempos T0: pré-treino; T1: segunda semana de treino; T2: quarta

semana de treino; T3: 24h pós-quarta semana de exercício programado. #  $p \leq 0,05$  entre os dois pontos do grupo exercício; ##  $p \leq 0,01$  entre os dois pontos do grupo exercício.

O sangue colhido da veia da jugular traduz a drenagem cerebral (**Gráfico 5A**). Os valores de BDNF, presentes no plasma, proveniente da jugular, são significativamente superiores aos valores do grupo controlo às duas semanas de exercício. Às quatro semanas de exercício, os valores circulantes na jugular regressam aos valores basais. No ponto T3, que corresponde a 24 horas após o final do protocolo de exercício (**Gráfico 5B**), os valores de BDNF são significativamente superiores aos valores do grupo sedentário. No entanto, estes valores são semelhantes aos valores basais do grupo do exercício.

O grupo controlo, tal como aconteceu no teores plasmáticos da circulação sistémica, manteve igualmente constantes os valores de BDNF ao longo do tempo.



**Gráfico 5. Impacto de quatro semanas de treino aeróbio nos teores plasmáticos de BDNF obtidos da veia Jugular [A].** Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM);  $n=5$ . Tempos T0: pré-treino; T1: segunda semana de treino; T2: quarta semana de treino; B - Teores plasmáticos de BDNF obtidos da veia da Cauda no T3 [B]. As barras representam médias e as linhas verticais o erro padrão da média (SEM). Os valores foram corrigidos pela quantidade de tecido (em mg). Para cada um dos grupos o  $n=5$  sendo que cada amostra foi quantificada em duplicado. O treino refere-se a um programa progressivo de exercício aeróbio com a duração de quatro semanas. \*\*\*\* $p < 0,05$  em relação ao grupo. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controlo.

#### 4. DISCUSSÃO

Sendo que o objetivo deste estudo era analisar o impacto de quatro semanas de exercício aeróbio nos teores circulantes e tecidulares do BDNF, impõe-se, neste ponto, a discussão integrada dos teores musculares, cerebrais e dos teores circulantes sistêmicos (veia da cauda) e cerebrais (veia jugular).

Assim, quando consideramos os teores de BDNF no córtex e no hipocampo, observou-se uma diminuição significativa, face ao grupo controle, nos dois compartimentos cerebrais. Esta diminuição pode dever-se a um aumento da sua utilização e/ou a uma diminuição da sua síntese por parte dos tecidos cerebrais e também à sua drenagem para a veia jugular. No entanto, o aumento dos valores circulantes na jugular no grupo do exercício, apesar de serem significativamente superiores aos valores do grupo controle, não aparenta ter significado fisiológico. Com efeito, estes valores são próximos daqueles obtidos no grupo do exercício antes do início do protocolo experimental.

Relativamente ao teores de BDNF no tecido muscular, verificou-se que o protocolo de exercício evidenciou um aumento dos teores de BDNF em comparação com os animais controle. No entanto, não há, por sua vez, diferenças nos teores plasmáticos periféricos (veia da cauda). Isto sugere que a síntese de BDNF pelo músculo esquelético não é acompanhada pela sua libertação para a circulação (acumulação), ou, alternativamente, o BDNF circulante pode, conseqüentemente, estar a ser captado por outros órgãos e/ou células circulantes. Os valores aumentados de BDNF poderão sugerir, também, uma putativa ação autócrina a nível muscular. A acumulação de BDNF no músculo e a sua ação autócrina é consistente com os trabalhos de Matthews, et al. (2009).

A literatura contemporânea tem evidenciado a existência de uma relação positiva entre a atividade física e os níveis circulantes de BDNF (Lippi, et al., 2019). A descoberta de que o BDNF se caracteriza como uma substância neurotrófica capaz de atravessar a BBB (Pan, et al., 1998), assim como as correlações positivas que se verificaram de BDNF, entre os níveis periféricos e cerebrais, de roedores (Karege, et al., 2002), sugerem que as concentrações periféricas poderão, igualmente, refletir os níveis de BDNF presentes no cérebro (Suliman, et al., 2013).

A dinâmica da expressão dos fatores neurotróficos no sistema nervoso, após o exercício, também tem sido relativamente estudada; por outro lado, menos atenção tem sido atribuída à importância funcional das substâncias neurotróficas ao nível do sistema neuromuscular (Orgorn & Gardiner, 2010). As evidências têm sugerido que o BDNF aparenta estar intimamente envolvido na adaptação do sistema neuromuscular ao exercício (Beaumont e Gardiner, 2003; Orgorn e Gardiner, 2010). Sabe-se, também, que o BDNF é produzido, libertado e expresso pelo músculo (Cuppini, et al., 2007). As evidências sugerem que o BDNF se caracteriza como uma miocina induzida através do exercício que, presumivelmente, atua de uma forma autócrina e/ou parácrina na regulação muscular (Matthews, et al., 2009; Delezie, et al., 2019).

Os resultados apresentados na secção anterior sugerem que o exercício físico, realizado ao longo de um período de quatro semanas, aumenta, de forma significativa, os teores musculares de BDNF quer no gastrocnémios, quer no solear; mais ainda, os valores obtidos no solear são mais elevados do que no



músculo gastrocnémios. Este facto poderá sugerir uma relação entre os valores de BDNF com o tipo de fibras musculares. Curiosamente, parece haver uma correlação positiva entre os teores de BDNF e os músculos predominantes em fibras do tipo I.

De acordo com Gómez-Pinilla, et al. (2001), após 5 dias de exercício em passadeira rolante, ocorreu um aumento significativo de BDNF no músculo solear, sugerindo que o BDNF poderá, na prática, mediar determinados efeitos da atividade neuromuscular no músculo esquelético. Acresce o facto de que o TrkB aparenta ser encontrado em níveis superiores na membrana das miofibrilhas do músculo solear em comparação com, por exemplo, o gastrocnémios, sugerindo, conseqüentemente, a possibilidade do BDNF, fator esse que se liga ao recetor de tirosina kinase B, apresentar, possivelmente, uma maior predominância nas fibras lentas, de tipo I, do que nas rápidas, de tipo II (Chevrel, et al., 2006), corroborando, subseqüentemente, com os nossos resultados obtidos e apresentados na secção anterior da presente dissertação.

Apesar de subsistirem múltiplas questões-chave por responder em relação às funções biológicas do BDNF no músculo esquelético, julga-se que o aumento dos níveis de concentração de BDNF que se verificaram nos teores musculares, após a contração, sejam fruto de ações metabólicas como, por exemplo, a oxidação de lípidos no músculo esquelético, por meio da ativação de AMPK (Matthews, et al., 2009) e/ou nos processos de regeneração do tecido do músculo esquelético, após o exercício (Clow & Jasmin, 2010).

