UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA
PROGRAMA DE NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO

DAIANE DE OLIVEIRA FONTES

Estudo do polimorfismo Val66Met na população brasileira e influência nos níveis plasmáticos de BDNF e reabilitação de pacientes pós-AVC

São Paulo
2016

DAIANE DE OLIVEIRA FONTES

Estudo do polimorfismo Val66Met na população brasileira e influência nos níveis plasmáticos de BDNF e reabilitação de pacientes pós-AVC

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação de Neurociências e Comportamento do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Neurociências e Comportamento

Orientadora: Profa. Dra. Michele Schultz

São Paulo
2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação na publicação
Biblioteca Dante Moreira Leite
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Fontes, Daiane de Oliveira.
Estudo do polimorfismo Val66Met na população brasileira e influência nos níveis plasmáticos de BDNF e reabilitação de pacientes pós-AVC/ Daiane de Oliveira Fontes; orientadora Michele Schultz. - São Paulo, 2016.
72 f.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Área de Concentração: Neurociências e Comportamento) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

1. Acidente vascular cerebral. 2. Fator neurotrófico derivado do cérebro – BDNF. 3. Reabilitação. 4. Polimorfismo. I. Título.

RC388.5

FONTES, D. O. **Relação entre o polimorfismo Val66Met, níveis plasmáticos de BDNF e reabilitação de pacientes pós-AVC**. Dissertação apresentada ao Programa de Neurociências e Comportamento do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Aos pacientes da rede Lucy-Montoro que se propuseram a participar deste projeto e, mesmo diante de tantas dificuldades que no momento se encontravam, talvez enxergassem na pesquisa uma possibilidade de dias melhores.

À minha mãe Benedita Del Rio que me dá forças todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Quando iniciei a pós-graduação, o que eu via eram alunos doentes, estressados, choro e angústia e eu pensava: “não vou ficar assim, não é isso que vim fazer aqui”. Hoje, no fim deste processo, percebo que fiquei próximo a esse estado, teve estresse, ansiedade e choro, sim; mas, não adoeci, não enlouqueci.

Fiz amigos de verdade, conheci lugares novos, formas diferente de pensar, pude viver a universidade – coisa que não pude fazer durante a graduação, pois tive que conciliar trabalho e estudo – e, o mais importante, aprendi que sozinha não posso chegar a lugar algum, pois foram tantas pessoas me ajudando a chegar até aqui que o mínimo que posso fazer é agradecê-las.

Primeiramente agradeço a Deus por me dar discernimento, saúde física e mental para chegar até aqui.

À Profa. Dra. Michele Schultz por, desde a graduação, me ensinar os passos deste universo de docência e pesquisa; mas, mais do que isso, quero agradecer por abrir as portas da sua casa às oito horas da manhã depois de um feriado. Este gesto tem um valor imensurável para mim e para minha vida.

À minha mãe Benedita Del Rio que, sem pedir nada em troca, mesmo eu ficando quase um ano sem bolsa de estudo e sem renda alguma, ajudou-me – e ajuda-me – incessantemente. À minha irmã Deise Del Rio por ter me incentivando desde sempre a chegar até aqui e sente um baita orgulho de mim. Ao meu noivo, Fabio Roberto, pela paciência, companheirismo e apoio a tudo o que eu faço.

Às minhas amigas Tatiana Seito que, desde o início desta jornada, esteve comigo, me ajudando, apoiando e sendo minha companheira de trabalho, aquelas que a gente não pode ficar sem. Milena Telles que, em meio a tantas dificuldades pessoais, parou e disse: “eu tenho tempo para você”. A Gabriela que, com toda sua doçura, carinho e inteligência, ajudou-me tanto a finalizar esta jornada.

Às equipes dos laboratórios por onde passei e que tiveram paciência e empatia comigo no processo de aprendizado dos protocolos – e olha que eu achava que nem aprenderia a ajustar uma pipeta.

À secretaria do IP, em especial ao Gustavo e a Sonia pelo atendimento acolhedor, competente e atencioso.

Ao estatístico do IP Luís pela dedicação, paciência e principalmente por ter se tornado um amigo.

Aos professores do PAE, que me deram a oportunidade compreender o que é lecionar no ensino superior.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Muito obrigada a todos!

Esta dissertação, na data expressa na publicação, está em vigor com as seguintes normas:

Adaptado da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnica), NBR 6023.

Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas da USP. Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP : documento eletrônico e impresso Parte I (ABNT) / Sistema Integrado de Bibliotecas da USP ; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, coordenadora [et al.]. 2. ed. rev. ampl. São Paulo: Sistema Integrado de Bibliotecas da USP, 2009. 102 p. (Cadernos de Estudos; 9).

RESUMO

FONTES, D. O. **Estudo do polimorfismo Val66Met na população brasileira e influência nos níveis plasmáticos de BDNF e reabilitação de pacientes pós-AVC**. 2016. 72f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Neurociências e Comportamento, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O número de pessoas acometidas por doenças cérebro vasculares, entre as quais, o acidente vascular cerebral (AVC), constitui um cenário alarmante nos dias atuais, fato que pode estar associado ao aumento da longevidade. A recuperação funcional de pessoas com sequelas de AVC requer a aplicação de técnicas de reabilitação que se baseiam em princípios de neuroplasticidade; no entanto, pouco se sabe quais são os benefícios morfofuncionais resultantes de diferentes abordagens terapêuticas. O presente estudo, portanto, teve como objetivos analisar a concentração plasmática de BDNF antes e após tratamento de reabilitação de indivíduos com AVC e correlacionar com o polimorfismo Val66Met; identificar e comparar a frequência do polimorfismo Val66Met na população brasileira e em pessoas que sofreram AVC. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da EACH/USP. O estudo foi dividido em duas abordagens experimentais: (i) caracterização genotípica de pessoas com diagnóstico de AVC e sua relação com diferentes protocolos de reabilitação e com o BDNF plasmático e (ii) estudo genético populacional para caracterização da frequência do polimorfismo Val66Met na população brasileira. Participaram deste estudo indivíduos saudáveis dos estados de Alagoas, Rio Grande do Sul e São Paulo (n=1558) e pacientes com sequelas de AVC (n=54). A análise do BDNF plasmático foi realizada por meio do teste imunoenzimático de ELISA e somente os indivíduos submetidos à terapia robótica tiveram níveis aumentados de BDNF circulante. As análises do polimorfismo Val66Met foram realizadas utilizando a técnica de PCR-RFLP (HRM). Não houve associação entre o polimorfismo e os níveis plasmáticos de BDNF. As frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo Val66Met dos indivíduos saudáveis e com AVC foram muito semelhantes. Os dados de gênero apontou aumento nos níveis de BDNF em mulheres, entretanto, a idade não interferiu nos níveis de BDNF. Considerando-se os resultados, podemos concluir que o polimorfismo não apresenta relação com a ocorrência de AVC e não interfere nos níveis

plasmáticos de BDNF plasmático. No que concerne às técnicas de reabilitação, a terapia robótica pode ser mais efetiva para desencadear eventos de neuroplasticidade considerando o aumento de BDNF circulante após o tratamento. Através do estudo populacional foi possível verificar que o perfil da miscigenação mudou ao longo de três gerações analisadas e confirmamos a presença rara do polimorfismo em pessoas de cor/raça preta e indígena.

Palavras-chave: Acidente Vascular Cerebral (AVC); Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF); Reabilitação; Polimorfismo.

ABSTRACT

FONTES, D. O. **Study of Val66Met polymorphism on Brazilian population and the influence on plasmatic levels of BDNF and rehabilitation of post stroke patients. 2016**. 73f. Dissertation (master degree) – Neuroscience and Behavior Program, Institute of Psychology. University of São Paulo, São Paulo, 2016.

The number of people affected by cerebrovascular diseases, including the stroke, is an alarming scenario nowadays, which may be associated with the increment of the longevity. Functional recovery of people with stroke sequelae requires the application of rehabilitation techniques based on principles of neuroplasticity, however, the knowledge about how the morphological and functional benefits of different therapeutic approaches is insipient. This study, therefore, aimed to analyze the plasma concentration of BDNF before and after rehabilitation program of patients with stroke and correlate with Val66Met polymorphism; to identify and to compare the frequency of Val66Met polymorphism in the Brazilian population and in the patients who have suffered strokes. The experimental procedures were approved by the Research Ethics Committee of EACH/USP. The study was divided into two experimental approaches: (i) genotypic characterization of people diagnosed with stroke and their relation to different rehabilitation protocols and plasma BDNF and (ii) populational genetic study to characterize the frequency of Val66Met polymorphism in the Brazilian population. The study included healthy individuals in the states of Alagoas, Rio Grande do Sul and São Paulo (n = 1558) and patients with stroke sequelae (n = 54). The analysis of plasma BDNF was performed by immunoenzymatic test ELISA, and only those individuals undergoing robotic therapy had increased levels of circulating BDNF. The analysis of the polymorphism Val66Met was performed using PCR-RFLP (HRM). There was no association between the polymorphism and the plasma levels of BDNF. The genotypic and allelic frequencies of the Val66Met polymorphism of healthy individuals and stroke were similar. The gender data showed an increase in BDNF levels in women, but age did not interfere with BDNF levels. Considering the results, we can conclude that the polymorphism is not related to the occurrence of stroke and does not affect the plasma levels of serum BDNF. As regards the rehabilitation techniques, robotic therapy may be more effective to trigger neuroplasticity events considering the increase of circulating

BDNF after treatment. Through the study population was possible to verify that the profile of miscegenation has changed over the three generations examined and confirmed the presence of the rare polymorphism in black and indigenous people.

Keywords: Stroke; Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF); Rehabilitation; Polymorphism.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 14
1.1. AVC e estratégias de reabilitação 15
1.2. Fator neurotrófico derivado do cérebro – BDNF 19
1.3. BDNF, aprendizado e memória 21
1.4. Neuroplasticidade 23
1.5. Polimorfismos do BDNF Val66Met 24
2. Objetivos 27
3. Materiais e métodos 27
3.1. Estudo com os indivíduos com AVC 29
3.1.1. Critérios de inclusão dos indivíduos com AVC 29
3.1.2. Critérios de exclusão 29
3.1.3. Estratégias de reabilitação para sujeitos com AVC 30
3.1.4. Análise da concentração plasmática de BDNF 31
3.2. Estudo populacional 32
3.3. Técnicas de Biologia Molecular 32
3.3.1. Extração do DNA 33
3.3.2. Genotipagem do polimorfismo Val66Met 34
3.4. Análise Estatística 35
4. Resultados 36
4.1. Estudo com os indivíduos com AVC 36
4.1.1. Análise do BDNF plasmático 37
4.1.2. Genótipo do grupo AVC 40
4.1.3. Relação entre níveis de BDNF e genótipo 41
4.2. Estudo populacional 42
4.2.1. Caracterização genotípica 43
4.2.2. Estudo das relações entre cor/raça e genotipagem 44
4.2.2.1. Genotipagem e cor/raça da mãe 45
4.2.2.2. Genotipagem e cor/raça do pai 46
4.2.2.3. Genotipagem e cor/raça da avó materna 46
4.2.2.4. Genotipagem e cor/raça do avô materno 47
4.2.2.5. Genotipagem e cor/raça da avó paterna 48
4.2.2.6. Genotipagem e cor/raça do avô paterno 48
4.2.2.7. Cor/raça do participante e cor/raça da mãe 50
4.2.2.8. Cor/raça do participante e cor/raça do pai 51
4.2.2.9. Cor/raça do participante e cor/raça da avó materna 53
4.2.2.10. Cor/raça do participante e cor/raça do avô materno 54
4.2.2.11. Cor/raça do participante do estudo e a cor/raça da avó paterna 56
4.2.2.12. Cor/raça do participante do estudo e a cor/raça do avô paterno 57
4.2.2.13. Genótipo e local de nascimento 58
5. Discussão 60
6. Conclusão 66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 67

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, observou-se o aumento da longevidade da população mundial causado, dentre outros fatores, pela melhoria da qualidade de vida que é, por sua vez, um conceito subjetivo e multidimensional, pois cada indivíduo possui parâmetros particulares acerca do que lhe traz satisfação. Além disso, trata-se de considerar a percepção da pessoa sobre o seu estado de saúde e sobre os aspectos subjetivos do seu contexto de vida (SEIDL; ZANNON, 2004). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010), o número de pessoas acima de 60 anos dobrou nas últimas décadas, passando de 7 milhões para 14,5 milhões de idosos, com expectativa média de vida dos brasileiros de 73,5 anos. Devido ao envelhecimento da população e inversão da pirâmide etária, a prevalência geral de doenças crônicas tem aumentado.

O perfil epidemiológico brasileiro é marcado por um acentuado aumento de mortes por doenças cerebrovasculares e, também, por um maior número de pessoas com doenças e incapacidades crônicas devido ao crescente envelhecimento populacional. Dentre as doenças cerebrovasculares, o acidente vascular cerebral (AVC) destaca-se como sendo uma das grandes preocupações da atualidade, devido a sua alta incidência e considerando que os sintomas se desenvolvem rapidamente (GOTTLIEB *et al*., 2011). É também uma doença que pode trazer muitos prejuízos ao paciente, sejam estes, físicos, psicológicos ou sociais, afetando a qualidade de vida.

Dados epidemiológicos mostram que o AVC figura-se entre as doenças de maior prevalência, mortalidade e morbidade, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares, provocando 9% de todas as causas de morte em todo o mundo (DONNAN *et al*., 2008). Ainda, segundo dados do sistema único de saúde (DATASUS, 2015), este cenário tende a se manter até o ano de 2030.

Dados do Ministério Saúde (2013) mostram que o AVC está entre as doenças que mais mata no Brasil, bem como no cenário mundial; sendo assim, prevalente em países desenvolvidos e em desenvolvimento. O AVC começou a ser diagnosticado na população brasileira desde 1960 e acomete, principalmente, pessoas com mais de 50

anos (OTERO *et al*., 2009).

Além do AVC apresentar altos índices de mortalidade, também gera custos elevados para o Sistema Único de Saúde. Uma avaliação do cenário mundial revela que o AVC consome cerca de 2 a 4% dos custos com o cuidado na área da saúde, e somente nos países industrializados estes custos somam mais de 4% do total direcionado à saúde (DONNAN *et al*., 2008).

1.1. AVC e estratégias de reabilitação

A probabilidade de o indivíduo ser acometido por uma doença crônica como o acidente vascular cerebral está diretamente associada ao aumento da longevidade, pois o processo de envelhecimento está relacionado com diversas mudanças funcionais e morfofisiológicas (Agência Nacional de Saúde Suplementar, 2011).

Já que muitas pessoas acometidas com a doença ficam incapacitadas, permanentemente ou por algum período de tempo, há perda da capacidade física e da independência o que pode gerar isolamento social e, consequentemente, problemas psicológicos. O que pode demandar maior ajuda governamental.

Apesar da alta incidência de casos de AVC, estudos mostram que a população brasileira sofre pela falta de informação sobre as causas e consequências da doença e cerca de 90% dos brasileiros dizem não ter nenhum tipo de informação sobre o assunto (Sociedade Brasileira de Doenças Cérebro Vasculares, 2015). Devido à falta de informação, há muita ansiedade e preocupação dos pacientes quanto à recuperação e tratamento do AVC. Sendo assim, para estabelecer estratégias de recuperação, é preciso considerar o tipo, a área cerebral acometida, a gravidade inicial causada ao encéfalo, os processos de recuperação neurológica e a severidade da paresia do membro superior afetado, pois esses são fatores de maior contribuição para recuperação do movimento (HOLLOWAY *et al*., 1999).

O AVC é uma doença que acomete o sistema nervoso central e pode ser definido como “instalação de um déficit neurológico focal, repentino e não convulsivo

determinado por uma lesão cerebral, secundária a um mecanismo vascular e não traumático" (BRAGA *et al*., 2003). Os AVCs podem ser secundários à embolia arterial e a processos de trombose arterial e/ou venosa causando, assim, isquemia e/ou hemorragia cerebral. Uma das consequências deste evento é a diminuição das atividades neuronais que pode levar a processos de morte neuronal e irreversibilidade funcional (BRAGA *et al*., 2003).

Além disso, é caracterizado por anormalidades no fornecimento de nutrientes como glicose e oxigênio no encéfalo, o que pode levar ao comprometimento funcional ou anatômico. O AVC pode ser dividido em três tipos: trombótico, embólico e hemorrágico, conforme descrição apresentada na tabela 1 (VELASQUES; RIBEIRO, 2013).

Tabela 1 – Classificação do AVC
(Adaptado de Velasques & Ribeiro, 2013)

Tipos de AVC	**Descrição fisiopatológica**
Trombótico (isquêmico)	Interrupção total ou parcial do fluxo sanguíneo por conta de placas ateroscleróticas.
Embólico (isquêmico)	Interrupção total ou parcial do fluxo sanguíneo causado pelo deslocamento de êmbolo.
Hemorrágico	Ruptura de vaso sanguíneo no encéfalo.