Para além do efeito autócrino, não podemos excluir a hipótese de que o BDNF, proveniente do músculo, possa gerar um efeito de retrocontrolo negativo sobre o cérebro; isto é compaginável com a diminuição dos teores cerebrais de BDNF verificada nos nossos resultados. Alternativamente ao mecanismo de retrocontrolo negativo, pode haver uma maior taxa de utilização relativamente à síntese de BDNF que ocorre por parte do tecido cerebral, através de um mecanismo que nos é desconhecido.

Por outro lado, a literatura sugere que o exercício eleva os níveis de BDNF ao nível central (Schmolesky, et al., 2013; Sleiman, et al., 2016; Philips, 2017), através da captação do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) por parte do cérebro que, conseqüentemente, estimula o aumento da expressão de RNAm do BDNF (Carro, et al., 2000). No entanto, este aumento da expressão de mRNA do BDNF pode não ter tradução no aumento da proteína.

Em relação aos níveis plasmáticos de sangue proveniente da veia da cauda e da veia da jugular, é possível analisar os resultados de acordo com dois momentos/etapas distintos; numa primeira abordagem, a variação dos níveis plasmáticos de BDNF, durante as quatro semanas de exercício aeróbio, e uma segunda abordagem dos níveis plasmáticos de BDNF, 24 horas após o exercício (altura em que foram colhidos os tecidos), momento em que podemos, efetivamente, comparar com os níveis tecidulares (musculares e cerebrais).

Na variação ao longo do tempo, tanto no plasma proveniente da veia da cauda, como no plasma originário da veia jugular, verificou-se um aumento em ambos, às duas semanas de exercício, regressando aos valores basais às quatro semanas, permanecendo, subseqüentemente, inalterados 24h

após o fim do protocolo de exercício físico. Os nossos resultados sugerem que após um determinado período, poderá ter ocorrido uma adaptação fisiológica do corpo dos animais ao exercício justificando, conseqüentemente, a diminuição e retorno dos valores circulantes de BDNF a níveis semelhantes àqueles registadas nos momentos que antecederam o início do protocolo em causa. Isto é consistente com o estudo elaborado pelo Castellano & White (2008).

Os seguintes fatores poderão ter contribuído para os resultados obtidos:

1. Tipo de exercício (duração e intensidade);
2. Outras substâncias/fatores que interferem com a regulação do metabolismo do BDNF (*e.g.* NT-4/5, Irisina, IGF-1, *etc.*);
3. Interferência de outros compartimentos tecidulares e/ou celulares.

## 6. CONCLUSÕES

Os benefícios e consequentes adaptações fisiológicas, provenientes do exercício físico, sobre a saúde são, atualmente, inquestionáveis. O intercâmbio entre o cérebro e órgãos periféricos, nomeadamente o músculo esquelético, está a ser alvo de intensa investigação.

O exercício aeróbio aumentou os teores de BDNF no músculo esquelético, porém diminuiu os teores desta neurotrofina nas duas regiões estudadas do cérebro. No entanto, os valores circulantes desta neurotrofina não refletiram os seus teores tecidulares, no tempo final. Recorrendo apenas à análise dos níveis plasmáticos de BDNF, no contexto do exercício físico, parece ser insuficiente para se caracterizar a sua dinâmica de síntese e consequente libertação.

São, no entanto, necessários estudos mais alargados, envolvendo um maior número de animais, de forma a perceber qual a relação entre a prática crónica de exercício físico com a síntese e libertação da substância neurotrófica, BDNF, nos múltiplos compartimentos centrais e periféricos, assim como a necessidade de averiguar a dinâmica da produção/libertação/captação ao nível do músculo esquelético e cérebro.

Além disso, este estudo permite sugerir cautela na interpretação da literatura existente visto que nenhum artigo elucidava a origem dos teores circulantes de BDNF.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar Jr, A. S. et al., 2008. Downhill Training Upregulates Mice Hippocampal and Striatal Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels. *Journal of Neural Transmission*, 115(9), pp. 1251-1255.
- Al-Qudah, M. A. & Al-Dwairi, A., 2016. Mechanisms and regulation of neurotrophin synthesis and secretion. *Neurosciences*, 21(4), pp. 306-313.
- Andrade, A., Pinto, S. C. & Santos de Oliveira, R., 2002. Anestesia em Animais de Experimentação. Em: FIOCRUZ, ed. *Animais de laboratório*. Rio de Janeiro: SciELO Books, pp. 255-262.
- Angelucci, F., Mathé, A. A. & Aloe, L., 2004. Neurotrophic Factors and CNS Disorders: Findings in Rodent Models of Depression and Schizophrenia. *Progress in Brain Research*, Volume 146, pp. 151-166.
- Arancibia, S. et al., 2008. Protective Effect of BDNF Against beta-amyloid Induced Neurotoxicity in Vitro and in Vivo in Rats. *Neurobiology of Disease*, 31(3), pp. 316-326.
- Archer, E. & Blair, S. N., 2011. Physical Activity and the Prevention of Cardiovascular Disease: From Evolution to Epidemiology. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 53(6), pp. 387-396.
- Balietti, M., Giuli, C. & Conti, F., 2018. Peripheral Blood Brain-Derived Neurotrophic Factor as a Biomarker of Alzheimer's Disease: Are There Methodological Biases?. *Molecular Neurobiology*, 55(8), pp. 6661-6672.
- Barde, Y. A., Edgar, D. & Thoenen, H., 1982. Purification of a New Neurotrophic Factor From Mammalian Brain.. *THE EMBO JOURNAL*, 1(5), pp. 549-553.
- Bathina, S. & Das, U. N., 2015. Brain-Derived Neurotrophic Factor and its Clinical Implications. *Archives of Medical Science*, 11(6), pp. 1164-1178.
- Beaumont, E. & Gardiner, P. F., 2003. Endurance Training Alters The Biophysical Properties of Handlimb Motoneurons in Rats. *Muscle & Nerve*, 27(2), pp. 228-236.
- Berkemeier, L. R. et al., 1991. Neurotrophin-5: A Novel Neurotrophic Factor That Activates Trk and TrkB. *Neuron*, 7(5), pp. 857-866.
- Binder, D. K. & Scharfman, H. E., 2004. Brain-derived Neurotrophic Factor. *Growth Factors*, 22(3), pp. 123-131.
- Bors, L. A. & Erdő, F., 2019. Overcoming the Blood–Brain Barrier. Challenges and Tricks for CNS Drug Delivery. *Scientia Pharmaceutica*, 87(1), pp. 1-28.
- Brunelli, A. et al., 2012. Acute Exercise Modulates BDNF and pro-BDNF Protein Content in Immune Cells. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 44(10), pp. 1871-1880.
- Candalija, A. et al., 2014. Trk Receptors Need Neutral Sphingomyelinase Activity to Promote Cell Viability.. *FEBS Letters*, 588(1), pp. 167-174.

- Carro, E., Nuñez, A., Busiguina, S. & Torres-Aleman, I., 2000. Circulating Insulin-Like Growth Factor I Mediates Effects of Exercise on the Brain. *Journal of Neuroscience*, 20(8), pp. 2926-2933.
- Carter, B. D., Gentry, J. J., Barker, P. A. & Carter, B. D., 2004. The p75 Neurotrophin Receptor: Multiple Interactors and Numerous Functions. *Progress in Brain Research*, Volume 146, pp. 25-39.
- Castellano, V. & White, L. J., 2008. Serum Brain-derived Neurotrophic Factor Response to Aerobic Exercise in Multiple Sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 269(1-2), pp. 85-91.
- Chaddock-Heyman, L. et al., 2014. Aerobic Fitness is Associated With Greater White Matter Integrity in Children. *Frontiers in Human Neuroscience*, Volume 8, pp. 1-7.
- Chao, M. V., 2003. Neurotrophins and Their Receptors: A Convergence Point for Many Signalling Pathways. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(4), pp. 299-309.
- Chao, M. V., Rajagopal, R. & Lee, F. S., 2006. Neurotrophin Signalling in Health and Disease. *Clinical Science*, 110(2), pp. 167-173.
- Chevrel, G., Hohlfeld, R. & Sendtner, M., 2006. The Role of Neurotrophins in Muscle Under Physiological and Pathological Conditions. *Muscle Nerve*, 33(4), pp. 462-476.
- Chung, J.-Y., Kim, M.-W., Bang, M.-S. & Kim, M., 2013. Increased Expression of Neurotrophin 4 Following Focal Cerebral Ischemia in Adult Rat Brain with Treadmill Exercise. *PLoS ONE*, 8(3), pp. 1-6.
- Clark, M. F., Listter, R. M. & Bar-Joseph, M., 1986. ELISA techniques. Em: J. P. Colowick & N. O. Kaplan, edits. *Methods in Enzymology*. s.l.:Academic Press, pp. 742-766.
- Coelho, F. G. d. M. et al., 2013. Physical Exercise Modulates Peripheral Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF): A Systematic Review of Experimental Studies in the Elderly. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 56(1), pp. 10-15.
- Cotman, C. W. & Berchtold, N. C., 2007. Physical Activity and the Maintenance of Cognition: Learning From Abstract Animal Models. *Alzheimer's & Dementia*, 3(2), pp. S30-37.
- Cotman, C. W., Berchtold, N. C. & Christie, L.-A., 2007. Exercise Builds Brain Health: Key Roles of Growth Factor Cascades and Inflammation. *Trends in Neuroscience*, 30(9), pp. 464-472.
- Cuppini, R. et al., 2007. BDNF Expression in Rat Skeletal Muscle After Acute or Repeated Exercise. *Archives Italiennes de Biologie*, Volume 145, pp. 99-110.
- Dąbkowska, M. et al., 2017. Adsorption/Desorption Transition of Recombinant Human Neurotrophin 4: Physicochemical Characterization. *Langmuir*, 33(38), pp. 9548-9557.
- Dagnell, C. et al., 2010. Neurotrophins and Neurotrophin Receptors in Pulmonary Sarcoidosis - Granulomas as a Source of Expression. *Respiratory Research*, 11(1), pp. 1-12.
- Dahlman, A. S. et al., 2019. Growth Factors and Neurotrophins in Patients with Stress-related Exhaustion Disorder. *Psychoneuroendocrinology*, Volume 109, pp. 1-6.

- Dechant, G. & Neumann, H., 2003. Neurotrophins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp. 303-334.
- Deinhardt, K. & Chao, M. V., 2014. Shaping Neurons: Long and Short Range Effects of Mature and proBDNF Signalling Upon Neuronal Structure. *Neuropharmacology*, Volume 76, pp. 603-609.
- Deinhardt, K. & Chao, M. V., 2014. Trk Receptors. *Handbook of Experimental Pharmacology*, Volume 220, pp. 103-119.
- Delezie, J. et al., 2019. BDNF is a mediator of glycolytic fiber-type specification in mouse skeletal muscle. *PNAS*, pp. 1-10.
- Dinoff, A., Herrmann, N., Swardfager, W. & Lanctôt, K. L., 2017. The Effect of Acute Exercise on Blood Concentrations of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Healthy Adults: A Meta-Analysis.. *European Journal of Neuroscience*, 46(1), pp. 1635-1646.
- Dinoff, A. et al., 2016. The Effect of Exercise Training on Resting Concentrations of Peripheral Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF): A Meta-Analysis. *PLoS One*, 11(9), pp. 1-21.
- Dishman, R. K. et al., 2006. Neurobiology of Exercise. *Obesity*, 14(3), pp. 345-356.
- Domínguez-Sánchez, M. A. et al., 2018. Acute Effects of High Intensity, Resistance, or Combined Protocol on the Increase of Level of Neurotrophic Factors in Physically Inactive Overweight Adults: The BrainFit Study. *Frontiers in Physiology*, Volume 9, pp. 1-12.
- Dongmei, L. et al., 2017. Immune Adaptation to Chronic Intense Exercise Training: New Microarray Evidence. *BMC Genomics*, 18(1), pp. 1-10.
- Duman, R. S. & Monteggia, L. M., 2006. A Neurotrophic Model for Stress-Related Mood Disorders. *Biological Psychiatry*, 59(12), pp. 1116-1127.
- Dupont-Versteegden, E. E. et al., 2003. Exercise-Induced Gene Expression in Soleus Muscle is Dependent on the Time After Spinal Cord Injury in Rats. *Muscle & Nerve*, 29(1), pp. 73-81.
- Eaton, B. S. & Eaton, S. B., 2003. An Evolutionary Perspective on Human Physical Activity: Implications for Health. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 136(1), pp. 153-159.
- Egan, B. & Zierath, J. R., 2013. Exercise Metabolism and the Molecular Regulation of Skeletal Muscle Adaptation. *Cell Metabolism*, 17(2), pp. 162-184.
- Erickson, K. I. et al., 2011. Exercise Training Increases Size of Hippocampus and Improves Memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(7), pp. 3017-3022.
- Erickson, K., Leckie, R. L. & Weinstein, A. W., 2014. Physical Activity, Fitness, and Gray Matter Volume. *Neurobiology of Aging*, Volume 35, pp. 20-28.
- Etherington, J. et al., 1996. The Effect of Weight-Bearing Exercise on Bone Mineral Density: A Study of Female Ex-Elite Athletes and the General Population. *Journal of Bone and Mineral Research*, 11(9), pp. 1333-1338.
- Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física, s.d. *Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física*. [Online]

Available at: [https://www.uc.pt/fcdef/Comissao\\_de\\_etica/Missao\\_CE](https://www.uc.pt/fcdef/Comissao_de_etica/Missao_CE)  
[Acedido em 15 Maio 2020].