O paciente que teve um AVC PODE apresentar hemiplegia (paralisia da metade do corpo, lado direito ou esquerdo no plano sagital) ou hemiparesia (paralisia parcial ou diminuição da força em um lado do corpo), déficits de movimento que levam a limitações funcionais e a diversas incapacidades (VELASQUES; RIBEIRO, 2013).

Segundo a Sociedade Brasileira de Doenças Cerebrovasculares (2015), os sintomas mais comuns em um evento de AVC são: (i) fraqueza ou formigamento na face, no membro superior e ou no membro inferior, especialmente em um lado do corpo, (ii) confusão, alteração da fala ou dificuldade de compreensão, (iii) alteração na visão (em um ou ambos os olhos), (iv) alteração do equilíbrio, (v) coordenação, tontura ou alteração no andar e (vi) dor de cabeça súbita e intensa, sem causa aparente.

Como já mencionado, com o aumento da expectativa de vida, o Brasil apresenta um número crescente de idosos a cada ano. No processo normal do envelhecimento,

existem declínios das atividades biológicas e causas multifatoriais podem interferir neste processo, como, por exemplo, maus hábitos alimentares, sedentarismo e outros. Além disso, ocorrem alterações relacionadas a fatores genéticos e/ou ambientais, tais como a falta de prática de exercício físico, alimentação inadequada, consumo elevado de álcool, uso de drogas, tabagismo, hipertensão, diabetes entre outros fatores (GOTTLIEB *et. al*. 2011). Tais fatores, combinados com os declínios do envelhecimento, podem ser considerados de risco para o desenvolvimento de doença cerebrovascular.

Diante do cenário epidemiológico e disfuncional do AVC, algumas terapias são apresentadas como alternativas de tratamento. Os pacientes do foram submetidos a dois tipos de terapia que visam a melhora funcional e motora do paciente: (i) a terapia de contenção induzida (TCI - "*constraint-induced movement therapy*") que, através da ativação de mecanismos de neuroplasticidade, objetiva recuperar a função do membro superior parético de pacientes que apresentam sequelas motoras de lesões encefálicas e (ii) a terapia robótica (TR) que utiliza dispositivos robotizados acoplados a estratégias visuais de *feedback* positivo e é também utilizada para reabilitação de membros superiores.

A TCI é aplicada por meio de treinamento intensivo e uso de uma restrição, luva ou tipoia, no membro superior não parético durante grande parte do dia (figura 1). Este tipo de terapia é importante, pois as pessoas acometidas por AVC tendem a evitar o uso do membro afetado. Este evento é chamado de "desuso aprendido", descrito por Taub e colaboradores (1980) em experimento com primatas que voltaram a utilizar o membro superior parético nas atividades cotidianas após o uso forçado durante duas semanas (TAUB *et al*.1980).

Figura 1 – Foto ilustrando uma situação de paciente submetido à Terapia de contenção induzida.[1]

A diminuição do uso espontâneo do membro pode resultar da diminuição da parte representativa do córtex devido ao AVC, levando à frustração do paciente por não conseguir usar o membro com total eficiência, isso faz com que o paciente prefira usar a extremidade intacta por ter mais facilidade. O procedimento da TCI tem como resultado esperado a reorganização cortical e mudanças relacionadas à excitabilidade do córtex motor, eventos que caracterizam processos de neuroplasticidade (POCHET, 2009).

Dispositivos robóticos de terapia para membros superiores começaram a ser desenvolvidos no final dos anos de 1990 e foram incorporados aos processos de neurorreabilitação como complementos a tratamentos convencionais (figura 2). Atualmente, são usados como estratégias principais de terapia e há diversos estudos que demonstram a eficácia do tratamento (VELASQUES & RIBEIRO, 2013).

Os robôs são agentes que produzem sequências de movimentos com cinemática e dinâmica controladas de maneira confiável. Eles são manipulados ou articulados possibilitando a intensificação do treinamento, com isso, alguns autores relacionam as alterações na densidade sináptica no córtex motor primário após 400 repetições de movimentos feitos pelo paciente, tornando a TR um importante agente para neurorreabilitação (HUANG *et al*.,2009).

1. Disponível em: <http://www.terapiaocupacional.com.br/atendimento/intervencoes-práticas.aspx.>. Acesso em: 12 out. 2016.

Figura 2 – Foto ilustrando uma sessão de Terapia Robótica
(Robô *InMotion 2 e 3*, da *Interactive Motion Technologies)*[2].

No ano de 2013, o centro de reabilitação “Rede Lucy Montoro” disponibilizou aos pacientes uma nova terapia por meio do único robô disponível até então na América Latina, o “InMotion 2”. Este dispositivo permite dois graus de movimentos assistidos das articulações do ombro e do cotovelo por meio dos movimentos das mãos e do antebraço. Um jogo no computador com *feedback* auditivo, visual e tátil faz com que o paciente tenha mais interesse pela terapia e prazer em realizar a tarefa. Com este dispositivo é possível treinar os níveis de funções, melhorar a força e a mobilidade, estimulando novas conexões neurais, e, portanto, sendo um deflagrador de mecanismos de neuroplasticidade.

1.2. Fator neurotrófico derivado do cérebro – BDNF

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF – *brain derived neurotrofic factor*) é uma molécula com atividade neurotrófica sintetizada, principalmente, pelas células da

2. Disponível em:< http://www.bionikusa.com/philippines-hospital-uses-inmotion-robotics/>. Acesso em: 12 out. 2016.

glia e pelos núcleos neuronais. Foi descoberta em 1982 por Bared e colaboradores e é classificada como uma das principais neurotrofinas presentes no sistema nervoso. O BDNF é um importante fator neurotrófico que, entre outras funções, modula a formação e o funcionamento das conexões entre os neurônios, ou seja, age como mediador de processos de neuroplasticidade (ZHAO *et al*., 2005; SZAPACS *et al*., 2004;).

Há maior expressão de BDNF no cerebelo, hipocampo, amígdala e neocórtex, áreas ligadas respectivamente com aprendizado e memória, regulação do conteúdo emocional da memória e controle dos movimentos voluntários (SHIMIZU *et al*., 2003).

Segundo Hallbook (1999), os genes das neurotrofinas podem ter se originado por duplicação de uma porção sucessiva do genoma e derivado de ancestrais cordados. Antes de se constituírem em neurotrofinas, os componentes desta família são inicialmente compreendidos como peptídeos, sintetizados no início como pró-neurotrofinas que, posteriormente, são clivadas e formam as proteínas. O BDNF, que é um membro da família das neurotrofinas, é uma proteína que tem sido altamente conservada com relação a sua estrutura e função durante a evolução (RICHARDSON, 1991; IBAÑES, 1998; GOTZ *et al*., 1992).

A eficiência da ação das diferentes neurotrofinas depende do tipo de célula. No caso de neurônios do hipocampo, o BDNF é utilizado em uma via reguladora, enquanto o fator de crescimento do nervo (NGF – *nerve growth fator)* é utilizado em uma via constitutiva (MOWLA *et al*., 1999; FARHADI *et al*., 2000). Dentro da célula, o BDNF tem um importante papel no armazenamento, transporte, secreção e processamento de neurotrofinas, etapas reguladoras (pós-transcricional) do controle de funções neuronais no cérebro do indivíduo adulto (REICHARDT, 2006).

O BDNF está associado a processos de diferenciação, sobrevivência e crescimento de células neuronais, promove a plasticidade sináptica e é um fator atrativo ao axônio, uma vez que ajuda no crescimento axonal, remodelação dendrítica e sobrevivência de vários neurônios do sistema nervoso central (LINDHOLM *et al*., 1996). Além disso, pode estar implicado nas bases fisiopatológicas de algumas doenças (OLIVEIRA *et al*., 2010) como por exemplo, na obesidade, no diabetes tipo 2, na depressão, na doença de Alzheimer, na doença de Parkinson e no comprometimento cognitivo leve (PEDERSEN *et al*., 2009), onde as concentrações periféricas de BDNF

estão reduzidas. Por outro lado, em doenças inflamatórias, tais como, a esclerose múltipla, há síntese aumentada de BDNF (LOMMATZSCH *et al*., 2005). Além disso, há evidências de que o BDNF pode atuar em células não neuronais específicas da periferia, como eosinófilos ativados que pertencem à classe dos leucócitos e atuam no combate a parasitas e certas infecções (BRAUN *et al.,* 1999).

Em humanos, os níveis de BDNF estão aumentados durante o desenvolvimento e, no SNC de adultos, exerce funções importantes nos processos de memória, transmissão sináptica e plasticidade neuronal (HU; RUSSEK, 2008). Um quarto da circulação de BDNF parece resultar de uma fonte periférica, sendo encontrado em plaquetas (YAMAMOTO; GURNEY, 1990), em células musculares e em células endoteliais (NAKAHASHI *et al*., 2000).

A ação do BDNF ocorre através da ligação aos receptores tirosina quinase (TrkB -*tropomyosin-related kinase*), promovendo uma cascata sinalizadora intracelular (REICHARDT, 2006). O BDNF pode atravessar a barreira hematoencefálica em ambas às direções, podendo contribuir com a quantidade de BDNF circulante (KAREGE et al., 2005; LOMMATZSCH *et al*., 2005). Esta migração de BDNF através da barreira hematoencefalica pode ser importante durante a fase de recuperação do AVC, considerando que o BDNF pode exercer uma ação protetora e regenerativa no local da lesão (LAZZARO *et al.,* 2007).

Assim, acredita-se que, por meio de análise dos níveis periféricos de BDNF, podemos encontrar informações importantes sobre alterações desta molécula no cérebro.

1.3. BDNF, aprendizado e memória

A memória ocorre a partir de experiências e é caracterizada pela aquisição, armazenamento e evocação de informações. Além disso, é dividida em diferentes tipos, como, por exemplo, a memória operacional, declarativa e a de procedimento. A formação da memória não depende de uma estrutura nervosa isolada, mas sim, da

intensa participação de muitas estruturas (IZQUIERDO, 2004). Para isso, ocorrem diferentes alterações morfológicas, como a formação de novas conexões e o aumento na associação entre neurônios, ou seja, esse processo requer plasticidade neuronal (LYNCH, 2004).

Castro (2005), por sua vez, apresenta o conceito de memória como a capacidade de armazenar, processar e recuperar informações que vêm do exterior. Este mecanismo pode ser dividido em três fases: a de codificação, armazenamento e evocação. O aprendizado, segundo o autor, pode ser conceituado como uma mudança de comportamento, causado por influências práticas ou por experiências, um processo individual e interiorizado que possibilita ao ser humano adaptar-se ao meio em que está inserido (CASTRO, 2005).

A memória e o aprendizado estão diretamente ligados, uma vez que muitos dos processos de aprendizagem do ser humano são consequências da memória que retém aquilo que se vê e, posteriormente, é repetido. Há muitas maneiras de aprender e os processos podem ser influenciados por vários fatores (CASTRO, 2005). Experimentos realizados com gatos mostrou que a tarefa aprendida de caminhar sobre uma escada horizontal tendo que controlar a passada para pisar apenas onde se tem um degrau, aumenta a atividade de neurônios do córtex motor dos animais (ARMSTRONG; MARPLE-HORVAT, 1996). Assim, podemos associar os eventos de aprendizagem e memória às tarefas realizadas nos exercícios de reabilitação motora.

O BDNF tem sua produção plasmática estimulada após exercícios, o que parece estar relacionado a processos de reparo, memória e aprendizado (PAULSEN; SEJNOWSHI, 2000). E está relacionado à neuroplasticidade, atuando na reorganização morfofuncional e na estabilização do desenvolvimento das redes neurais no córtex sensório motor. A complexidade dos processos envolvidos na aprendizagem e memória exige da comunidade científica muitos estudos em várias áreas do conhecimento.

1.4. Neuroplasticidade

O conceito de neuroplasticidade não é algo recente. Por volta dos anos 1800, estudos apontavam que partes sobreviventes do cérebro alteravam a atividade funcional. No ano de 1906, foi aplicado por Ernesto Lugano o termo usado nos dias atuais. Somente há duas décadas houve aumento do número de estudos que elucidam a plasticidade, demonstrados principalmente em modelos animais, o que possibilitou a melhor compreensão dos mecanismos básicos desse processo (BERLUCCHI, 2002; HOLLOWA *et al*., 1999).

A neuroplasticidade é a capacidade de adaptação do sistema nervoso e dos neurônios em relação às mudanças no ambiente no qual o individuo está inserido. A neuroplasticidade pode também ser definida como a reorganização neuronal, com objetivo preliminar de recuperar a função neuronal (LYNCH, 2004). Qualquer aprendizado de uma determinada atividade, que não seja apenas uma única repetição, depende da neuroplasticidade (SOUZA *et al*., 2013), caracterizando alterações que envolvem o microambiente celular e molecular.

Para que um evento seja caracterizado como um processo de neuroplasticidade, deve ocorrer algum tipo de modificação no sistema nervoso, não pode acontecer periodicamente e deve ter duração maior que poucos segundos (SOUZA *et al*., 2013). Ou seja, ocorre reorganização e mudança das sinapses que estão diretamente ligados ao aumento do tempo de resposta sináptica (potenciação de longa duração, LTP- *Long-term potentiation*) ou a diminuição de tempo das respostas sinápticas (depressão de longa duração, *LTD- long-term depression*), que dependem da ação de neurotransmissores excitatórios e inibitórios, glutamato e GABA (ácido gama-aminobutírico), respectivamente. Tais neurotransmissores atuam nos neurônios pré e pós-sinápticos. É por meio de ativação elétrica que o BDNF age e intensifica a formação da LTP (PAULSEN; SEJNOWSKI, 2000).

Segundo Arida (2011), o BDNF pode promover a plasticidade neuronal retardar a morte das células, induzir a regeneração e estimular a sobrevivência neuronal. O mesmo autor aponta que o BDNF periférico e circulante é transportado para o SNC,

assim, contribuindo para a neuroplasticidade.

Uma forma de se analisar mecanismos de neuroplasticidade é a verificação dos fatores neurotróficos e suas alterações. Tais moléculas participam dos eventos biológicos que levam a reparo e cicatrização após lesões do SNC. Este mecanismo de reparo é atribuído à notável capacidade do cérebro adulto se adaptar através de mudanças estruturais e funcionais da sua rede neuronal, ou seja, através na neuroplasticidade (REICHARDT, 2006).

Estudar os processos de neuroplasticidade pode servir como base para maior compreensão dos processos envolvidos na recuperação de um paciente pós AVC, e direcionar o tratamento para uma conduta que possa vir a restabelecer as funções perdidas. O AVC pode resultar em perdas de funções corticais, e é neste momento que a plasticidade pode ajustar funcionalmente as áreas corticais. Após um dano no córtex motor causado pelo AVC são observadas mudanças na ativação de áreas homólogas, no hemisfério não afetado. E é devido a estes processos de reorganização cortical que o paciente pode vir a obter a função, podendo recuperar gradualmente parte das habilidades perdidas após AVC (VELASQUES; RIBEIRO, 2013).

A neurogênese está diretamente associada com a neuroplasticidade. Nesse contexto, após AVC os processos de neurogênese correspondem à proliferação de células nervosas e células-tronco, diferenciação e migração de neuroblastos para região onde houve a isquemia (HOLLOWAY *et al*., 1999). Assim, fatores relacionados ao aumento de BDNF estão diretamente relacionados à melhora desse sistema como um todo.

1.5. Polimorfismos do BDNF Val66Met

Muitas doenças de característica genética são associadas com mutações em genes codificadores das neurotrofinas ou de seus receptores. O polimorfismo Val66Met no gene do BDNF tem sido associado com déficit nas funções do hipocampo, memória episódica, ativação cortical alterada, plasticidade de curto prazo, aquisição de

habilidades alteradas, e aprendizagem em seres humanos saudáveis (CHEERAN *et al*., 2008), porém, o impacto deste polimorfismo na aprendizagem motora pós-AVC não tem sido muito explorada (BRADY *et al*.,2015).

Em busca de preditores que possam levar ao estabelecimento de prognóstico de recuperação após AVC, o polimorfismo Val66Met está sendo alvo de interesse em pesquisas, por ter impacto negativo na produção da neurotrofina BDNF, o que poderia prejudicar a recuperação funcional dos pacientes. Assim, a possível desvantagem dada pelo polimorfismo tem sido atribuída a uma plasticidade cerebral prejudicada, mas a existência e os mecanismos que levam a essa correlação ainda são desconhecidos (PINO *et al*., 2016).