- Fernandes, B. S. et al., 2014. Peripheral Brain-derived Neurotrophic Factor in Schizophrenia and the Role of Antipsychotics: Meta-analysis and Implications. *Molecular Psychiatry*, 20(9), pp. 1108-1119.
- Ferris, L. T., Williams, J. S. & Shen, C.-L., 2007. The Effect of Acute Exercise on Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels and Cognitive Function. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 39(4), pp. 728-734.
- Festing, S. & Wilkinson, R., 2007. The Ethics of Animal Research. Talking Point on the Use of Animals in Scientific Research. *EMBO Reports*, 8(6), pp. 526-530.
- Feter, N., Alt, R., Dias, M. G. & Rombaldi, A. J., 2019. How do Different Physical Exercise Parameters Modulate Brain-Derived Neurotrophic Factor in Healthy and Non-Healthy Adults? A systematic Review, Meta-Analysis and Meta-Regression. *Science & Sports*, 34(5), pp. 293-304.
- Fitzgerald, K. A., O'Neill, L. A. J., Gearing, A. J. H. & Callard, R. E., 2001. NT-4. Em: *The Cytokine Factsbook and Webfacts: Second Edition*. s.l.:Academic Press, pp. 412-414.
- Foltran, B. R. & Diaz, L. S., 2016. BDNF Isoforms: A Round Trip Ticket Between Neurogenesis and Serotonin?. *Journal of Neurochemistry*, 138(2), pp. 204-221.
- Franco, N. H., 2013. Animal Experiments in Biomedical Research: A Historical Perspective. *Animals*, 3(1), pp. 238-273.
- Friedman, W., 2012. Growth Factors. Em: S. T. Brady, G. J. Siegel, W. R. Albers & D. L. Price, edits. *Basic Neurochemistry (Eighth Edition)*. s.l.:Academic Press, pp. 546-557.
- Friedman, W. J., Black, I. B. & Kaplan, D. R., 1998. Distribution of the Neurotrophins Brain-Derived Neurotrophic Factor, Neurotrophin-3 and Neurotrophin-4/5 in the Postnatal Rat Brain: An Immunocytochemical Study. *Neuroscience*, 84(1), pp. 101-114.
- Fromy, B., Merzeau, S., Abraham, P. & Saumet, J.-L., 2000. Mechanisms of the Cutaneous Vasodilator Response to Local External Pressure Application in Rats: Involvement of CGRP, Neurokinins, Prostaglandins and NO. *British Journal of Pharmacology*, 131(6), pp. 1161-1171.
- Fujimura, H. et al., 2002. Brain-derived Neurotrophic Factor Is Stored in Human Platelets and Released by Agonist Stimulation. *Thrombosis and Haemostasis*, 87(4), pp. 728-734.
- Funakoshi, H. et al., 1995. Muscle-Derived Neurotrophin-4 as an Activity-Dependent Trophic Signal for Adult Motor Neurons. *Science*, 268(5216), pp. 1495-1499.
- Ghinelli, E. et al., 2003. Presence and Localization of Neurotrophins and Neurotrophin Receptors in Rat Lacrimal Gland. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(8), pp. 3352-3357.
- Gligoroska, J. P. & Manchevska, S., 2012. The Effect of Physical Activity on Cognition – Physiological Mechanisms. *Materia Sociomedica*, 24(3), pp. 198-202.

- Gold, S. M. et al., 2003. Basal Serum Levels and Reactivity of Nerve Growth Factor and Brain-Derived Neurotrophic Factor to Standardized Acute Exercise in Multiple Sclerosis and Controls. *Journal of Neuroimmunology*, 138(1-2), pp. 99-105.
- Green, M. J. et al., 2010. Brain-derived Neurotrophic Factor Levels in Schizophrenia: A Systematic Review with Meta-analysis. *Molecular Psychiatry*, 16(9), pp. 960-972.
- Green, S. H., Bailey, E., Wang, Q. & Davis, L. R., 2012. The Trk A, B, C's of Neurotrophins in the Cochlea.. *American Association for Anatomy*, 295(11), p. 1877–1895.
- Griffin, É. W. et al., 2011. Aerobic Exercise Improves Hippocampal Function and Increases BDNF in the Serum of Young Adult Males. *Physiology & Behaviour*, 104(5), pp. 934- 941.
- Gómez-Pinilla, F. et al., 2001. Differential regulation by exercise of BDNF and NT-3 in rat spinal cord and skeletal muscle. *European Journal of Neuroscience*, Volume 13, pp. 1078-1084.
- Guo, S. et al., 2008. Neuroprotection via Matrix-trophic Coupling Between Cerebral Endothelial Cells and Neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(21), pp. 7582-7587.
- Gu, X., Ding, F., Yang, Y. & Liu, J., 2015. Tissue Engineering in Peripheral Nerve Regeneration. Em: K. So & X. Xu, edits. *Neural Regeneration*. s.l.:ELSEVIER, pp. 73- 99.
- Höglund, O. C. et al., 2002. Nerve Growth Factor Levels and Localisation in Human Asthmatic Bronchi.. *European Respiratory Journal*, 20(5), pp. 1110-1116.
- Hölscher, C., 2017. Growth Factors: Neuronal Atrophy. Em: G. Laviola, ed. *Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology*. s.l.:Elsevier, pp. 1-7.
- Harvard Apparatus, s.d. *Hardware User's Manual*. [Online] Available at: [https://www.harvardapparatus.com/media/manuals/Product%20Manuals/PB-MF-MAN-072-REV-2.0%20LE8700TS%20serie\\_Treadmill.pdf](https://www.harvardapparatus.com/media/manuals/Product%20Manuals/PB-MF-MAN-072-REV-2.0%20LE8700TS%20serie_Treadmill.pdf) [Acedido em 28 Junho 2020].
- Holland, M. A. et al., 2015. Influence of Endurance Exercise Training on Antioxidant Enzymes, Tight Junction Proteins, and Inflammatory Markers in the Rat Ileum. *BMC Research Notes*, 8(1), pp. 1-10.
- Holloszy, J. O. & Coyle, E. F., 1984. Adaptations of Skeletal Muscle to Endurance Exercise and their Metabolic Consequences. *Journal of Applied Physiology*, 56(4), pp. 831-838.
- Hoshino, K., Andersen, M. L., Papale, L. A. & Alvarenga, T. A. F., 2016. Sleep Patterns in Rats. Em: M. L. Andersen & S. Tufik, edits. *Rodent Model as Tools in Ethical Biomedical Research*. São Paulo: Springer, p. 387.
- Huang, A. M. et al., 2006. Compulsive Exercise Acutely Upregulates Rat Hippocampal Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Journal of Neural Transmission*, 113(7), pp. 803-811.
- Huang, E. J. & Reichardt, L. F., 2003. Trk Receptors: Roles in Neuronal Signal Transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 72(1), pp. 609-642.
- Huang, T. et al., 2013. The Effects of Physical Activity and Exercise on Brain-Derived Neurotrophic Factor in Healthy Humans: A Review. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 24(1), pp. 1-10.



- Ibáñez, C. F., 1996. Neurotrophin-4: The Odd One Out In The Neurotrophin Family. *Neurochemical Research*, 21(7), pp. 787-793.
- Ip, N. Y. et al., 1992. Mammalian Neurotrophin-4: Structure, Chromosomal Localization, Tissue Distribution, and Receptor Specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(7), pp. 3060-3064.
- Janssens, J. et al., 2017. Development of Precision Small-Molecule Proneurotrophic Therapies for Neurodegenerative Diseases. Em: G. Litwack, ed. *Vitamins and Hormones*. s.l.:Academic Press, pp. 263-311.
- Jeon, Y. K. & Ha, C. H., 2017. The Effect of Exercise Intensity on Brain Derived Neurotrophic Factor and Memory in Adolescents. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 22(1), pp. 1-6.
- Karege, F., Schwald, M. & Cisse, M., 2002. Postnatal Developmental Profile of Brain-derived Neurotrophic Factor in Rat Brain and Platelets. *Neuroscience Letters*, 328(3), pp. 261- 264.
- Kashyap, M. P., Roberts, C., Waseem, M. & Tyagi, P., 2018. Drug Targets in Neurotrophin Signaling in the Central and Peripheral Nervous System. *Molecular Neurobiology*, 55(8), pp. 6939-6955.
- Kerschensteiner, M. et al., 1999. Activated Human T Cells, B Cells, and Monocytes Produce Brain-derived Neurotrophic Factor In Vitro and in Inflammatory Brain Lesions: A Neuroprotective Role of Inflammation?. *The Journal of Experimental Medicine*, 189(5), pp. 865-870.
- Knaepen, K., Goekint, M., Heyman, E. M. & Meeusen, R., 2010. Neuroplasticity – Exercise-Induced Response of Peripheral Brain-Derived Neurotrophic Factor: A Systematic Review of Experimental Studies in Human Subjects. *Sports Medicine*, 40(9), pp. 765- 801.
- Kojima, M. & Mizui, T., 2017. BDNF Propeptide: A Novel Modulator of Synaptic Plasticity. Em: G. Litwack, ed. *Vitamins & Hormones*. s.l.:Academic Press, pp. 19-28.
- Kowiański, P. et al., 2018. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 38(3), pp. 579-593.
- Krabbe, K. S. et al., 2007. Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) and Type 2 Diabetes. *Diabetologia*, 50(2), p. 431–438.
- László, A. et al., 2019. The Role of Neurotrophins in Psychopathology and Cardiovascular Diseases: Psychosomatic Connections. *Journal of Neural Transmission*, 126(3), pp. 265-278.
- Lanctôt, K., 2017. The Effect of Acute Exercise on Blood Concentrations of Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) in Healthy Adults: A Meta-analysis. *European Journal of Neuroscience*, 46(1), pp. 1635-1646.
- Laurenzi, M. A. et al., 1994. Expression of mRNA Encoding Neurotrophins and Neurotrophin Receptors in Rat Thymus, Spleen Tissue and Immunocompetent Cells. *European Journal of Biochemistry*, 223(3), pp. 733-741.
- Lauterborn, J. C. et al., 1998. Transcript-Specific Effects of Adrenalectomy on Seizure- Induced BDNF Expression in Rat Hippocampus. *Molecular Brain Research*, 55(1), pp. 81-91.

- Leßmann, V. & Brigadski, T., 2009. Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: An update. *Neuroscience Research*, 65(1), pp. 11-22.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K. K. & Hempstead, B. L., 2001. Regulation of Cell Survival by Secreted Proneurotrophins.. *Science*, 30(294), pp. 1945-1948.
- Lessman, V., Gottmann, K. & Malcangio, M., 2003. Neurotrophin Secretion: Current Facts and Future Prospects. *Progress in Neurobiology*, 69(5), pp. 341-371.
- Levi-Montalcini, R., 1987. The Nerve Growth Factor 35 Years Later. *Science*, Volume 237, pp. 1152-1162.
- Lingor, P., Unsicker, K. & Krieglstein, K., 2000. GDNF and NT-4 Protect Midbrain Dopaminergic Neurons from Toxic Damage by Iron and Nitric Oxide. *Experimental Neurology*, 163(1), pp. 55-62.
- Lippi, G., Mattiuzzi, C. & Sanchis-Gomar, F., 2019. Updated Overview on Interplay Between Physical Exercise, Neurotrophins, and Cognitive Function in Humans. *Journal of Sport and Health Science*, 9(1), pp. 74-81.
- Liu, D. et al., 2017. Immune Adaptation to Chronic Intense Exercise Training: New Microarray Evidence. *BMC Genomics*, 18(1), pp. 1-10.
- Lommatzsch, M. et al., 1999. Abundant Production of Brain-Derived Neurotrophic Factor by Adult Visceral Epithelia. Implications for Paracrine and Target-Derived Neurotrophic Functions. *The American Journal of Pathology* 1999, 155(4), pp. 1183-1193.
- Lommatzsch, M. et al., 2005. The Impact of Age, Weight and Gender on BDNF Levels in Human Platelets and Plasma. *Neurobiology of Aging*, 26(1), pp. 115-123.
- Lu, B., Nagappan, G. & Lu, Y., 2014. BDNF and Synaptic Plasticity, Cognitive Function, and Dysfunction.. *Handbook of Experimental Pharmacology*, Volume 220, pp. 2230-2250.
- Lu, B., Pand, P. T. & Woo, N. H., 2005. The Yin and Yang of Neurotrophin Action. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(8), pp. 603-614.
- Luijtelaaar, V. E. L. J. M. & Coenen, A. M. L., 1984. n EEG Averaging Technique for Automated Sleep-WakeStage Identification in the Rat. *Physiology & Behavior*, 33(5), pp. 837-841.
- Małkiewicz, M. A. et al., 2019. Blood-Brain Barrier Permeability and Physical Exercise. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), pp. 1-16.
- Mackay, C. P., Kuys, S. S. & Brauer, S. G., 2017. The Effect of Aerobic Exercise on Brain-Derived Neurotrophic Factor in People with Neurological Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neural Plasticity*, Volume 2017, pp. 1-9.
- Madis, M., Tõnis, T., Ernest, A. & Håkan, P., 1993. Differential Usage of Multiple Brain-derived Neurotrophic Factor Promoters in the Rat Brain Following Neuronal Activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(19), pp. 8802-8806.