Segundo Egan e colaboradores (2003), o gene que codifica o BDNF está localizado no braço curto de cromossomo 11, nas regiões P13 e P14 e o polimorfismo do gene do BDNF mais estudado é a substituição de guanina por adenosina, no nucleotídeo 196, do pró-BDNF, resultando em troca do aminoácido valina por metionina no códon 66 da proteína de pró-BDNF. Não é observada modificação da estrutura final da proteína decodificada, nem tão pouco em sua concentração intraneuronal. O autor sugere que o polimorfismo poderia estar associado à alteração no tráfego intracelular e diminuição de secreção do BDNF.

Estudos indicam que o tráfego regular e a secreção de BDNF são extremamente importantes para a função cerebral normal. A presença de um único nucleotídeo no polimorfismo do gene BDNF (SNP Polimorfismo de nucleotídeo único, do inglês – *single nucleotide polymorphism*) resulta em mutação no domínio Val66Met. A mutação Val66Met inibe a seleção de BDNF em uma via de secreção regulada, afetando assim o seu transporte e localização dentro dos neurônios (EGAN *et al*., 2003). Dado que a plasticidade neural e aprendizagem motora são inerentes ao processo de recuperação funcional pós-AVC, os efeitos comportamentais da secreção alterada de BNDF, por meio da presença do polimorfismo, podem ser mais aparentes nesta população (BRADY *et al*.,2015).

Estudos recentes mostram que o polimorfismo pode indicar diferentes impactos sobre a recuperação do AVC, contrariando a ideia de que na presença do polimorfismo o indivíduo terá pior capacidade absoluta de recuperação. A recuperação motora de

pacientes portadores do alelo Met (GA ou AA) estariam mais dependentes da plasticidade subcortical, já os pacientes ValVal (GG) à plasticidade intracortical (PINO *et al*., 2016).

Há diferentes apontamentos relacionando a recuperação pós AVC e o Val66Met. Segundo Kim e colaboradores (2012), este polimorfismo está associado com a piora da incapacidade física e função cognitiva. Cramer e Procaccio (2012) indicam melhora diminuída do quadro clínico em pacientes com AVC isquêmico portadores do alelo MET (GA ou AA), porém, este achado só pode ser observado em até um mês após o episódio de AVC. Passado este tempo, esta evidência não pode ser sustentada.

Então, a fim de compreender a frequência deste polimorfismo e sua relação com o AVC, tomou-se como referência os dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, 2015) e observou-se que a frequência deste polimorfismo é maior na população asiática e menos frequente em populações africanas.

Estudos que avaliam o efeito da presença do polimorfismo com a recuperação de pacientes com AVC subcortical demonstram recuperação pior quando existe a presença do polimorfismo (KIM *et al*., 2013). Em particular, os indivíduos neurologicamente intactos e com o polimorfismo, parecem ter uma diminuição da taxa de adaptação a uma perturbação visuo-motora e uma diminuição da taxa de readaptação 24 horas mais tarde, em comparação com aqueles sem o polimorfismo (JOUNDI *et al.,* 2012).

O polimorfismo do gene do BDNF parece estar intimamente relacionado aos mecanismos de neuroplasticidade (CHEERAN *et al*.,2008). Neste sentido, buscamos analisar possíveis efeitos da associação entre o BDNF plasmático e o polimorfismo Val66Met sobre a recuperação funcional de pacientes após o AVC.

Além disso, tivemos o intuito de avaliar e associar o BDNF plasmático e o polimorfismo Val66Met com padrões de reabilitação de pacientes após o AVC. Pretendeu-se, contudo, contribuir para maiores esclarecimentos dos efeitos das intervenções visando reabilitação funcional sobre o SNC e os eventos de neuroplasticidade relacionados.

2. Objetivos

I. Analisar a concentração plasmática de BDNF antes a após tratamento de reabilitação de indivíduos com AVC;
II. Correlacionar a presença do polimorfismo Val66Met com a concentração plasmática de BDNF pré e pós-tratamento de reabilitação;
III. Investigar a associação entre o gênero e a produção de BDNF nos indivíduos com AVC;
IV. Identificar a presença do polimorfismo Val66Met do gene do BDNF em pessoas que sofreram AVC;
V. Analisar a frequência do polimorfismo Val66Met na população brasileira;
VI. Comparar a frequência do polimorfismo em indivíduos saudáveis e com AVC;
VII. Estudar descritivamente os perfis de cor/raça dos indivíduos do estudo populacional e correlacionar com o genótipo;

3. Materiais e métodos

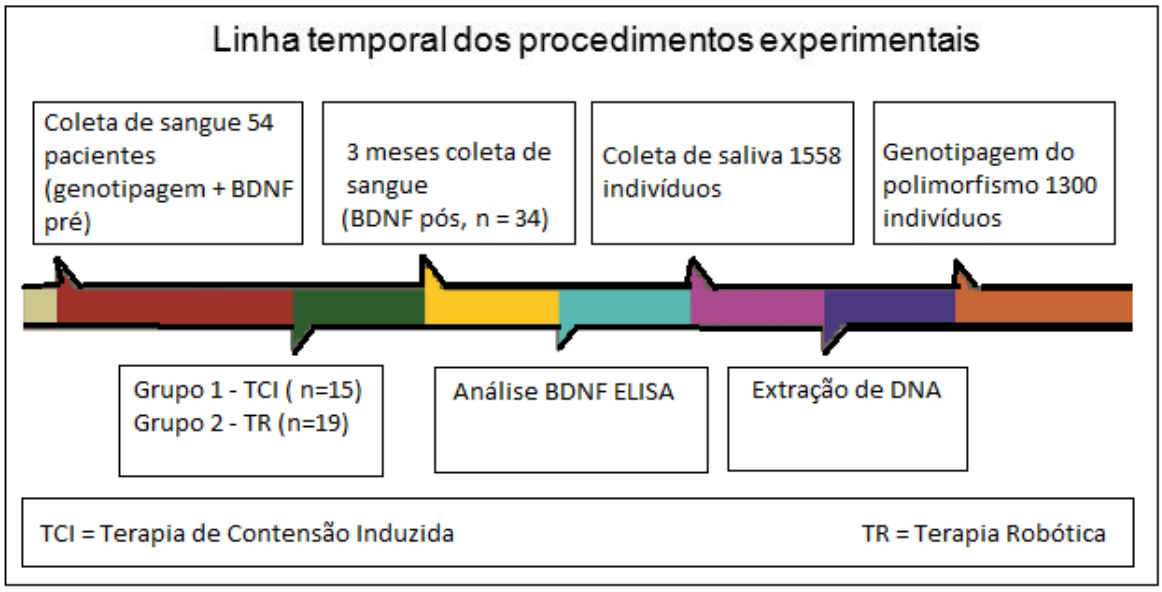
As análises realizadas fazem parte do projeto “Novas Abordagens em Reabilitação de Lesões Encefálicas: Aplicações, desenvolvimento e avaliação (NARLE)” do Núcleo de Estudos Avançados em Reabilitação (NAP/NEAR) da USP. O estudo foi dividido em duas abordagens: uma pretendeu a caracterização genotípica de pessoas com diagnóstico de AVC e sua relação com diferentes protocolos de reabilitação e com o BDNF plasmático; na outra realizou-se um estudo genético populacional para caracterização da frequência do polimorfismo Val66Met na população brasileira. O número de sujeitos utilizados em cada abordagem experimental está apresentado na tabela 2. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da Escola de Artes, Ciências e Humanidades (EACH) da Universidade de São Paulo (USP) sob o processo nº 025/2011/EACH. Todos os participantes do estudo

assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Tabela 2- Número de sujeitos em cada etapa dos procedimentos realizados

Procedimentos	Nº de Sujeitos
Genotipagem dos indivíduos com AVC	54
Correlação do BDNF plasmático e genótipo dos indivíduos com AVC	34
Coleta de dados e de saliva dos indivíduos do estudo populacional	1558
Genotipagem das amostras viáveis do estudo populacional	1300
Análise da cor/raça dos indivíduos do estudo populacional	1550
Correlação entre genótipo e cor/raça dos sujeitos do estudo populacional	1284

Os experimentos de biologia molecular foram realizados em diferentes laboratórios da Universidade de São Paulo: no laboratório de Biomedicina da Escola de Artes, Ciências e Humanidades, no laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e no laboratório de Genética do Instituto do Coração do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina. Parte dos experimentos foi realizada no laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo.



Esquema ilustrado com a linha do tempo para apresentar as etapas dos procedimentos realizados.

3.1. Estudo com os indivíduos com AVC

Cinquenta e quatro indivíduos, com diagnóstico de AVC de aproximadamente seis meses, foram randomicamente selecionados do ambulatório do Instituto de Medicina Física e Reabilitação do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IMRea/HC/FMUSP). Dos cinquenta e quatro indivíduos incluídos no projeto de pesquisa, trinta e quatro realizaram o protocolo completo das análises do BDNF plasmático em dois tempos experimentais. No entanto, utilizamos as amostras do total de pacientes para a genotipagem, uma vez que essa caracterização não depende da intervenção e/ou tempo experimental.

3.1.1. Critérios de inclusão dos indivíduos com AVC

a. Histórico de AVC clinicamente diagnosticado pelo serviço médico do IMRea - HC/FMUSP, sem distinção da etiologia (hemorrágica ou isquêmica);

b. Ambos os sexos;

c. Hemiparesia direita ou esquerda.

3.1.2. Critérios de exclusão

a. Presença de atrofias e deformidades em membros superiores que limitem a amplitude de movimento do ombro, cotovelo e/ou punho;

b. Possuírem déficits cognitivos e alterações psiquiátricas que impossibilite a aplicação da terapia proposta pelo presente estudo, sendo que déficits deverão ser devidamente diagnosticados por um profissional qualificado (médico ou psicólogo);

c. Possuírem qualquer tipo de deficiência visual que comprometa o desempenho da terapia;

d. Força muscular que não consiga vencer a gravidade: grau 0 (ausência contração muscular), grau 1 (presença de contração muscular) e grau 2 (não vence a força gravitacional ao tentar realizar o movimento) em todos os grupos musculares supracitados no critério de inclusão;

e. Doenças prévias que possam interferir nas avaliações, como por exemplo, doença reumática severa, amputações, alterações ortopédicas ou AVC recente;

f. Comprometimento do sistema vestibular.

3.1.3. Estratégias de reabilitação para sujeitos com AVC

Para comparação dos efeitos de terapia sobre o BDNF plasmático, os pacientes foram divididos aleatoriamente em dois grupos: tratamento pela terapia de contensão induzida - TCI (n= 15) e terapia robótica - TR (n=19).

Os indivíduos do grupo TCI foram submetidos a duas sessões semanais de reabilitação de 60 minutos usando diferentes estratégias durante dez semanas consecutivas. Nas duas semanas subsequentes, o grupo foi submetido à TCI, com o uso de uma contenção protetora do membro não acometido durante 90% do dia, durante 14 dias consecutivos, incluindo os finais de semana, em um total de 10 dias.

Já os indivíduos do grupo TR foram submetidos ao programa de reabilitação utilizando dois dispositivos robóticos da *Interactive Motion Technologies ®, o InMotion2* e o *InMotion3*. Estes dispositivos consistem em sistema em que o paciente segura uma manopla fixada no segmento final do sistema, o que permite ao participante mover seu membro nas articulações do ombro e cotovelo (*InMotion2*) e o outro permite a movimentação do punho (*InMotion3*). Ambos os protocolos dos programas de terapia foram aplicados por três meses.

3.1.4. Análise da concentração plasmática de BDNF

A análise do BDFN plasmático foi realizada por meio do teste imunoenzimático ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*,Promega, EUA). Analisou-se somente as amostras dos sujeitos que permaneceram no estudo após 3 meses de tratamento (n=34). As amostras dos pacientes que não deram continuidade ao tratamento não foram utilizadas para essa análise.

Para detecção sensível e específica de BDNF total e livre, as amostras foram diluídas em tampão de bloqueio (fornecido pelo kit). Inicialmente, uma placa de 96 poços de fundo plano foi revestida com anticorpo monoclonal anti-BDNF (mAb) para ligar o BDNF solúvel ao fundo da placa. Após essa incubação, a placa foi preenchida como o tampão de bloqueio para inibir ligações inespecíficas. Em seguida, com o padrão de BDNF fornecido pelo kit, uma curva-padrão foi preparada (com concentrações variando entre 7,8 e 500 pg/mL). Após aplicar os volumes relacionados à curva-padrão e as amostras feitas em duplicatas (amostras de plasma antes e após o tratamento) à placa, o anticorpo policlonal de BDNF (pAb) foi adicionado. Em seguida, a placa foi lavada, o anticorpo anti-IgY foi adicionado seguido do substrato cromogênico tetrametilbenzidina (TMB). A quantidade de BDNF na solução de ensaio é proporcional à intensidade da cor gerada na reação de oxidação-redução. Ao final, a reação foi interrompida com ácido clorídrico 1N e a leitura foi feita no leitor de placa Biotek Eon, com software Gen 5 2.0, a 450nm.

Para análise dos efeitos da reabilitação, fez-se a comparação dos níveis de BDNF plasmático antes e após tratamento. Para análise dos efeitos das diferentes estratégias, comparou-se os grupos TCI e TR nos períodos pré e pós tratamento. Para analisar se há efeitos dos diferentes tipos de tratamento sobre os valores de BDNF plasmático em homens e mulheres, comparou-se as medidas de BDNF antes e depois de cada terapia considerando o gênero.

3.2. Estudo populacional

O estudo populacional foi realizado com indivíduos de três estados do Brasil e teve o total de 1558 sujeitos voluntários. Esse estudo fez parte de um projeto maior – “Caracterização fenotípica de ritmos circadianos em indivíduos com diferentes genótipos para polimorfismo nos genes relógio em diferentes regiões do Brasil: ênfase na investigação do gene Per3 e o efeito latitude” – coordenado pelo Prof. Mário Pedrazzoli Neto, colaborador nesse projeto, no qual foi aplicado um questionário onde havia o tópico “etnia” adotado no presente estudo como “cor/raça,” conforme definição do IBGE (2010).

Os respondentes neste item se declararam como de cor/raça preta, parda, branca, amarela ou indígena. Outra questão abordada no questionário foi quanto à cor/raça dos pais e avós dos respondentes, e as respostas poderiam ser que seus pais e avós eram de cor/raça preta, parda, branca, amarela, indígena ou não sei. Esses dados foram utilizados para caracterizar o perfil dos respondentes e de seus ascendentes e assim, relacionar as respostas com a genotipagem dos participantes.

Foram coletadas amostras de saliva dos 1558 sujeitos residentes em Maceió (Alagoas), Porto Alegre (Rio Grande do Sul) e Campinas (São Paulo) para genotipagem do polimorfismo Val66Met, porém, conseguimos realizar a genotipagem de 1300 amostras. Um total de 1284 indivíduos tiveram suas amostras genotipadas e responderam à questão cor/raça (tabela 2).

3.3. Técnicas de Biologia Molecular

As técnicas de biologia molecular para genotipagem foram aplicadas tanto no estudo com pacientes com AVC, quanto no estudo populacional. Para análise do estudo com pacientes, utilizou-se todas as amostras coletadas (n=54) a fim de compararmos as frequências alélicas com as do estudo populacional. Desta forma,

foram identificados três padrões genotípicos: GG (homozigoto selvagem), GA (heterozigoto), AA (homozigoto polimórfico), utilizados para análise da frequência genotípica e alélica, tanto para o grupo de sujeitos com AVC, quanto para o grupo de indivíduos saudáveis. Com o objetivo de compreender se a presença de apenas um alelo no genótipo poderia influenciar na quantidade de BDNF circulante, juntamos os grupos GA e AA, ficado assim nesta parte das analises dois grupos, GG e GA+AA.

3.3.1. Extração do DNA

O DNA dos indivíduos com AVC foi extraído do sangue, pois além da extração do DNA, foi utilizado o plasma sanguíneo para quantificação do BDNF. Já o DNA dos indivíduos do estudo populacional foi extraído por meio de células da mucosa oral por ser um método de coleta fácil, não invasivo e que não requer profissional de saúde habilitado para fazer a coleta das amostras.

O procedimento de coleta do sangue dos pacientes foi realizado por profissionais de enfermagem, que coletaram o sangue por meio da veia cefálica, basílica ou mediana, do membro superior em tubos contendo EDTA, antes do início e após o término do protocolo experimental para análise do fator neurotrófico BDNF. Os tubos foram identificados por números, data de nascimento, horário e data da coleta. Logo após a coleta o material foi mantido a 4°C para segura conservação da proteína.

O sangue foi centrifugado a 3000rpm a temperatura de 4ºC por 50minutos para separação do plasma. O plasma foi coletado com uma pipeta ajustada ao volume de 500ul, assim, de cada paciente obtivemos em média 5 tubos de 1,5ml identificados com os códigos dos pacientes, contendo no máximo 500ul de plasma. Posteriormente, o sangue e o plasma foram estocados em freezer -80ºC até sua utilização.