- Maejima, H. et al., 2018. Exercise Enhances Cognitive Function and Neurotrophin Expression in the Hippocampus Accompanied by Changes in Epigenetic Programming in Senescence-Accelerated Mice. *Neuroscience Letters*, Volume 665, pp. 67-73.
- Maisonpierre, P. C. et al., 1991. Human and Rat Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-3: Gene Structures, Distributions, and Chromosomal Localizations. *Genomics*, 10(3), pp. 558-568.
- Marosi, K. & Mattson, M. P., 2014. BDNF Mediates Adaptive Brain and Body Responses to Energetic Challenges. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 25(2), pp. 89-98.
- Matsuda, H., Coughlin, M. D., Bienenstock, J. & Denburg, J. A., 1988. Nerve Growth Factor Promotes Human Hemopoietic Colony Growth and Differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(17), pp. 6508-6512.
- Matthews, V. B. et al., 2009. Brain-derived Neurotrophic Factor is Produced by Skeletal Muscle Cells in Response to Contraction and Enhances Fat Oxidation Via Activation of AMP-activated Protein Kinase. *Diabetologia*, 52(7), pp. 1409-1418.
- Meeker, R. B. & Williams, K. S., 2015. The p75 Neurotrophin Receptor: At The Crossroad Of Neural Repair and Death. *Neural Regeneration Research*, 10(5), pp. 721-25.
- Meuchel, L. W. et al., 2011. Neurotrophins Induce Nitric Oxide Generation in Human Pulmonary Artery Endothelial Cells. *Cardiovascular Research*, 91(4), pp. 668-676.
- Miranda, M., Morici, J. F., Zanoni, M. B. & Bekinschtein, P., 2019. Brain-Derived Neurotrophic Factor: A Key Molecule for Memory in the Healthy and the Pathological Brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, Volume 13, pp. 1-25.
- Misra, M., Cano, S. N. & Ackerman, K. E., 2016. Exercise, Training, and the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis in Men and Women. Em: F. Lanfranco & C. J. Strasburger, edits. *Sports Endocrinology*. Basel: Karger AG, pp. 27-43.
- Mizoguchi, H. et al., 2011. Matrix Metalloproteinase-9 Contributes to Kindled Seizure Development in Pentylentetrazole-Treated Mice by Converting Pro-BDNF to Mature BDNF in the Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 31(36), p. 12963-12971.
- Molendijk, M. L. et al., 2012. Serum BDNF Concentrations Show Strong Seasonal Variation and Correlations with the Amount of Ambient Sunlight. *PLoS ONE*, 7(11), pp. 1-7.
- Monnier, A. et al., 2016. Brain-derived Neurotrophic Factor of the Cerebral Microvasculature: A Forgotten and Nitric Oxide-dependent Contributor of Brain-derived Neurotrophic Factor in the Brain. *Acta Physiologica*, 219(4), pp. 790-802.
- Mrówczyński, W., 2019. Health Benefits of Endurance Training: Implications of the Brain-Derived Neurotrophic Factor — A Systematic Review. *Neural Plasticity*, pp. 1-15.
- Murer, M. G., Raisman-Vozari, R. & Yan, Q., 2001. Brain-derived Neurotrophic Factor in the Control Human Brain, and in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *Progress in Neurobiology*, 63(1), pp. 71-124.
- Nagappan, G. et al., 2009. Control of extracellular cleavage of ProBDNF by high frequency neuronal activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(4), pp. 1267-1272.

- Nakagomi, A. et al., 2015. Role of the Central Nervous System and Adipose Tissue BDNF/TrkB Axes in Metabolic Regulation. *npj Aging and Mechanisms of Disease*, 1(1).
- Nakahashi, T. et al., 2000. Vascular Endothelial Cells Synthesize and Secrete Brain-derived Neurotrophic Factor. *FEBS Letters*, 470(2), pp. 113-117.
- Nockher, W. A. & Renz, H., 2003. Neurotrophins in Inflammatory Lung Diseases: Modulators of Cell Differentiation and Neuroimmune Interactions. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 14(6), pp. 559-578.
- Nockher, W. A. & Renz, H., 2005. Neurotrophins in Clinical Diagnostics: Pathophysiology and Laboratory Investigation. *Clinica Chimica Acta*, 352(1-2), pp. 49-74.
- Oloff, H., Berchtold, N. C., Isackson, P. & Cotman, C. W., 1998. Exercise-Induced Regulation of Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) Transcripts in the Rat Hippocampus. *Molecular Brain Research*, 61(1-2), pp. 147-153.
- Orgorn, D. I. & Gardiner, P. F., 2010. Effect of Exercise and Muscle Type on BDNF, NT-4/5, and TrkB Expression in Skeletal Muscle. *Muscle & Nerve*, 41(3), pp. 385-391.
- Pan, W. et al., 1998. Transport of Brain-Derived Neurotrophic Factor Across the Blood-Brain Barrier. *Neuropharmacology*, 37(12), pp. 1553-1561.
- Pan, W. & Kastin, A. J., 1999. Penetration of Neurotrophins and Cytokines Across the Blood-Brain/Blood-Spinal Cord Barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 36(2-3), pp. 291-298.
- Pareja-Galeano, H. et al., 2015. Methodological Considerations to Determine the Effect of Exercise on Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels. *Clinical Biochemistry*, 48(3), pp. 162-166.
- Pasutto, F. et al., 2009. Heterozygous NTF4 Mutations Impairing Neurotrophin-4 Signaling In Patients With Primary Open-Angle Glaucoma.. *American Journal of Human Genetics*, 85(4), pp. 447-456.
- Pedersen, B. K., 2019. Physical Activity and Muscle-Brain Crosstalk. *Nature Reviews*, 15(3).
- Pedersen, B. K. et al., 2009. Role of Exercise-Induced Brain-Derived Neurotrophic Factor Production in the Regulation of Energy Homeostasis in Mammals. *Experimental Physiology*, 94(12), pp. 1153-1160.
- Philips, C., 2017. Brain-Derived Neurotrophic Factor, Depression, and Physical Activity: Making the Neuroplastic Connection. *Neural Plasticity*, pp. 1-17.
- Pincelli, C., 2017. p75 Neurotrophin Receptor in the Skin: Beyond Its Neurotrophic Function. *Frontiers in Medicine*, 4(22), pp. 1-8.
- Platholi, J. & Lee, F. S., 2018. Neurotrophic Factors. Em: W. J. Slikker, M. G. Paule & C. Wang, edits. *Handbook of Developmental Neurotoxicology (Second Edition)*. s.l.:Academic Press, pp. 55-64.
- Platholi, J. & Lee, F. S., 2018. Neurotrophic Factors. Em: W. J. Slikker, M. G. Paule & C. Wang, edits. *Handbook of Developmental Neurotoxicology*. s.l.:Academic Press, pp. 55-64.