O DNA dos pacientes foi extraído do sangue coletado, a extração seguiu o protocolo *“Salting-Out”,* que é dividido em duas etapas que são realizadas em dois dias consecutivos.

Já as amostras de 1300 indivíduos do grupo controle, formado por indivíduos saudáveis, o DNA foi obtido a partir de células da mucosa oral, utilizando-se uma escova tipo *"cytobrush*" *(Kolplast).* A coleta foi feita esfregando a escova na parte interna da bochecha por, aproximadamente, dez vezes de cada lado. As amostras foram coletadas de todos os participantes no estudo, e o DNA foi extraído utilizando o protocolo de extração de DNA "Processo *Buccal Swaps*". Este protocolo consiste em retirar a amostra de saliva coletada que está no *swaps*, e passar para tubo de 1,5ml, adicionar proteinase K e incubar por 1 hora. Depois de percorrido este tempo, adiciona-se NaCl e centrifuga-se. Ao término da centrifugação, transfere-se o sobrenadante para um novo tubo de 1,5ml. Adiciona-se álcool 95% e homogeneíza-se. É necessário descartar o sobrenadante e acrescentar álcool 70%. Centrifuga-se novamente e descarta-se o sobrenadante mais uma vez. Por fim, os tubos abertos são colocados no banho seco por 20 minutos e adiciona-se H_2O.

3.3.2. Genotipagem do polimorfismo Val66Met

Para identificação do polimorfismo Val66Met, os DNAs de todos os participantes do estudo foram genotipados utilizando-se a técnica *Polymerase chain Reaction* PCR-RFLP, (utilizando a curva de *melting* como ferramenta).

O DNA extraído das células da mucosa oral e de sangue total, foram amplificados nas regiões de interesse, utilizando-se primer BDNF- RS 6265 F (*foreword*) sequencia 5´para 3´ - GCT TGA CAT CAT TGG CTG AC - e o primer R *(reverse*) de sequência 5´para 3´ - CCG AAC TTT CTG GTC CTC AT (*Invitrogen by Life Technologies*, USA). O polimorfismo Val66Met do BDNF já havia sido sequenciado anteriormente pelo grupo.

Para realização da PCR, as amostras foram diluídas com TE para estabelecer igualdade de concentração. Em seguida, foi realizada quantificação do DNA utilizando o equipamento nano-drop. Após a quantificação, calculamos, utilizando o programa Excel, o volume de DNA e o volume de água (ultrapura livre de DNAse), necessários

para pipetagem em placa de 96 poços, que posteriormente, foram levadas ao robô *QIAgility* (*Qiagen,Courtaboeuf*, France). O robô realizou a pipetagem precisa dos reagentes preparando o mix da PCR, considerando o volume final de 20ul para amostras de DNA extraído de saliva (indivíduos saudáveis) e 50ul para amostras de DNA extraído de sangue.

A técnica que envolve a curva de *melting* é realizada por meio do protocolo *High Resolution Melt* (HRM) que pode ser utilizada para analisar virtualmente todos os tipos de variantes na sequência de DNA, incluindo uma única mudança de bases, inserções e deleções.

O HRM é realizado inicialmente como uma PCR convencional, com adição apenas de um corante verde (fluóforo). Este corante de cor verde na dupla fita de DNA irá fluorescer intensamente nesse estado. A fluorescência é elevada na análise de fusão, pois a amostra inicia com DNA condensado em dupla fita, mas com o aumento da temperatura a fluorescência diminui e o DNA se dissocia em fita simples (CORBETT, 2006).

Ainda Segundo Corbett (2006), a análise da curva de *melting* é uma extensão prévia da dissociação ou fusão em análises, pois esta técnica é utilizada na caracterização de amostras de DNA de acordo com o comportamento que a fita dupla de DNA se separa e se torna fita simples, de acordo com o aumento da temperatura. Desta forma, quanto maior for a temperatura menor será a fluorescência, apresentando assim diferentes curvas para diferentes genótipos.

3.4. Análise Estatística

Para análise dos dados desta pesquisa adotou-se o critério estatístico de um intervalo de confiança de 95% e o nível de significância de 5%, utilizou-se as técnicas de análises descritivas, medidas de tendência central, teste de normalidade (KolmoGorov-Smirnov), diferença de médias, análise de variância, e análise de correlação.

Os dados do BDNF plasmático obtidos nas análises de ELISA foram submetidos ao teste de normalidade (KolmoGorov-Smirnov). Como os grupos testados tiveram distribuição normal, utilizou-se o teste paramétrico teste T de student para comparação entre os períodos pré e pós-tratamento, comparando TR e TCI, gênero e tipo de tratamento. Para avaliar a relação entre genotipagem e os níveis de BDNF no pré e pós-tratamento, também foi realizada utilizando o teste T de student.

A análise da frequência alélica e genotípica do polimorfismo nos dois grupos (indivíduos saudáveis ou com AVC) foi observada por meio de análise estatística descritiva e utilizamos o teste de x2 para verificar a associação da genotipagem de acordo com as regiões. A distribuição genotípica foi verificada para o equilíbrio de *Hardy-Weinberg.* Todas as análises foram realizadas utilizando-se o pacote estatístico SPSS.

4. Resultados

Considerando que o estudo foi dividido em duas etapas, apresentar-se-á primeiro as análises dos dados referentes aos indivíduos com AVC e, na sequência, serão apresentados os dados do estudo populacional, a fim de deixar mais claro os achados desta pesquisa.

Como já mencionado no item materiais e métodos utilizamos as amostras do total de pacientes para a análise da frequência genotípica e alélica (n=54), mas para a análise do BDNF plasmático, o número de indivíduos foi trinta e quatro, pois só os pacientes que permaneceram no tratamento foram considerados.

4.1. Estudo com os indivíduos com AVC

Nesta etapa serão apresentados: (i) à relação dos níveis de BDNF plasmático

antes e após tratamento de reabilitação, (ii) a comparação antes e após TR e TCI (iii) a relação entre os níveis de BDNF com genótipo e com o tipo de tratamento e (iv) a associação dos níveis de BDNF com a genotipagem.

4.1.1. Análise do BDNF plasmático

Os efeitos da reabilitação sobre os valores de BDNF plasmático foram testados na amostra de 34 sujeitos com AVC de ambos os sexos, idade média 58,14 com desvio padrão de 13,74.

Comparou-se as medidas de BDNF antes e depois dos pacientes serem submetidos ao tratamento. Conforme mostrado na figura 3, os valores obtidos pelo método ELISA mostraram que houve efeito do tratamento sobre a quantidade de BDNF circulante (p= 0,019; BDNF antes do tratamento = 1715,08 ± 243,54 pg/ml; BDNF após o tratamento = 2589,73 ± 317,85 pg/ml).

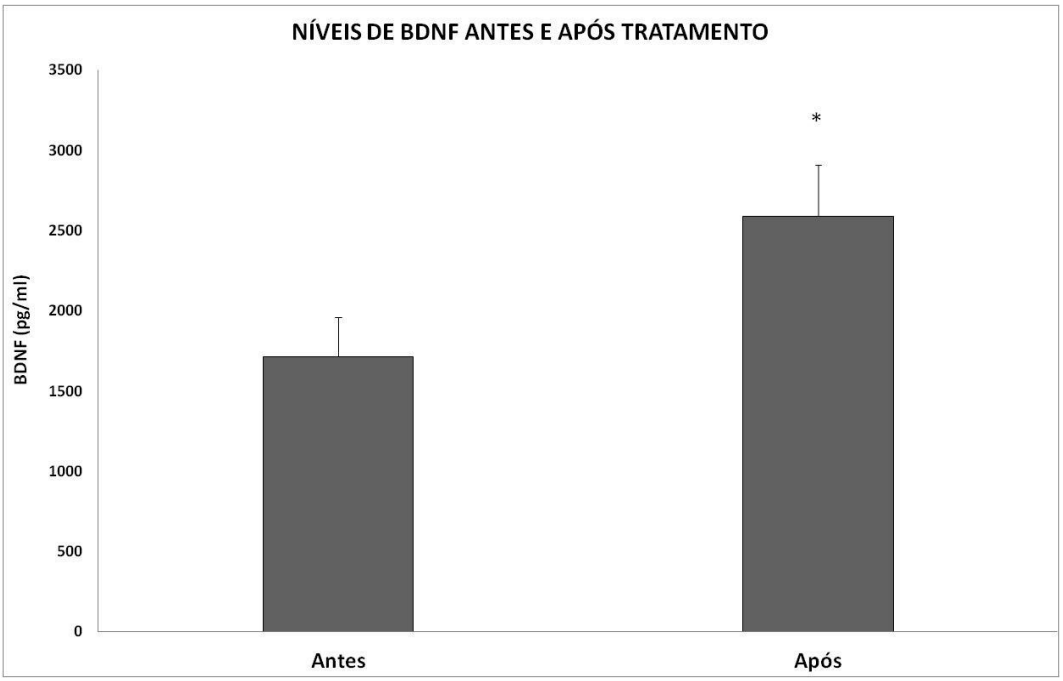


Figura 3 –. Gráfico das médias±epm das dosagens de BDNF plasmático feitas por método ELISA medidas em picogramas por mililitro. A análise foi feita de amostras coletadas antes e após 3 meses de tratamento (* = p<0,05; teste T- Student).

Para analisar os efeitos dos diferentes tipos de tratamento, terapia robótica e terapia de contensão induzida, sobre os valores de BDNF plasmático nesta amostra, comparou-se as medidas de BDNF antes e depois de cada grupo de pacientes serem submetidos às terapias. Conforme mostrado na figura 4, os valores obtidos pelo método de ELISA mostraram que houve efeito da terapia robótica sobre a quantidade de BDNF circulante (TR, p= 0,013; BDNF antes do tratamento = 1521,89 ± 307,39 pg/ml e depois do tratamento 2802,45 ± 377,00 pg/ml). Não houve efeito da terapia de contensão induzida sobre a quantidade de BDNF circulante (TCI com total de 15 indivíduos p=0,513; BDNF antes da terapia = 1959,78 ± 394,17 pg/ml e depois do tratamento 2320,00 ± 546,00 pg/ml).

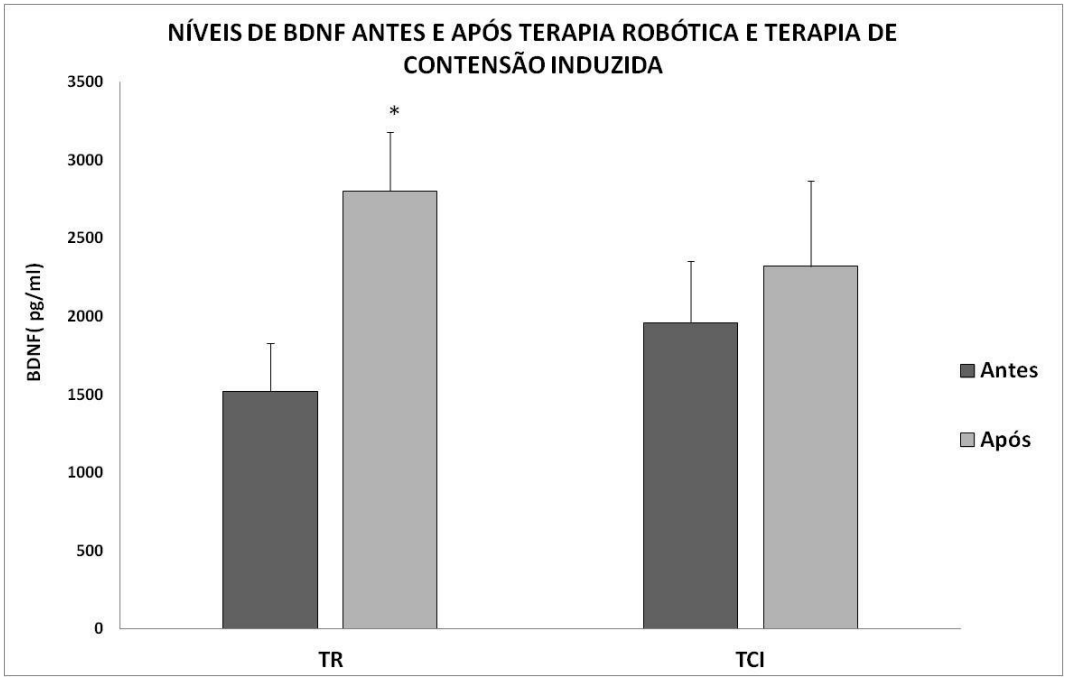


Figura 4 – Gráfico das médias±epm das dosagens de BDNF plasmático feitas por método de ELISA medidas em picogramas por mililitro. O grupo TR (n=19) realizou terapia robótica por um período de 3 meses, assim como grupo TCI (n=15) realizou terapia de contensão induzida também por 3 meses. A análise foi feita de amostras coletadas antes e após o tratamento. (* = p<0,05; teste T- Student).

Os valores da análise pelo método ELISA mostraram que houve efeito da TR sobre a quantidade de BDNF circulante em mulheres (p= 0,054; BDNF antes do tratamento = 1765,17 ± 533,12 pg/ml e depois do tratamento = 3334,96 ± 497,96 pg/ml). Não houve efeito da TR sobre o BDNF plasmático dos homens submetidos ao protocolo

(p= 0,13; BDNF antes do tratamento = 1344,96 ± 376,36 pg/ml e após o tratamento = 2415,18 ± 530,62 pg/ml). Não houve diferença estatística sobre os valores de BDNF circulante quando comparados homens e mulheres que realizaram TCI (mulheres (n=9), p= 0,97; BDNF antes do tratamento = 1649,86 ± 447,95 pg/ml e após o tratamento = 1667,71 ± 549,89 pg/ml; homens (n=6), p= 0,42; BDNF antes do tratamento = 2424,66 ± 730,75 pg/ml e após o tratamento = 3299,13 ± 1021,03 pg/ml).

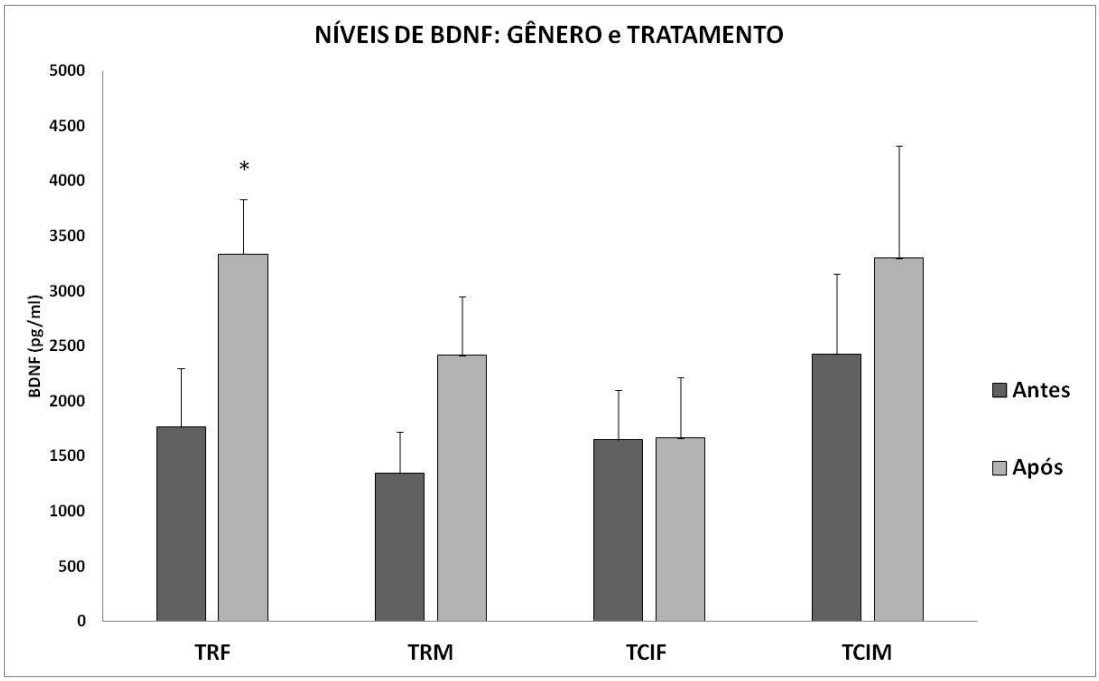


Figura 5 –. Gráfico da comparação das médias±epm das dosagens de BDNF plasmático feitas por método de ELISA medidas em picogramas por mililitro associado ao gênero e estratégia de reabilitação. TRF indica indivíduos com AVC do gênero feminino que realizou terapia robótica (n=8); TRM indica indivíduos com AVC do gênero masculino do grupo terapia robótica (n=11); TCIF mostra indivíduos com AVC do gênero feminino do grupo terapia de contensão induzida (n=9) e TCIM, indivíduos com AVC do gênero masculino do grupo terapia de contensão induzida (n=6). Os dados foram comparados antes e depois da reabilitação. (* = p<0,05,;teste T- Student).

4.1.2. Genótipo do grupo AVC

Para as análises do genótipo do grupo de indivíduos com AVC, utilizamos duas formas de agrupamentos: i) foram consideradas as frequências alélicas divididas nos grupos AA, GA e GG; ii) agrupamos os genótipos AA e GA, obtendo assim dois grupos AA+GA e GG.

A figura 6 mostra a distribuição genotípica do polimorfismo Val66Met nos sujeitos com AVC (n= 54). A frequência do genótipo GG foi 62,96%, GA 33,33% e AA 3,70%.

FREQUÊNCIA GENOTÍPICA DOS INDIVÍDUOS COM AVC		
GENÓTIPO	**PERCENTUAL**	**Nº DE INDÍVIDUOS**
GG	62,96%	34
GA	33,33%	18
AA	3,70%	2

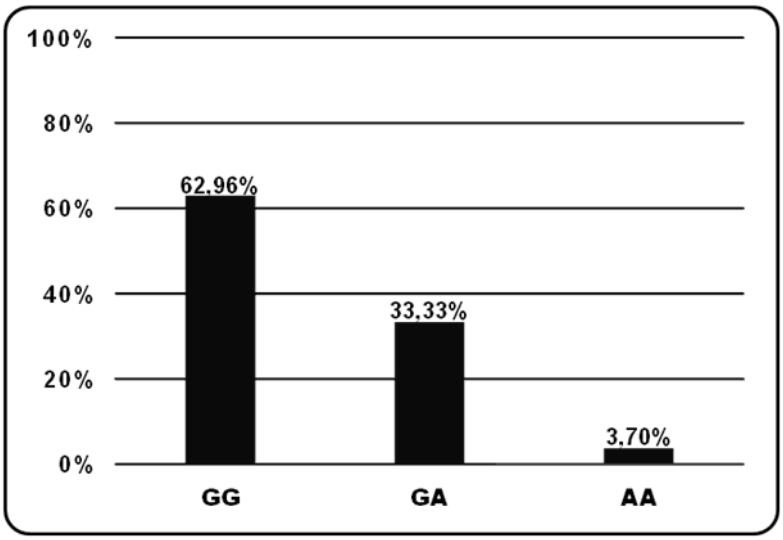


Figura 6 – Tabela e gráfico representando a distribuição genotípica nos grupos de indivíduos com AVC. Genótipos GG (homozigoto selvagem), GA (heterozigoto), AA (homozigoto polimórfico). Dados apresentados em porcentagem, em equilíbrio *Hardy-Weinberg.*

A figura 7 apresenta o gráfico e a tabela das frequências do alelo G e A no grupo de sujeitos com AVC. A frequência do alelo G foi 79% e do alelo A 21%.

FREQUÊNCIA ALÉLICA DOS INDIVÍDUOS COM AVC	
GENÓTIPO	**PERCENTUAL**
ALELO G	79,00%
ALELO A	21,00%

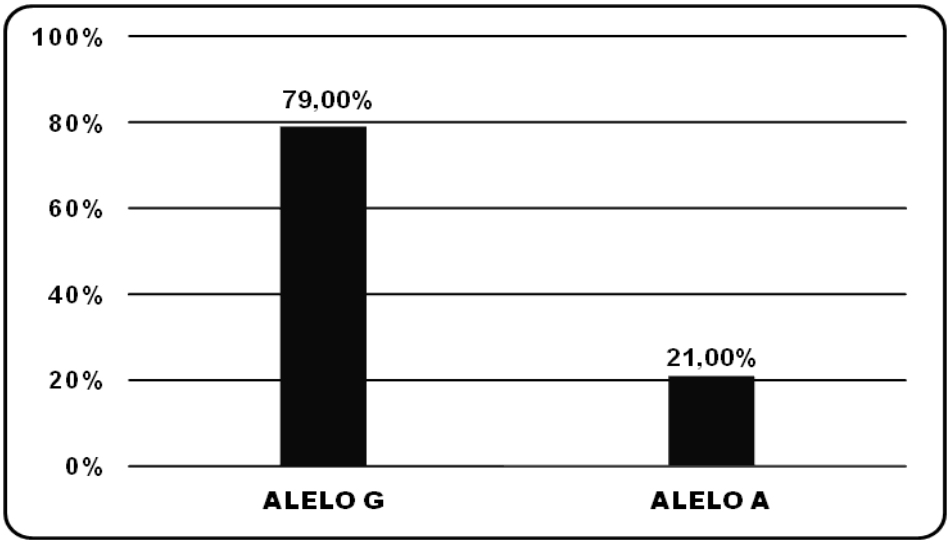


Figura 7 –. Tabela e gráfico da distribuição genotípica no grupo de indivíduos com AVC, Genótipos GG (homozigoto selvagem), GA (heterozigoto), AA (homozigoto polimórfico). Dados apresentados em porcentagem, em equilíbrio *Hardy-Weinberg.*

4.1.3. Relação entre níveis de BDNF e genótipo

Para as análises comparativas do BDNF plasmático com os genótipos, agrupou-se os grupos AA e GA, obtendo assim dois grupos AA+GA e GG.

Os dados dos níveis de BDNF pré e pós-tratamento foram comparados com a genotipagem dos indivíduos com AVC e estão apresentados na figura 8, a fim de estabelecer uma possível associação. Os valores de BDNF plasmático obtido pelo método ELISA mostraram que não houve relação entre o genótipo e a quantidade de BDNF circulante; p=0,38 antes do tratamento e p=0,43 após o tratamento (grupo AA+GA - BDNF antes do tratamento = 1431,523 ± 415,14 e após o tratamento 2349,64 ± 515,70. Grupo GG - BDNF antes do tratamento = 1850,69 ± 302,45 e após o tratamento 2704,56 ± 405,40).

FREQUÊNCIA GENOTÍPICA AGRUPADA DOS INDIVÍDUOS COM AVC		
GENÓTIPO	**PERCENTUAL**	**Nº DE INDIVÍDUOS**
GA+AA	32,40%	11
GG	67,70%	23

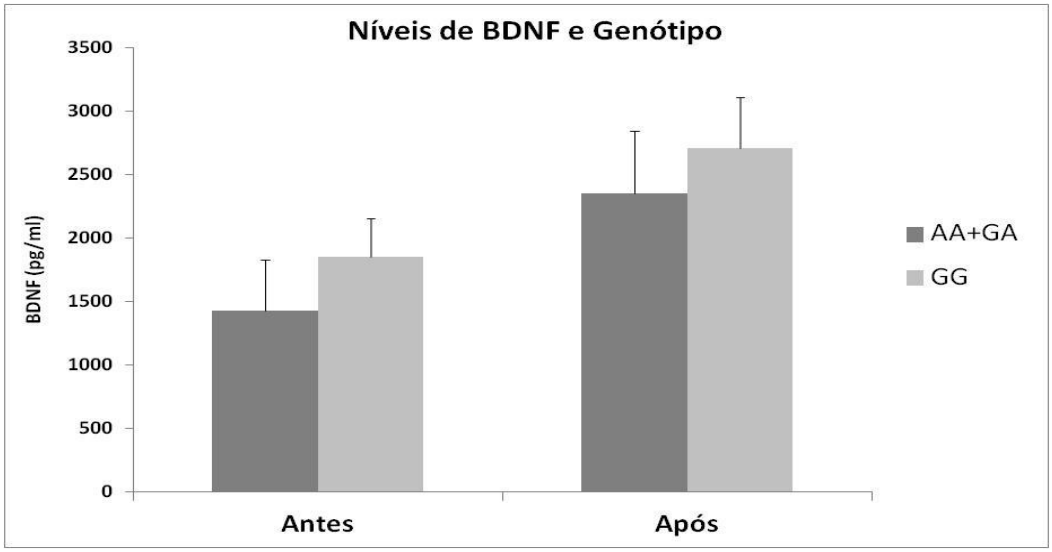


Figura 8 – Tabela da frequência genotípica nos pacientes com AVC e gráfico das médias±epm dos dados entre os níveis de BDNF pré e pós tratamento *versus* a genotipagem dos indivíduos com AVC. O grupo AA+GA representa os indivíduos que carregam em seu genótipo pelo menos um alelo A (AA - heterozigoto polimórfico - e GA - heterozigoto). O grupo GG representa indivíduos homozigóticos, ou seja, sem presença do alelo Val. A comparação não revelou diferença significativa entre genótipo e os níveis de BDNF (* = p>0,05, teste T- Student).

4.2. Estudo populacional

O estudo populacional contou com o número de 1558 sujeitos sem o diagnóstico de AVC, estudantes universitários, de ambos os sexos, sendo 752 (48,3%) do sexo masculino e 806 (51,7%) do sexo feminino com idade média 21,53 e desvio padrão de 4,71. Os sujeitos responderam a um questionário que havia, entre outras questões, o tópico etnia e, por meio das respostas dadas a estas perguntas, foi possível identificar raça/cor e as relacionar com os dados da genotipagem.

4.2.1. Caracterização genotípica

Do total de sujeitos do estudo populacional, 1300 tiveram amostras viáveis para análise do genótipo. A figura 9 mostra a distribuição genotípica do polimorfismo Val66Met no gene BDNF nos indivíduos saudáveis. A frequência do genótipo GG foi 66,08%, GA, 30,38% e AA, 3,54%. Utilizamos como ferramenta de análise de distribuição genotípica o equilíbrio *Hardy-Weinberg.*

FREQUÊNCIA GENOTÍPICA DOS INDÍVIDUOS SEM AVC		
GENÓTIPO	**PERCENTUAL**	**Nº DE INDÍVIDUOS**
GG	66,08%	859
GA	30,38%	395
AA	3,54%	46

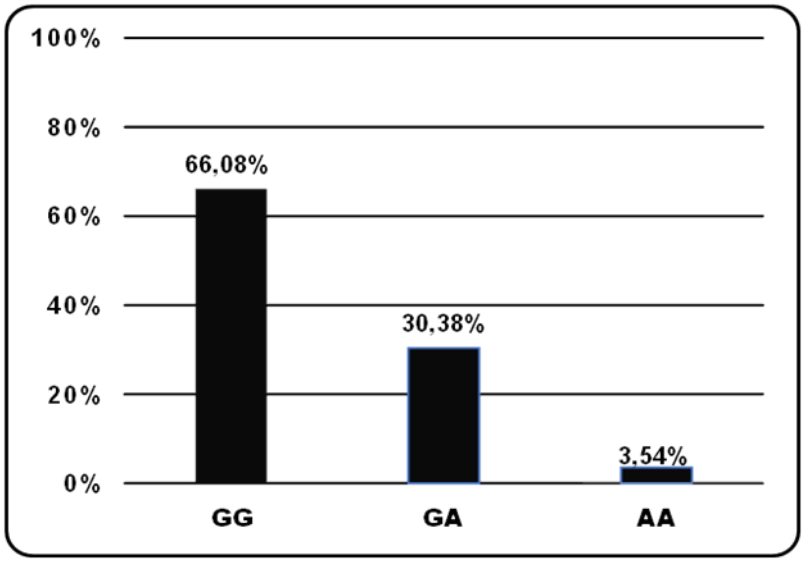


Figura 9 – Gráfico da porcentagem de distribuição genotípica nos grupos de indivíduos com AVC e saudáveis (n=1300). Genótipos GG (homozigoto selvagem), GA (heterozigoto), AA (homozigoto polimórfico). Dados apresentados em porcentagem, em equilíbrio *Hardy-Weinberg.*

A figura 10 apresenta a tabela e o gráfico das frequências do alelo G e A na população de indivíduos saudáveis. A frequência do alelo G foi de 81% e do alelo A de 19%.

FREQUÊNCIA ALÉLICA DOS INDIVÍDUOS SEM AVC	
GENÓTIPO	**PERCENTUAL**
ALELO G	81,00%
ALELO A	19,00%

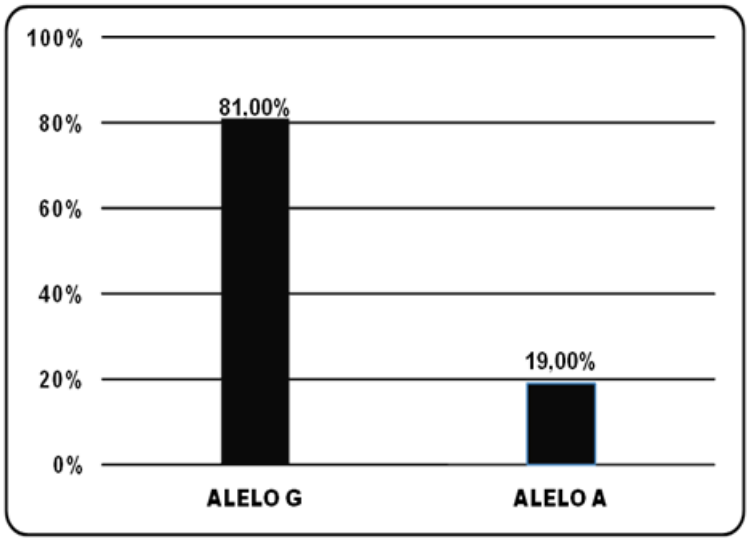


Figura 10 – Tabela e gráfico da frequência dos alelos G e A no grupo de indivíduos saudáveis (n=1300). Dados apresentados em porcentagem. Equilíbrio de *Hardy-Weinber.*

4.2.2. Estudo das relações entre cor/raça e genotipagem

Após análise por meio de estatística descritiva foi possível observar alguns padrões de distribuição de cor/raça na população saudável participante desta pesquisa. Buscou-se, assim, obter melhor compreensão de possíveis inter-relações entre os padrões de cor/raça e a presença ou não do polimorfismo Val66Met.

Dos 1558 indivíduos, 8 não responderam à variável cor/raça, como podemos observar na tabela 8. A cor/raça predominante é a branca com 985 indivíduos que corresponde a 63,2% da amostra, seguida da parda com 430 (27,7%), amarela com 65 (4,2%), preta 63 (4,1%) e indígena 7 (0,5%).

Para se verificar a distribuição genotípica em relação à cor/raça dos indivíduos desta amostra, foram utilizados os 1284 indivíduos que responderam a questão

cor/raça que tiveram amostras viáveis para realização da genotipagem. Os sujeitos de cor/raça branca somam um total de 826 sendo, destes, 530 (64,2%) apresentaram genótipo GG, 260 (31,5%) genótipo GA e 36 (4,4%) genótipo AA. Para a cor/raça parda obteve-se um total de 342 indivíduos, sendo que 246 (71,9%) apresentam genótipo GG, 90 (26,3%) genótipo GA e 6 (1,8%) genótipo AA. Do total de 55 indivíduos da cor/raça amarela, 28 (50,9 %) apresentaram genótipo GG, 23 (41,8%) genótipo GA e 4 (7,3%) AA. Para a cor/raça preta, com total de 56 indivíduos, 45 (80,4%) apresentaram genótipo GG e 11 (19,6) genótipo GA e não se observou ocorrência do genótipo AA (polimorfismo). A cor/raça Indígena teve um total de 5 indivíduos, sendo que 4 (80%) apresentam genótipo GG, 1 (20%) GA e nenhum dos sujeitos avaliados apresentou AA, (tabela 3).

4.2.2.1. Genotipagem e cor/raça da mãe

Para se verificar a relação entre a distribuição genotípica dos indivíduos com as respostas que eles deram referente à cor/raça da mãe foram utilizados os 1272 indivíduos que responderam a questão cor/raça da mãe e tiveram amostras viáveis para realização da genotipagem.

Os sujeitos que declararam a mãe como de cor/raça branca somam um total de 876 indivíduos sendo que destes 574 (65,5%) apresentaram genótipo GG, 267, (30,5%) genótipo GA e 35, (4,0%) genótipo AA. Para os que relataram ter mãe de cor/raça parda, obteve-se um total de 297 indivíduos, sendo 201 (67,7%) com genótipo GG, 89 (30,0%) com genótipo GA e 7 (2,4%) com genótipo AA. Para os que relataram ter mãe de cor/raça amarela, com total de 48 indivíduos sendo 25 (52,1%) genótipo GG, 21 (43,8%) GA e 2 (4,2%) AA. Para os que relataram ter mãe de cor/raça Preta, com o total igual a 43 indivíduos sendo 36 (83,7%) genótipo GG, 7 (16,3%) GA e, não houve mãe de cor/raça preta com filhos de genótipo AA. Para os que relataram ter mãe de cor/raça Indígena, com total igual a 8 indivíduos que representa (100%), todos os 8 apresentaram genótipo GG. Os dados estão apresentados na tabela 3.