- Polyakova, M. et al., 2015. BDNF as a Biomarker for Successful Treatment of Mood Disorders: A Systematic & Quantitative Meta-analysis. *Journal of Affective Disorders*, Volume 174, pp. 432-440.
- Prakash, Y. S. et al., 2010. Neurotrophins in lung health and disease. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 4(3), pp. 395-411.
- Prigent-Tessier, A. et al., 2013. Physical Training and Hypertension have Opposite Effects on Endothelial Brain-derived Neurotrophic Factor Expression. *Cardiovascular Research*, 100(3), pp. 374-382.
- Proença, C. C., Song, M. & Lee, F. S., 2016. Differential Effects of BDNF and Neurotrophin 4 (NT4) on Endocytic Sorting of TrkB Receptors.. *Journal of Neurochemistry*, 138(3), pp. 397-406.
- Qiang, M. A., 2008. Beneficial Effects of Moderate Voluntary Physical Exercise and its Biological Mechanisms on Brain Health. *Neuroscience Bulletin*, 24(4), pp. 265-270.
- Radka, S., Holst, P., Fritsche, M. & Altar, A., 1996. Presence of Brain-derived Neurotrophic Factor in Brain and Human and rat but Not Mouse Serum Detected by a Sensitive and Specific Immunoassay. *Brain Research*, 709(1), pp. 122-130.
- Rasmussen, P. et al., 2009. Evidence for a Release of Brain-Derived Neurotrophic Factor from the Brain During Exercise. *Experimental Physiology*, 94(10), pp. 1062-1069.
- Reichardt, L. F., 2006. Neurotrophin-Regulated Signalling Pathways. *Philosophical Transactions of The Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1473), pp. 1545-1564.
- Robinson, R. C. et al., 1999. The Structures Of The Neurotrophin 4 Homodimer and The Brain-Derived Neurotrophic Factor/Neurotrophin 4 Heterodimer Reveal a Common Trk-Binding Site. *Protein Science*, 8(12), pp. 2589-2597.
- Rosenfeld, R. D. et al., 1995. Purification and Identification of Brain-Derived Neurotrophic Factor from Human Serum. *Protein Expression and Purification*, 6(4), pp. 465-471.
- Ruggeri, P. et al., 2013. Neurotrophin and Neurotrophin Receptor Involvement in Human Neuroblastoma. Em: H. Shimada, ed. *Neuroblastoma*. Rijeka: InTech, pp. 47-108.
- Sánchez-Sánchez, J. & Arévalo, J. C., 2017. A Review on Ubiquitination of Neurotrophin Receptors: Facts and Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), pp. 1-11.
- Sahay, A. S., Sundrani, D. P. & Joshi, S. R., 2017. Neurotrophins: Role in Placental Growth and Development. Em: G. Litwack, ed. *Vitamins and Hormones*. Pune: ELSEVIER, pp. 243-261.
- Sakuma, K. et al., 2001. A possible role for BDNF, NT-4 and TrkB in the spinal cord and muscle of rat subjected to mechanical overload, bupivacaine injection and axotomy. *Brain Research*, 13(1-2), pp. 1-19.
- Sakuma, K. & Yamaguchi, A., 2011. The Recent Understanding of the Neurotrophin's Role in Skeletal Muscle Adaptation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, pp. 1-12.
- Sariola, H., 2001. The Neurotrophic Factors in Non-Neuronal Tissues. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(8), pp. 1061-1066.

- Scharfman, H. et al., 2005. Increased Neurogenesis and the Ectopic Granule Cells After Intrahippocampal BDNF Infusion in Adult Rats. *Experimental Neurology*, 192(2), pp. 348-356.
- Schimdt, H. D. & Duman, R. S., 2010. Peripheral BDNF Produces Antidepressant-Like Effects in Cellular and Behavioral Models. *Neuropsychopharmacology*, 35(12), pp. 2378- 2391.
- Schmolesky, M. T., Webb, D. L. & Hansen, R. A., 2013. The Effects of Aerobic Exercise Intensity and Duration on Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Healthy Men. *Journal of Sports Science and Medicine*, 12(3), pp. 502-511.
- Seifart, T. et al., 2010. Endurance Training Enhances BDNF Release from the Human Brain. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 298(2), pp. 372-377.
- Serra-Millàs, M., 2016. Are the Changes in the Peripheral Brain-derived Neurotrophic Factor Levels Due to Platelet Activation?. *World Journal of Psychiatry*, 6(1), pp. 84-101.
- Serviço Nacional de Saúde, 2017. *Serviço Nacional de Saúde*. [Online] Available at: <https://www.sns.gov.pt/noticias/2017/02/13/prevencao-do-sedentarismo/> [Acedido em 13 April 2020].
- Sidlo, J., Zaviacic, M. & Kvasnicka, P., 1995. Night and day differences in the food-intake of laboratory rats Wistar and Koletsky strains. *Bratisl Lek Listy*, 96(12), pp. 655-657.
- Singh, M., Meyer, E. M. & Simpkins, J., 1995. The Effect of Ovariectomy and Estradiol Factor in Cortical of Female Replacement Messenger and on Brain-Derived Ribonucleic Hippocampal Sprague-Dawley Neurotrophic Expression Acid Brain Regions Rats\*. *Endocrinology*, 136(5), pp. 2320-2324.
- Skaper, S. D., 2008. The Biology of Neurotrophins, Signalling Pathways, and Functional Peptide Mimetics of Neurotrophins and their Receptors. *CNS & Neurological Disorders*, 7(1), pp. 46-62.
- Skaper, S. D., 2017. Neurotrophic Factors: An Overview. *Methods in Molecular Biology*, Volume 1727, pp. 1-17.
- Skup, M. et al., 2002. Long-Term Locomotor Training Up-Regulates TrkBFL Receptor-like Proteins, Brain-Derived Neurotrophic Factor, and Neurotrophin 4 with Different Topographies of Expression in Oligodendroglia and Neurons in the Spinal Cord. *Experimental Neurology*, 176(2), pp. 282-307.
- Sleiman, S. F. et al., 2016. Exercise Promotes the Expression of Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Through the Action of the Ketone Body  $\beta$ -hydroxybutyrate. *eLife*, Volume 5, pp. 1-21.
- Sobreviela, T. et al., 1994. TrkA-Immunoreactive Profiles in the Central Nervous System: Colocalization With Neurons Containing p75 Nerve Growth Factor Receptor, Choline Acetyltransferase, and Serotonin. *The Journal of Comparative Neurology*, 350(4), pp. 587-611.
- Suliman, S., Hemmings, S. M. J. & Seedat, S., 2013. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) protein levels in anxiety disorders: systematic review and meta-regression analysis. *Front. Integr. Neurosci.*, Volume 7.