4.2.2.2. Genotipagem e cor/raça do pai

Utilizou-se os mesmos 1238 indivíduos que responderam a questão cor/raça do pai e tiveram amostras viáveis para realização da genótipagem.

Os sujeitos que declararam o pai como de cor/raça branca somam um total de 801 indivíduos sendo que destes 513 (64,0%) apresentam genótipo GG, 257 (32,1%) genótipo GA e 31 (3,9%) genótipo AA. Pai de cor/raça parda, total igual a 325 sendo 240 (73,8%) genótipo GG, 77(23,7%) genótipo GA e 8 (2,5%) genótipo AA. Para os que relataram ter o pai de cor/raça amarela,obteve-se um total de 41indivíduos sendo que 21 (51,2%) apresentaram genótipo GG, 16 (39,0%) genótipo GA e 4 (9,8%) AA. Para os que relataram ter o pai de cor/raça cor/raça preta obteve-se o total de 63 indivíduos sendo que 47 (74,6%) apresentaram genótipo GG, 15 (23,8%) genótipo GA e 1 (1,6%) genótipo AA. Para os que relataram ter o pai de cor/raça cor/raça Indígena, obteve-se o total de 8 indivíduos sendo que 5 (62,5%) apresentaram genótipo GG e 3 (37,5) genótipo GA e nenhum dos sujeitos avaliados apresentou genótipo AA, como demonstrado na tabela 3.

4.2.2.3. Genotipagem e cor/raça da avó materna

1197 indivíduos que responderam a questão de cor/ raça da avó materna e tiveram amostras viáveis para realização da genotipagem fizeram parte desta análise.

Como apresentado na tabela 3, os sujeitos que declararam ter avó materna de cor/raça branca somam um total de 833 sendo que destes 548 (65,8%) apresentam genótipo GG, 249 (29,9%) GA e 36 (4,3%)AA. Os que relataram ter avó materna de cor/raça parda somou-se um total de 237 indivíduos, sendo que destes 153 (64,6%) apresentaram genótipo GG, 78 (32,9%) genótipo GA e 6 (2,5%) genótipo AA. Para os que relataram ter avó materna de cor/raça amarela obteve-se um total de 49 indivíduos sendo que destes 27 (55,1%) apresentaram genótipo GG, 20 (40,8%) genótipo GA e 2

(4,1%) AA. Para os que relataram ter avó materna de cor/raça preta, obteve-se um total igual a 48 sendo que destes 40 (83,3%) apresentaram genótipo GG, 8 (16,7%) genótipo GA e não houve observações de avó materna de cor/raça preta com neto de genótipo AA. Para os que relataram ter avó materna de cor/raça Indígena, obteve-se um total de 30 indivíduos sendo que destes 21 (70%) apresentaram genótipo GG e 9 (30%) genótipo GA. Não foi observado avó materna de cor/raça indígena com neto de genótipo polimórfico AA.

4.2.2.4. Genotipagem e cor/raça do avô materno

Foi possível empregar 1119 indivíduos nas análises de distribuição genotípica dos indivíduos em relação às respostas que eles deram para cor/raça do avô materno, estes indivíduos foram os que responderam a questão cor/raça do avô materno e as amostras satisfatórias para genotipagem.

Os sujeitos que declararam ter avô materno de cor/raça branca somam um total de 715 indivíduos, sendo que destes 463(64,8%) apresentam genótipo GG, 221(30,9 %) GA e 31(4,3%)AA. Para os que relataram ter avô materno de cor/raça parda obteve-se um total de 270 indivíduos sendo que destes 184 (68,1%) apresentaram genótipo GG, 78 (28,9%) genótipo GA e 8 (2,4%) genótipo AA. Para os que relataram ter avô materno de cor/raça amarela, obteve-se um total igual a 40 indivíduos sendo que destes 21 (52,5%) apresentaram genótipo GG, 17 (42,5%) genótipo GA e 2(5,0%) AA. Para os que relataram ter avô materno de cor/raça preta, obteve-se um total de 75 indivíduos sendo que destes 56(74,7%) apresentaram genótipo GG, 19 (25,3%) genótipo GA e não observou-se avô materno de cor/raça preta com neto de genótipo AA. Para os que relataram ter avô materno de cor/raça Indígena, obteve-se um total de 19 indivíduos sendo que destes 16 (84,2%) apresentaram genótipo GG e 3 (15,8%) genótipo GA. As observações de avô materno de cor/raça indígena com neto de genótipo AA foram nulas, (tabela 3).

4.2.2.5. Genotipagem e cor/raça da avó paterna

Adotou-se 1146 indivíduos, que responderam a questão cor/raça da avó paterna e suas amostras foram viáveis para realização da genotipagem.

Assim, os participantes que declararam ter avó paterna de cor/raça branca somam um total de 809 indivíduos sendo que destes 526 (65,0%) apresentam genótipo GG, 253 (31,3%) GA e 30 (3,7%)AA. Para os que relataram ter avó paterna de cor/raça parda obteve-se um total de 214 indivíduos sendo que destes 151 (70,6 %) apresentaram genótipo GG, 58 (27,1 %) genótipo GA e 5 (2,3%) genótipo AA. Para os que relataram ter avó paterna de cor/raça amarela obteve-se um total de 37 indivíduos sendo que destes 19(51,4 %) genótipo GG, 16(43,2 %) genótipo GA e 2 (5,4%) AA. Para os que relataram ter avó paterna de cor/raça preta, obteve-se um total de 57 indivíduos sendo que destes 47 (82,5%) apresentaram genótipo GG, 9 (15,8%) genótipo GA e 1 (1,8%) genótipo AA. os que relataram ter avó paterna de cor/raça Indígena, obteve-se um total de 29 indivíduos sendo que destes 21 indivíduos (72,4%) apresentaram genótipo GG e 8 (27,6%) genótipo GA e não houve observações de avó paterna de cor/raça indígena com neto que apresentasse genótipo AA (tabela 3).

4.2.2.6. Genotipagem e cor/raça do avô paterno

Os respondentes as questões de cor/raça do avô paterno e suas amostras viáveis para genotipagem somam um total de1132 indivíduos.

Portanto, como apresentado na tabela 3, os sujeitos que declararam ter avô paterno de cor/raça branca somam um total de 725 indivíduos sendo que destes 459 (63,3%) apresentaram genótipo GG, 235 (32,4%) GA e 31(4,3%) AA. Para os que declararam ter avô paterno de cor/raça parda, obteve-se um total de 282 indivíduos sendo que destes 207 (73,4%) apresentam genótipo GG, 72 (25,5%) genótipo GA e 3 (1,1%) genótipo AA. Para os que declararam ter avô paterno de cor/raça amarela,

obteve-se um total de 41indivíduos sendo que destes 21(51,2 %) apresentaram genótipo GG, 16 (39,0%) genótipo GA e 4 (9,8%) AA. Para os que declararam ter avô paterno de cor/raça preta, obteve-se um total de 69 indivíduos sendo que destes 51 (73,9%) apresentam genótipo GG, 16 (23,2%) genótipo GA e 2(2,9%) genótipo AA. Os que declararam ter avô paterno de cor/raça Indígena,obteve-se um total de 15 indivíduos sendo que destes 9 (60%) apresentaram genótipo GG e 6 (40%) genótipo GA e não houve observações de avô paterno de cor/raça indígena com neto que apresentasse genótipo AA.

Tabela 3 – Genotipagem e cor/raça

Cor/raça	GG%	GA%	AA%	N
Respondente de cor/raça branca	64,2	31,5	4,4	826
Respondente de cor/raça parda	71,9	26,3	1,8	342
Respondente de cor/raça amarela	50,9	41,8	7,3	55
Respondente de cor/raça preta	80,4	19,6	0,0	56
Respondente de cor/raça indígena	80,0	20,0	0,0	5
Mãe de cor/raça branca	65,5	30,5	4,0	876
Mãe de cor/raça parda	67,7	30,0	2,4	297
Mãe de cor/raça amarela	52,1	43,8	4,2	48
Mãe de cor/raça preta	83,7	16,3	0,0	43
Mãe de cor/raça indígena	100,0	0,0	0,0	8
Pai de cor/raça branca	64,0	32,1	3,9	801
Pai de cor/raça parda	73,8	23,7	2,5	325
Pai de cor/raça amarela	51,2	39,0	9,8	41
Pai de cor/raça preta	74,6	23,8	1,6	63
Pai de cor/raça indígena	62,5	37,5	0,0	8
Avó materna de cor/raça branca	65,8	29,9	4,3	833
Avó materna de cor/raça parda	64,6	32,9	2,5	237
Avó materna de cor/raça amarela	55,1	40,8	4,1	49
Avó materna de cor/raça preta	83,3	16,7	0,0	48
Avó materna de cor/raça indígena	70,0	30,0	0,0	30
Avô materno de cor/raça branca	64,8	30,9	4,3	715
Avô materno de cor/raça parda	68,1	28,9	2,4	270
Avô materno de cor/raça amarela	52,5	42,5	5,0	40
Avô materno de cor/raça preta	74,7	25,3	0,0	75
Avô materno de cor/raça indígena	84,2	15,8	0,0	19

Etnia	GG%	GA%	AA%	N
Avó paterna de cor/raça branca	65,0	31,3	3,7	809
Avó paterna de cor/raça parda	70,6	27,1	2,3	214
Avó paterna de cor/raça amarela	51,4	43,2	5,4	37
Avó paterna de cor/raça preta	82,5	15,7	1,8	57
Avó paterna de cor/raça indígena	72,4	27,6	0,0	29
Avô paterno de cor/raça branca	63,3	32,4	4,3	725
Avô paterno de cor/raça parda	73,4	25,5	1,1	282
Avô paterno de cor/raça amarela	51,2	39,0	9,8	41
Avô paterno de cor/raça preta	73,9	23,2	2,9	69
Avô paterno de cor/raça indígena	60,0	40,0	0,0	15

Com as respostas obtidas dos participantes, foi possível também descrever o perfil de cor/raça dos sujeitos da pesquisa com relação à cor/raça de seus familiares.

4.2.2.7. Cor/raça do participante e cor/raça da mãe

Com os dados dos participantes, buscou-se verificar a distribuição racial dos indivíduos em relação às respostas que eles deram para cor/raça da mãe. Assim, foram utilizados os auto-relatos de 1535 indivíduos que deram respostas quanto à sua cor/raça e a da sua mãe, como demonstrado na tabela 4.

Os sujeitos que se declararam de cor/raça preta e responderam a questão de cor/ raça da mãe somam um total de 62 sendo e destes 35 (56,5%) indivíduos declararam ter mãe de cor/raça preta, 18 (29,0%) mãe de cor/raça parda, 8 (12,9%) mãe de cor/raça branca, 1 (1,6%) mãe de cor/raça indígena e 0% mãe de cor/raça amarela.

Os indivíduos que se declararam de cor/raça parda e responderam a questão de cor/ raça da mãe somam um total de 425, sendo que destes 11 (2,6%) declararam ter mãe de cor/raça preta, 261 (61,4%) mãe de cor/raça parda, 148 (34,8%) mãe de cor/raça branca, 3 (0,7%) mãe de cor/raça amarela, 1 (0,2%) mãe de cor/raça indígena. E um indivíduo desconhece a cor/raça da mãe.

Os respondentes de cor/raça branca e responderam a questão de cor/ raça da mãe somam um total de 977, sendo que destes 3 (0,3%) declararam ter mãe de cor/raça preta, 83 (8,5%) mãe de cor/raça parda, 877 (89,8%) mãe de cor/raça branca, 7 (0,7%) mãe de cor/raça amarela, 5(0,5%) mãe de cor/raça indígena. E dois indivíduos desconhece a cor/raça da mãe.

Sessenta e quatro indivíduos se declararam de cor/raça amarela e responderam a questão de cor/ raça da mãe, sendo que destes 0% declaram ter mãe de cor/raça preta, 7 (10,9%) mãe de cor/raça parda, 14 (21,9%) mãe de cor/raça branca, 43 (67,2%) mãe de cor/raça amarela, 0% mãe de cor/raça indígena.

Dos sete indivíduos que se declararam ser de cor/raça Indígena e responderam a questão de cor/ raça da mãe, nenhum declarou ter mãe de cor/raça preta, 2 (28,6%) mãe de cor/raça parda, 2 (28,6%) mãe de cor/raça branca, 1 (14,3%) mãe de cor/raça amarela, 2 (28,6%) mãe de cor/raça indígena.

Tabela 4 – Cor/raça do sujeito e cor/raça da mãe

	Cor/raça da mãe						
Etnia do sujeito	**Preta**	**Parda**	**Branca**	**Amarela**	**Indígena**	**Desconhecida**	**N**
Preta	56,5%	29%	12,9%	0,0%	1,6%	0,0%	62
Parda	2,6%	61,4%	34,8%	0,7%	0,2%	0,2%	425
Branca	0,3%	8,5%	89,8%	0,7%	0,5%	0,2%	977
Amarela	0,0%	10,9%	21,9%	67,2%	0,0%	0,0%	64
Indígena	0,0%	28,6%	28,6%	14,3%	28,6%	0,0%	7
Total							1535

4.2.2.8. Cor/raça do participante e cor/raça do pai

A identificação da distribuição racial dos indivíduos em relação às respostas que eles deram para cor/raça do pai foi feita utilizando-se dados de 1497 indivíduos que responderam quanto à própria cor/raça e a questão de cor/raça do pai, como demonstrado na tabela 5.

Os sujeitos que se declararam de cor/raça preta e responderam a questão de cor/ raça do pai somam um total de 56 sendo que destes indivíduos 38 (67,9%) declararam ter pai de cor/raça preta, 11 (19,6%) pai de cor/raça parda, 5 (8,9%) pai de cor/raça branca, 1 (1,8%) pai de cor/raça amarela, 0% pai de cor/raça indígena. E um indivíduo desconhece a cor/raça do pai.

411 indivíduos se declararam de cor/raça parda e responderam a questão do pai, sendo que destes indivíduos 33 (8,0%) declararam ter pai de cor/raça preta, 269 (65,5%) pai de cor/raça parda, 102 (24,8%) pai de cor/raça branca, 2 (0,5%), pai de cor/raça amarela, 3 (0,7%) pai de cor/raça indígena. E dois indivíduos desconhecem a cor/raça do pai.

Se declararam de cor/raça branca 961 indivíduos estes também responderam a questão de cor/ raça do pai, destes indivíduos 4 (0,4%) declararam ter pai de cor/raça preta, 110 (11,4%) pai de cor/raça parda, 836 (87,0%) pai de cor/raça branca, 4 (0,4%) pai de cor/raça amarela, 5(0,5%) pai de cor/raça indígena. E 2 indivíduos desconhecem a cor/raça do pai.

De cor/raça amarela e que responderam a questão de cor/ raça do pai somam um total de 62 sujeitos destes 1 (1,6%) declarou ter pai de cor/raça preta, 10 (16,1%) pai de cor/raça parda, 10 (16,1%) pai de cor/raça branca, 41 (66,1%) pai de cor/raça amarela e, não houve declaração de pai de cor/raça indígena.

Soma-se 7 o número de indivíduos que se declararam de cor/raça Indígena e responderam a mesma questão referente ao pai, destes indivíduos nenhum se declarou ter pai de cor/raça preta, 2 (28,6%) pai de cor/raça parda, 1 (14,3%) pai de cor/raça branca, 1 (14,3%) pai de cor/raça amarela, 3 (42,9%) pai de cor/raça indígena.

Tabela 5 – Cor/raça do sujeito e cor/raça do pai

	Etnia do pai						
Etnia do sujeito	**Preta**	**Parda**	**Branca**	**Amarela**	**Indígena**	**Desconhecida**	**N**
Preta	67,9%	19,6%	8,9%	1,8%	0,0%	1,8%	56
Parda	8,0%	65,5%	24,8%	0,5%	0,7%	0,5%	411
Branca	0,4%	11,4%	87,0%	0,4%	0,5%	0,2%	961
Amarela	1,6%	16,1%	16,1%	66,1%	0,0%	0,0%	62
Indígena	0,0%	28,6%	14,3%	14,3%	42,9%	0,0%	7
Total							1497

4.2.2.9. Cor/raça do participante e cor/raça da avó materna

Identificou-se 1463 indivíduos que responderam quanto à própria cor/raça e também responderam a questão de cor/raça da avó materna, assim, foi possível compreender a distribuição racial deste grupo como demonstrado na tabela 6.

Os sujeitos que se declararam de cor/raça preta e responderam a questão de cor/ raça da avó materna somam um total de 58, sendo que destes indivíduos 25 (43,1%) declararam ter pai de cor/raça preta, 12 (20,7%) avó materna de cor/raça parda, 16 (27,6%) avó materna de cor/raça branca, 1 (1,7%) avó materna de cor/raça amarela e 2 (3,4%) avó materna de cor/raça indígena. E dois indivíduos desconhecem a cor/raça da avó materna.

Os participantes pardos e que responderam a questão de cor/ raça da avó materna somam um total de 401 sendo que destes 23 (5,7%) declararam ter avó materna de cor/raça preta, 182 (45,4%) avó materna de cor/raça parda, 175 (43,6%) avó materna de cor/raça branca, 3 (0,7%) avó materna de cor/raça amarela, 12 (3,0%) avó materna de cor/raça indígena. E seis indivíduos desconhecem a cor/raça da avó materna.

Brancos que responderam a questão de cor/ raça da avó materna somam um total de 993 sendo que destes 9 (1,0%) declararam ter avó de cor/raça preta, 88 (9,4%) avó materna de cor/raça parda, 798 (85,5%) avó materna de cor/raça branca, 10 (1,1%) avó materna de cor/raça amarela, 18 (1,9%) avó materna de cor/raça indígena. E dois indivíduos desconhece a cor/raça da avó materna.

Os que se declararam de cor/raça amarela e responderam a questão de cor/ raça da avó materna somam um total de 64 sendo que destes 1 (1,6%) declararam ter avó de cor/raça preta, 11 (17,2%) avó materna de cor/raça parda, 11 (17,2%) avó materna de cor/raça branca, 39 (60,9%) avó materna de cor/raça amarela, 1 (1,6%) avó materna de cor/raça indígena. Um indivíduo desconhece a cor/raça da avó materna.

Dos sete indivíduos que se declararam de cor/raça indígena e responderam a questão de cor/ raça da avó materna nenhum declarou ter avó materna de cor/raça

preta, 2 (28,6%) avó de cor/raça parda, 2 (28,6%) avó materna de cor/raça branca, 1 (14,3%) avó materna de cor/raça amarela e 1 (14,3%) avó materna de cor/raça indígena. E um indivíduo desconhece a cor/raça da avó materna.

Tabela 6 – Cor/raça do sujeito e cor/raça da avó materna

	Etnia da avó materna						
Etnia do sujeito	**Preta**	**Parda**	**Branca**	**Amarela**	**Indígena**	**Desconhecida**	**N**
Preta	43,1%	20,7%	27,6%	1,7%	3,4%	3,4%	58
Parda	5,7%	45,4%	43,6%	0,7%	3,0%	1,5%	401
Branca	1,0%	9,4%	85,5%	1,1%	1,9%	1,1%	993
Amarela	1,6%	17,2%	17,2%	60,9%	1,6%	1,6%	64
Indígena	0,0%	28,6%	28,6%	14,4%	14,3%	14,3%	7
Total							1463

4.2.2.10. Cor/raça do participante e cor/raça do avô materno

A verificação da distribuição racial dos indivíduos em relação às respostas que eles deram para cor/raça do avô materno, foi realizada utilizando 1393 indivíduos, pois estes responderam quanto à própria cor/raça e também responderam a questão de cor/raça do avô materno, como demonstrado na tabela 7.

Os sujeitos que se declararam de cor/raça preta e responderam a questão de cor/ raça do avô materno somam um total de 56 sendo que destes indivíduos 24 (42,9%) relataram ter avô materno de cor/raça preta, 14 (25,0%) avô paterno de cor/raça parda, 12 (21,4%) avô materno cor/raça branca, 0% avô materno de cor/raça amarela, 2 (3,6%) avô materno de cor/raça indígena. E 4 indivíduos desconhecem a cor/raça do avô materno.

Somam um total de 392 indivíduos que se declararam de cor/raça parda e responderam a questão de cor/raça do avô paterno, destes 45 (11,5%) relataram ter avô materno de cor/raça preta, 191 (48,7%) avô materno de cor/raça parda, 129 (32,9%) avô materno de cor/raça branca, 11 (2,8%) avô materno de cor/raça amarela e

nenhum indivíduo relatou ter avô materno de cor/raça indígena. Dezesseis indivíduos desconhecem a cor/raça do avô materno.

Responderam a questão de cor/raça e se declararam brancos 876 participantes estes também responderam a mesma questão sobre o avô paterno, destes 22 (2,5%) declararam ter avô materno de cor/raça preta, 109 (12,4%) avô materno de cor/raça parda, 705 (80,5%) avô materno de cor/raça branca, 6 (0,7%) avô materna de cor/raça amarela, 11 (1,3%) avô materna de cor/raça indígena. E dezesseis indivíduos desconhecem a cor/raça do avô materno.

Os que se declararam de cor/raça amarela e responderam a questão de cor/raça do avô materno somam um total de 62, destes 1 (1,6%) declararam ter avô paterno de cor/raça preta, 11 (17,7%) avô materno de cor/raça parda, 11 (17,7%) avô materno de cor/raça branca, 38 (61,3%) avô materno de cor/raça amarela, 0% avô materno de cor/raça indígena. E um indivíduo desconhece a cor/raça do avô materno.

Participantes autodeclarados como indígena e responderam a questão de cor/raça do avô materno somam um total de 7 sendo que destes nenhum declarou ter avô materno de cor/raça preta, 4 (57,1%) respondeu ter avô materno de cor/raça parda, 1 (14,3%) avô materno de cor/raça branca, e também não houve declarações de avô materno de cor/raça amarela, 1 (14,3%) avô materno de cor/raça indígena. E um indivíduo desconhece a cor/raça do avô materno.

Tabela 7 – Cor/raça do sujeito e cor/raça do avô materno

	Etnia da avó materna						
Etnia do sujeito	**Preta**	**Parda**	**Branca**	**Amarela**	**Indígena**	**Desconhecida**	**N**
Preta	42,9%	25,0%	21,4%	0,0%	3,6%	7,1%	56
Parda	11,5%	48,7%	32,9%	0,0%	2,8%	4,1%	392
Branca	2,5%	12,4%	80,5%	0,7%	1,3%	2,6%	876
Amarela	1,6%	17,7%	17,7%	61,3%	0,0%	1,6%	62
Indígena	0,0%	57,1%	14,3%	0,0%	14,3%	14,3%	7
Total							1393

4.2.2.11. Cor/raça do participante do estudo e a cor/raça da avó paterna

Utilizou-se 1415 para se verificar a distribuição racial dos indivíduos em relação às respostas que eles deram para cor/raça da avó paterna, estes indivíduos foram os que responderam quanto à própria cor/raça e também responderam a questão de cor/raça da avó paterno, como demonstrado na tabela 8.

Declararam-se de cor/raça preta e responderam a mesma questão sobre a avó 56 participantes do estudo, sendo que destes indivíduos 26(46,4%) declararam ter avó paterna de cor/raça preta, 10 (17,9%) avó paterna de cor/raça parda, 14 (25,0%) avó paterna cor/raça branca, 0% avó paterna de cor/raça amarela, 2 (3,6%) avó paterna de cor/raça indígena. E quatro indivíduos desconhecem a cor/raça da avó paterna.

394 indivíduos são pardos e responderam a questão de cor/raça da avó paterna destes 29 (7,4%) declararam ter avó paterna de cor/raça preta, 175 (44,4%) avó paterna de cor/raça parda, 153 (38,8%) avó paterna de cor/raça branca, 3 (0,8%) avó paterna de cor/raça amarela, 22 (5,6%) avó paterna de cor/raça indígena.E doze indivíduos desconhecem a cor/raça da avó paterna. Os indivíduos que se declararam de cor/raça branca e responderam a questão de cor/raça da avó paterna soma um total de 895 sendo que destes 10(1,1%) declaram ter avó paterna de cor/raça preta, 74 (8,3%) avó paterna de cor/raça parda, 779 (87,0%) avó paterna de cor/raça branca, 5 (0,6%) avó paterna de cor/raça amarela, 14 (1,6%) avó paterna de cor/raça indígena. E treze indivíduos desconhecem a cor/raça da avó paterna.

Os indivíduos que se declararam de cor/raça amarela e responderam a questão de cor/raça da avó paterna somam um total de 63 sendo que destes indivíduos 1 (1,6%) declararam ter avó paterna de cor/raça preta, 5 (7,9%) avó paterna de cor/raça parda, 19 (30,2%) avó paterna de cor/raça branca, 36 (57,1%) avó paterna de cor/raça amarela, 0% avó paterna de cor/raça indígena. Dois indivíduos desconhecem a cor/raça da avó paterna.

Sete indivíduos de cor/raça Indígena responderam a questão de cor/raça da avó paterna, sendo que destes nenhum declarou ter avó paterna de cor/raça preta, 2 (28,6%) avó paterna de cor/raça parda, 2 (28,6%) avó paterna de cor/raça branca,

nenhum participante declarou ter avó paterna de cor/raça amarela e 3 (42,9%) avó paterna de cor/raça indígena.

Tabela 8 – Cor/raça do sujeito e cor/raça da avó paterna

	Etnia da avó materna						
Etnia do sujeito	**Preta**	**Parda**	**Branca**	**Amarela**	**Indígena**	**Desconhecida**	**N**
Preta	46,4%	17,9%	25,0%	0,0%	3,6%	7,1%	56
Parda	7,4%	44,4%	38,8%	0,8%	5,6%	3,0%	394
Branca	1,1%	8,3%	87,0%	0,6%	1,6%	1,5%	895
Amarela	1,6%	7,9%	30,2%	57,1%	0,0%	3,2%	63
Indígena	0,0%	28,6%	28,6%	0,0%	42,9%	0,0%	7
Total							1415

4.2.2.12. Cor/raça do participante do estudo e a cor/raça do avô paterno

Como demonstrado na tabela 9, foi possível verificar 1410 indivíduos que responderam quanto à própria cor/raça e também responderam a questão de cor/raça do avô paterno, então, os indivíduos que se declararam de cor/raça preta e responderam a questão de cor/ raça do avô paterno somam um total de 58 sendo que destes indivíduos 30 (51,7%) declararam ter avô paterno de cor/raça preta, 14 (24,1%) avô paterno de cor/raça parda, 9 (15,5%) avô paterno cor/raça branca, 0% avô paterno de cor/raça amarela, 1 (1,7%) avô paterno de cor/raça indígena. Quatro indivíduos desconhecem a cor/raça do avô paterno.

Identificou-se 387 sujeitos que se declararam de cor/raça parda e responderam a questão de cor/raça do avô paterno, destes 38 (9,8%) declararam ter avô paterno de cor/raça preta, 194 (50,1%) avô paterno de cor/raça parda, 126 (32,6%) avô paterno de cor/raça branca, 4 (1,0%) avô paterno de cor/raça amarela, 6 (1,6%) avô paterno de cor/raça indígena. E 19 indivíduos desconhecem a cor/raça do avô paterno.

Declararam ser de cor/raça branca 395 participantes, os mesmo responderam a questão de cor/raça do avô paterno, destes 13 (1,5%) declaram ter avô paterno de cor/raça preta, 128 (14,3%) avô paterno de cor/raça parda, 722 (80,7%) avô paterno de

cor/raça branca, 5(0,6%) avô paterno de cor/raça amarela, 9 (1,0%) avô paterno de cor/raça indígena. E dezoito indivíduos desconhecem a cor/raça do avô paterno.

Com relação aos indivíduos que se declararam de cor/raça amarela e responderam a questão de cor/raça do avô paterno encontramos um total de 63 sendo que destes 1 (1,6%) declararam ter avô paterno de cor/raça preta, 7 (11,1%) avô paterno de cor/raça parda, 14 (22,2%) avô paterno de cor/raça branca, 39 (61,9%) avô paterno de cor/raça amarela,0% avô paterno de cor/raça indígena. E 2 indivíduos desconhecem a cor/raça do avô paterno.

É igual a sete o número de sujeitos que se declaram como Indígena estes mesmos responderam a questão de cor/raça do avô paterno. Sendo que destes sete nenhum deles declaram ter avô paterno cor/raça preta, 1 (14,3%) avô paterno de cor/raça parda, 3 (42,9%) avô paterno de cor/raça branca, 0% avô paterno de cor/raça amarela e 3 (42,9%) avó paterna de cor/raça indígena.

Tabela 9 – Cor/raça do sujeito versus cor/raça do avô paterno

	Etnia do avô paterno						
Etnia do sujeito	**Preta**	**Parda**	**Branca**	**Amarela**	**Indígena**	**Desconhecida**	**N**
Preta	51,7%	24,1%	15,5%	0,0%	1,7%	6,9%	58
Parda	9,8%	50,1%	32,6%	1,0%	1,6%	4,9%	387
Branca	1,5%	14,3%	80,7%	0,6%	1,0%	2,0%	895
Amarela	1,6%	11,1%	22,2%	61,9%	0,0%	3,2%	63
Indígena	0,0%	14,3%	42,9%	0,0%	42,9%	0,0%	7
Total							1410

4.2.2.13. Genótipo e local de nascimento

A fim de compreender as características regionais associadas ao genótipo da população brasileira participante deste estudo, analisamos a relação da genotipagem com a região de nascimento (Sudeste, Nordeste e Sul do Brasil). Do total da amostra, 1238 indivíduos responderam ao questionamento sobre local de nascimento e tiveram amostras viáveis para genotipagem. Os dados estão apresentados na tabela 15.

Assim, na região Sudeste houve um total de 516 indivíduos, destes 333 (64,5%) indivíduos apresentam genótipo GG, 161 (31,2%) apresentaram genótipo GA e 22 (4,3%) apresentaram genótipo AA. Da Região Nordeste, com total de 365 indivíduos, 260 (71,2%) possuem genótipo GG, 97 (26,6%) genótipo GA e 8 (2,2%) genótipo AA. Na região Sul, dos 357 indivíduos, 229 (64,1%) têm genótipo GG, 117 (32,8%) genótipo GA e 11 (3,1%) genótipo AA.

Aplicamos o teste chi-quadrado ($\chi 2$) para comparação da diferença de proporção de AA em cada uma das três regiões de coleta ($\chi 2$ =13,82; p= 0,032) e encontrou-se que há diferença na distribuição dos genótipos quando considera-se o local de nascimento.

Tabela 10 – Genótipo e região de nascimento

Região	**Genotipagem**			**N**
	GG	GA	AA	
Sudeste	64,50%	31,20%	4,30%	516
Nordeste	71,20%	26,60%	2,20%	365
Sul	64,10%	32,80%	3,10%	357
Total				1238

5. Discussão

O presente estudo teve como um dos objetivos a caracterização genotípica para o polimorfismo Val66met na população brasileira e em um grupo de indivíduos diagnosticados com AVC. Analisamos possíveis efeitos do polimorfismo e de diferentes estratégias de reabilitação sobre o BDNF circulante. Buscamos ainda compreender se o gênero poderia influenciar os níveis de BDNF plasmático dos grupos submetidos a cada uma das duas terapias, TR e TCI. Por fim, descrevemos o perfil étnico e genotípico (quanto ao polimorfismo) dos participantes sem AVC (estudo populacional).

Demonstramos, com a análise dos resultados dos níveis de BDNF por método de ELISA, que houve aumento dos níveis de BDNF circulante quando realizado tratamento, sem distinção de terapia, assim como também houve aumento de BDNF no grupo de pacientes que realizaram TR. O mesmo efeito não foi observado no grupo submetido à TCI. Estudos apontam a TR como uma das melhores estratégias de reabilitação, considerando que este tipo de terapia é multidimensional por acionar diferentes sistemas sensoriais de forma integrativa e com parâmetros e objetivos definidos, além de contemplar métodos que envolvem estímulos aos sistemas sensoriais, somático, auditivo e visual, tornando a terapia mais atrativa ao paciente, podendo facilitar a maior produção de BDNF. Diferentemente da terapia de contenção induzida que, apesar de ser apontada como uma terapia eficiente, a falta de direcionamento dos estímulos associada ao possível estresse gerado quando o paciente não consegue realizar suas tarefas de vida diária utilizando o membro parético podem influenciar na produção do BDNF circulante (TURNER *et al*. 2013).

Se considerarmos que a terapia robótica utiliza uma programação de tarefas que leva à execução de exercícios físicos durante o tratamento, o aumento da síntese e liberação de BDNF pode estar relacionada à realização de exercício físico (EGGERMONT *et al*., 2006), indo ao encontro dos dados obtidos neste estudo. Considerando que o BDNF é produzido no SNC (LINDHOLM *et al*., 1996) e também perifericamente (COTMAN & BERCHTOLD, 2002), podemos afirmar que estratégias que usem o exercício físico como estímulo, tal como o tratamento de fisioterapia,

podem aumentar a produção desta proteína.

Após o exercício físico, inicialmente, o BDNF circulante aumenta seguido de uma diminuição da molécula no plasma, o que pode indicar que é transportado, via circulação sanguínea, para o cérebro. Concluindo assim, que o BDNF atravessa a barreira hematoencefálica e é importante nos processos que promovem a neuroplasticidade, (KNAEPEN *et al*., 2010).