- Szczepankiewicz, A. et al., 2012. Serum Neurotrophin-3 and Neurotrophin-4 Levels are Associated with Asthma Severity in Children.. *European Respiratory Society*, 38(4), pp. 1035-1037.
- Szuhany, K. L., Bugatti, M. & Otto, M. W., 2015. A Meta-Analytic Review of the Effects of Exercise on Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Journal of Psychiatric Research*, Volume 60, pp. 56-64.
- Türk, P. & Frizzo, M. E., 2015. Riluzole Stimulates BDNF Release from Human Platelets. *BioMed Research International*, pp. 1-6.
- Tang, S. W. et al., 2008. Influence of Exercise on Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor Concentrations in Healthy Human Subjects. *Neuroscience Letters*, 431(1), pp. 62-65.
- Tapia-Arancibia, L., Aliaga, E., Silhol, M. & Arancibia, S., 2008. New Insights into Brain BDNF Function in Normal Aging and Alzheimer Disease. *Brain Research Reviews*, 59(1), pp. 201-220.
- Tarassova, O. et al., 2020. Peripheral BDNF Response to Physical and Cognitive Exercise and Its Association With Cardiorespiratory Fitness in Healthy Older Adults. *frontiers in Physiology*, Volume 11.
- Teixeira, A. L., Barbosa, I. G., Diniz, B. S. & Kummer, A., 2010. Circulating Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor: Correlation With Mood, Cognition and Motor Function. *Biomarkers in Medicine*, 4(6), pp. 871-887.
- Teng, H. K. et al., 2005. ProBDNF Induces Neuronal Apoptosis via Activation of a Receptor Complex of p75NTR and Sortilin. *Journal of Neuroscience*, 25(22), pp. 5455-5463.
- Timmusk, T., Belluardo, N., Metsis, M. & Persson, H., 1993. Widespread and Developmentally Regulated Expression of Neurotrophin-4 mRNA in Rat Brain and Peripheral Tissues. *European Journal of Neuroscience*, 5(6), pp. 605-613.
- Timmusk, T. et al., 1993. Multiple Promoters Direct Tissue-Specific Expression of the Rat BDNF Gene. *Neuron*, 10(3), pp. 475-489.
- Tolwani, R. J. et al., 2002. BDNF Overexpression Increases Dendrite Complexity in Hippocampal Dentate Gyrus. *Neuroscience*, 114(3), pp. 795-805.
- Tometten, M., Blois, S. & Arck, P. C., 2005. Nerve Growth Factor in Reproductive Biology: Link between the Immune, Endocrine and Nervous System?. *Immunology of Pregnancy*, Volume 89, pp. 135-148.
- Universidade de Coimbra, s.d. *Universidade de Coimbra*. [Online] Available at: <https://www.uc.pt/fmuc/bioterio> [Acedido em 13 07 2020].
- Universidade de Coimbra, s.d. *Universidade de Coimbra*. [Online] Available at: <https://www.uc.pt/fmuc/bioterio/orbea> [Acedido em 15 January 2020].
- Vaynman, S., Ying, Z. & Gomez-Pinilla, F., 2004. Hippocampal BDNF Mediates the Efficacy of Exercise on Synaptic Plasticity and Cognition. *European Journal of Neuroscience*, 20(10), pp. 2580-2590.

- Villanueva, R., 2013. Neurobiology of Major Depressive Disorder. *Neural Plasticity*, pp. 1-17.
- Voss, M. W. et al., 2011. Aerobic Fitness Is Associated With Greater Efficiency of the Network Underlying Cognitive Control in Preadolescent Children. *Neuroscience*, Volume 199, pp. 166-176.
- Walsh, E. I. et al., 2020. Towards an Understanding of the Physical Activity-BDNF-Cognition Triumvirate: A Review of Associations and Dosage. *Ageing Research Reviews*, Volume 60, pp. 1-12.
- Walsh, J. J. & Tschakovsky, M. E., 2018. Exercise and Circulating BDNF: Mechanisms of Release and Implications for the Design of Exercise Interventions. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*, 43(11), pp. 1095-1104.
- Wetsel, W. C. et al., 2013. Disruption of the Expression of the Proprotein Convertase PC7 Reduces BDNF Production and Affects Learning and Memory in Mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(43), pp. 17362-17367.
- Woo, N. H. et al., 2005. Activation of p75NTR by proBDNF Facilitates Hippocampal Long-Term Depression. *Nature Neuroscience*, 8(8), pp. 1069-1077.
- World Health Organization, 1976. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Bulletin of the World Health Organization*, 54(2), pp. 129-139.
- Wrann, C. D. et al., 2013. Exercise Induces Hippocampal BDNF Through a PGC-1 $\alpha$ /FNDC5 Pathway. *Cell Metabolism*, 18(5), pp. 649-659.
- Xiao, N. & Le, Q.-T., 2016. Neurotrophic Factors and Their Potential Applications in Tissue Regeneration. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*, 64(2), pp. 89-99.
- Yamamoto, H. & Gurney, M. E., 1990. Human Platelets Contain Brain-Derived Neurotrophic Factor. *The Journal of Neuroscience*, 10(11), pp. 3469-3478.
- Yamamoto, M. et al., 1996. Expression of mRNAs for Neurotrophic Factors (NGF, BDNF, NT-3, and GDNF) and Their Receptors (p75NGFR, TrkA, TrkB, and TrkC) in the Adult Human Peripheral Nervous System and Nonneural Tissues. *Neurochemical Research*, 21(8), pp. 929-938.
- Yang, J. et al., 2014. ProBDNF Negatively Regulates Neuronal Remodeling, Synaptic Transmission and Synaptic Plasticity in Hippocampus. *Cell Reports*, 7(3), pp. 796-806.
- Zagrebelsky, M. et al., 2005. The p75 Neurotrophin Receptor Negatively Modulates Dendrite Complexity and Spine Density in Hippocampal Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 25(43), pp. 9989-9999.
- Zembron-Lacny, A. et al., 2016. Peripheral Brain-Derived Neurotrophic Factor is Related to Cardiovascular Risk Factors in Active and Inactive Elderly Men. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 49(7), pp. 1-8.
- Zhang, S.-H. et al., 2000. Neurotrophin 4/5 Immunoassay: Identification of Sources of Errors for the Quantification of Neurotrophins. *Journal of Neuroscience Methods*, 99((1-2)), pp. 199-127.



- Zhang, S.-H., Zhou, X.-F., Deng, Y.-S. & Rush, R. A., 1999. Measurement of Neurotrophin 4/5 in Rat Tissues by a Sensitive Immunoassay. *Journal of Neuroscience Methods*, 89(1), pp. 69-74.
- Zheleznyakova, G. Y., Cao, H. & Schiöth, H. B., 2016. BDNF DNA methylation changes as a biomarker of psychiatric disorders: literature review and open access database analysis. *Behavioral and Brain Functions*, 12(1), pp. 1-14.
- Ziegenhorn, A. A. et al., 2007. Serum Neurotrophins—A study on the Time Course and Influencing Factors in a Large Old Age Sample. *Neurobiology of Aging*, 28(9), pp. 1436-1445.
- Zoladz, J. A. & Pilc, A., 2010. The Effect of Physical Activity on the Brain Derived Neurotrophic Factor: From Animal to Human Studies. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 61(5), pp. 533-541.