Como o BDNF tem funções importantes no SNC e na periferia, estudos vêm demonstrando que as concentrações periféricas de BDNF estão reduzidas em diversas doenças metabólicas e neurodegenerativas, tais como, obesidade, diabetes tipo 2, hipertensão, depressão, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e o comprometimento cognitivo leve (PEDERSEN *et al*., 2009). Assim, o tempo e a etiologia do AVC podem também influenciar a produção de BDNF. A análise do BDNF plasmático foi feita antes e depois da reabilitação, no entanto, não houve homogeneidade nos tempos pós-AVC dos indivíduos. Se considerarmos que a evolução de processos secundários à lesão primária podem influenciar a síntese e liberação de BDNF plasmático, deve-se analisar cuidadosamente o possível efeito encontrado (DI LAZZARO *et al.,* 2007).

As concentrações de BDNF plasmático também podem variar quanto ao gênero, como apontado em nossas análises, que demonstrou aumento dos níveis de BDNF em mulheres que realizaram TR. Estudos mostram que em homens a liberação de BDNF pode sofrer variações durante diferentes períodos do dia. Choi e colaboradores (2010), ao comparar amostras de BDNF plasmático de homens e mulheres coletadas em três períodos do dia (9h, 13h e 17h), revelaram que há diminuição dos níveis de BDNF ao longo do dia em homens, porém em mulheres, não houve variação. Tais diferenças podem estar relacionadas com hormônios sexuais, principalmente os gonadais, que estariam atuando na regulação da expressão de BDNF em mulheres (BEGLIUOMINI *et al*., 2007).

Além da diferença de gênero poder influenciar na regulação de BDNF, a relação dos níveis de BDNF com estilo de vida dos indivíduos vem sendo demonstrada em diversos estudos. Questões como alimentação, prática de exercícios, tabagismo e outros hábitos fazem parte das diversas análises envolvendo o BDNF. A dieta típica dos

povos do Ocidente, que é rica em gordura saturada e açúcar, pode prejudicar aspectos cruciais da plasticidade neuronal e comportamental associada com a função do BDNF. Por outro lado, a prática exacerbada de exercícios em busca de recuperação pode não aumentar os níveis de BDNF. Dessa forma, o possível estresse gerado pela TCI, pode ter influenciado a produção de BDNF, que foi menor nesse grupo. Sugere-se que a prática moderada de exercício físico leva ao aumento de BDNF (CHAN *et al*., 2008) e, considerando que a TR é uma estratégia que respeita os limites do indivíduo durante a prática e, portanto, impede a instalação de mecanismos relacionados ao estresse, a maior quantidade de BDNF pode significar que há mais processos de neuroplasticidade mediados por essa molécula. Outros eventos podem influenciar a produção de BDNF, como tabagismo que, além dos males causados ao organismo pelo uso do tabaco, pode levar a prejuízos associados com baixo níveis de BDNF (ZHANG *et al*., 2016).

Então, apesar dos sujeitos da amostra apresentarem sequelas de AVC, nossa investigação não coletou dados que caracterizasse minuciosamente os diferentes perfis. Dessa forma, pode ter havido efeito de confundidores, como os citados no parágrafo acima, que influenciaram nos resultados dos níveis de BDNF. Assim, acreditamos que as associações não encontradas neste estudo podem estar ligadas a diferentes fatores comportamentais e ambientais que envolvem os sujeitos da amostra.

Uma das hipóteses iniciais do estudo era que haveria diferença entre a idade dos indivíduos e os níveis de BDNF plasmático, assim como poderia haver diferença nos níveis de BDNF considerando o genótipo. No entanto, não achamos associação entre estes dados nos grupos TR e TCI. A não relação do genótipo com os níveis de BDNF encontrados nesta pesquisa corroboram com os dados de outros estudos (ZHOU *et al.,* 2011; BHAT *&* LEE, 2006).

O polimorfismo Val66Met foi escolhido como alvo de investigação por se tratar de um polimorfismo funcional com ações já bem estabelecidas na literatura, (BRADY *et al*.,2015; CHEERAN *et al*., 2008; EGAN *et al.,* 2003) entretanto, os estudos de associação deste polimorfismo com o AVC é incipiente. Desta forma, a frequência do polimorfismo Val66met na população brasileira foi comparada com a frequência do polimorfismo do gene do BDNF nos pacientes por meio de ferramentas estatísticas. Identificamos que não houve diferença na distribuição genotípica entre os dois grupos.

Além disso, os dois grupos apresentam frequências semelhantes dos alelos A e G. Sendo assim, podemos inferir que não houve influência do polimorfismo sobre a ocorrência de AVC nos indivíduos estudados.

A análise da frequência do polimorfismo Val66met na população brasileira mostrou que a presença do polimorfismo não foi frequente nesta amostra, tanto nos indivíduos com AVC quanto nos indivíduos saudáveis. O estudo de Notaras e colaboradores (2015) propõe que o efeito funcional de rs6265 - denominação também utilizada para o polimorfismo Val66Met - pode ser "específico da etnicidade" (característica denominada neste estudo como cor/raça, seguindo definição estabelecida pelo IBGE), em que a associação do polimorfismo com os resultados clínicos depende do fundo genético. Enquanto rs6265 tem evidência mais forte para efeitos funcionais, pode haver outros polimorfismos no gene BDNF que poderiam influenciar sua função (KUNUGI *et al*., 2001).

Sabe-se que a população brasileira recebeu diferentes influências raciais, havendo um complexo processo de miscigenação entre ameríndios, europeus e africanos (PENA.,2000). Com os dados referentes à autodeclaração dos indivíduos para cor/raça foi possível observar baixa frequência do polimorfismo em indivíduos que se autodeclaram negros e maior presença do polimorfismo em indivíduos amarelo. Assim, do total de entrevistados, 985 indivíduos (63,2%) da amostra se classificam como brancos, 430 (27,7%) como pardos, 65 (4,2%) como amarelos, 63 (4,1%) como pretos e 7 (0,5%) como indígena.

Os dados do IBGE (2010), que descrevem as características gerais da população brasileira quanto à cor ou raça, mostraram que do total de cerca de 190 milhões de brasileiros, 47,7% das pessoas se declararam como brancas 43,1% se declararam pardas, 1,1% se declaram amarelas, 7,6% se declaram pretas e 0,4% se declararam como indígena. Apesar dos dados deste estudo se mostrar diferente quando comparados aos dados do IBGE, é possível afirmar que o povo brasileiro é um povo miscigenado.

Ainda, segundo os dados do IBGE (2010), a maioria das pessoas que se declararam negras estão no Nordeste do Brasil, o que afirma o dado encontrado neste estudo quanto à genotipagem e o local de nascimento, que mostrou menor

porcentagem de pessoas com o polimorfismo na região Nordeste. Considerando que este polimorfismo é raro na população negra (NCBI, 2015), podemos apontar como hipótese a baixa frequência do polimorfismo Val66Met na população brasileira por sofrermos fortes influências dos povos africanos. Porém, é difícil identificar a origem do polimorfismo considerando que há limitações na metodologia do estudo, pois não utilizamos um marcador genético de ancestralidade que confirmasse os padrões genéticos (GOMES, 2016). Este aspecto, portanto, poderia ser analisado mais detidamente.

Por meio das informações de cor/raça obtidas com os dados dos sujeitos da pesquisa e seus familiares, foi possível observar que o perfil de miscigenação mudou nas três gerações analisadas (indivíduo, pais e avós). Assim, os participantes que se consideram de cor/raça pretos somam 4,2% da amostra, destes 56,5% relatou ter mãe de cor/raça preta e 67,9% pai de cor/raça preta. Já na geração dos avós, 43,1% relataram ter avó materna de cor/raça preta e os com avô materno da mesma cor/raça somam 42,9%. Os com avó paterna de cor/raça preta somam 67,9% e com avô paterna da raça preta totalizam 51,7%. Desta forma, verificamos que nas gerações passadas o padrão de miscigenação se mostrava menos linear (menos miscigenado) e na geração atual mais miscigenada, entretanto, sabemos que a percepção de cor/raça é subjetiva e não temos elementos suficientes para afirmar se esse é um efeito realmente biológico ou se há influências culturais.

Há uma quantidade considerável de estudos que relacionam o Val66Met com diferentes condições na população asiática, a qual apresenta maior frequência do polimorfismo (NOTARAS *et al*., 2015; KUNUGI *et al*.,2001; SIM *et al*., 2010). Dessa forma, a cor/raça é fator importante a ser considerado ao estudarmos um polimorfismo específico.

Como nesse estudo, outros autores (NOTARAS *et al*., 2015; KUNUGI *et*.,2001; SIM *et al*., 2010) consideram que a característica nômade das populações humanas possa ter contribuído como um efeito mascarador da pressão seletiva natural, porque, além do ser humano se deslocar do lugar de nascimento para outros lugares, tais populações migrantes estariam sujeitas à inserção de fluxos gênicos, o que pode resultar em um novo padrão genético miscigenado, como no Brasil.

Há um questionamento sobre possíveis fatores além dos ambientais que poderiam contribuir para que tais variações genéticas se tornem específicas de cada cor/raça. Uma das hipóteses, além da questão migratória, é a dos sistemas de plasticidade atribuídos ao humano, supondo assim que, um indivíduo que apresente um determinado padrão genotípico pouco adaptável a um determinado local poderia ser melhor adaptado a outro ambiente (GOTTESMANN, 2000).

Outro ponto a ser considerado é que efeitos comportamentais e cognitivos associado ao polimorfismo Val66Met são mais presentes entre caucasianos, apesar da frequência do alelo Met (A) ser muito maior em indivíduos asiáticos. Este fato levanta a hipótese de que, em algumas populações, possa estar ocorrendo um tipo de mecanismo compensatório que resiste ou elimina os efeitos negativos do polimorfismo (BATH & LEE 2006). Pode-se afirmar, portanto, que há fatores distintos que influenciam o aparecimento e a manutenção de um polimorfismo. Acredita-se que estudos futuros precisam avaliar possíveis efeitos e interações com polimorfismos, em outros genes de risco.

Pensou-se na hipótese de se usar o BDNF plasmático e seu polimorfismo Val66Met como biomarcadores que pudessem indicar o prognóstico de recuperação funcional. Ou seja, a presença do polimorfismo poderia influenciar a produção de BDNF. No entanto, os dados desse trabalho corroboram com o de outros (KAREGE et al., 2005; LOMMATZSCH et al., 2005; DI LAZZARO et al., 2007) que mostraram que não há influência da presença do polimorfismo sobre o BDNF circulante. Apesar disso, houve efeito da estratégia de reabilitação utilizada sobre a quantidade de BDNF.

6. Conclusão

Identificou-se aumento dos níveis de BDNF plasmático após reabilitação de pacientes com sequelas de AVC, efeito mais evidenciado nos sujeitos submetidos à reabilitação por meio da terapia robótica. A terapia robótica pode ser utilizada como alternativa para alcançar melhores resultados no processo de reabilitação, uma vez que parece ser a que mais influencia a produção de BDNF. Realizar tratamento de reabilitação pode ser importante nos processos de neuroplasticidade, favorecendo a recuperação de funções em pacientes com AVC.

A baixa frequência do polimorfismo do BDNF – Val66Met – encontrada nas amostras dos dois grupos, saudáveis e com AVC, aponta para tendência de que não exista associação entre Val66Met e AVC.

O estudo populacional confirmou a diversidade de cor e raça da população brasileira e indicou baixa frequência do polimorfismo no Brasil em geral. Porém, quando estratificados os grupos em cada cor/raça, as porcentagens vão ao encontro do que é encontrado na literatura: rara frequência do polimorfismo Val66Met em negros.

As análises realizadas com os dados dos ascendentes dos participantes do estudo nos levaram a compreender que o perfil de miscigenação mudou ao longo das três gerações. Por fim, observamos que há correspondência entre raça/ cor e a ocorrência do genótipo de acordo com a região.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL., G. E. VOL.14; 2011., N. R. D. J. A. J. **Envelhecimento e longevidade no Rio Grande do Sul: um perfil histórico, étnico e de morbi-mortalidade dos idosos.** Rev. bras. geriatr. gerontol. Rio de Janeiro: Zepeline. 14**:** 40 p. 2011.

ARIDA, R. M.; SCORZA, F. A.; CAVALHEIRO, E. A. Role of physical exercise as complementary treatment for epilepsy and other brain disorders. **Curr Pharm Des,** v. 19, n. 38, p. 6720-5, 2013. ISSN 1873-4286.
Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23530515 >.

ARMSTRONG, D. M.; MARPLE-HORVAT, D. E. Role of the cerebellum and motor cortex in the regulation of visually controlled locomotion. **Can J Physiol Pharmacol,** v. 74, n. 4, p. 443-55, Apr 1996. ISSN 0008-4212.
Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8828890 >.

BATH, K. G.; LEE, F. S. Variant BDNF (Val66Met) impact on brain structure and function. **Cogn Affect Behav Neurosci,** v. 6, n. 1, p. 79-85, Mar 2006. ISSN 1530-7026.
Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16869232 >.

BEGLIUOMINI, S. et al. Plasma brain-derived neurotrophic factor daily variations in men: correlation with cortisol circadian rhythm. **J Endocrinol,** v. 197, n. 2, p. 429-35, May 2008. ISSN 1479-6805.
Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18434373 >.

BERLUCCHI, G. The origin of the term plasticity in the neurosciences: Ernesto Lugaro and chemical synaptic transmission. **J Hist Neurosci,** v. 11, n. 3, p. 305-9, Sep 2002. ISSN 0964-704X.
Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12481483 >.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETÁRIA DE ATENÇÃO À SAÚDE**. Manual de rotinas para prevenção ao AVC**. Brasília: Ministério da Saúde 2013. 51 p. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_rotinas_para_atencao_avc.pdf.

BRAUN, A. et al. Cellular sources of enhanced brain-derived neurotrophic factor production in a mouse model of allergic inflammation. **Am J Respir Cell Mol Biol,** v. 21, n. 4, p. 537-46, Oct 1999. ISSN 1044-1549.
Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10502564 >.

BRUNA, V.; PEDRO, R. **Reabilitação Motora no Acidente Vascular Encefálico**. Rio de Janeiro: Rubio Ltda., 2013. 150.

CASTRO, E. **Memória e Aprendizagem: Retenção e aquisição do saber.** 2004/2005. 19 (Mestrado). Departamento de Educação, Universidade Católica de Portugal., Braga.

CHAN, K. L.; TONG, K. Y.; YIP, S. P. Relationship of serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and health-related lifestyle in healthy human subjects. **Neurosci Lett,** v. 447, n. 2-3, p. 124-8, Dec 2008. ISSN 0304-3940.
Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18852019 >.

CHEERAN, B. et al. A common polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor gene (BDNF) modulates human cortical plasticity and the response to rTMS. **J Physiol,** v. 586, n. Pt 23, p. 5717-25, Dec 2008. ISSN 1469-7793.
Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18845611 >.

CHEN, W. G. et al. Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. **Science,** v. 302, n. 5646, p. 885-9, Oct 2003. ISSN 1095-9203. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14593183 >.

CHO, K. H.; SONG, W. K. Robot-Assisted Reach Training for Improving Upper Extremity Function of Chronic Stroke. **Tohoku J Exp Med,** v. 237, n. 2, p. 149-55, 2015. ISSN 1349-3329.
Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26460793 >.

CHOI, S. W.; BHANG, S.; AHN, J. H. Diurnal variation and gender differences of plasma brain-derived neurotrophic factor in healthy human subjects. **Psychiatry Res,** v. 186, n. 2-3, p. 427-30, Apr 2011. ISSN 0165-1781.
Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20826006 >.

CRAMER, S. C. et al. Correlation between genetic polymorphisms and stroke recovery: analysis of the GAIN Americas and GAIN International Studies. **Eur J Neurol,** v. 19, n. 5, p. 718-24, May 2012. ISSN 1468-1331.
Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22221491 >.

DATASUS. Epidemiologia e Serviços de Saúde. Rio de Janeiro, 2012. Acesso em: Out.2015.

DI LAZZARO, V. et al. BDNF plasma levels in acute stroke. **Neurosci Lett,** v. 422, n. 2, p. 128-30, Jul 2007. ISSN 0304-3940.
Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17590513 >.

DI PINO, G. et al. Val66Met BDNF Polymorphism Implies a Different Way to Recover From Stroke Rather Than a Worse Overall Recoverability. **Neurorehabil Neural Repair,** v. 30, n. 1, p. 3-8, Jan 2016. ISSN 1552-6844.
Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25896987 >.

DONNAN, G. A. et al. Stroke. **Lancet,** v. 371, n. 9624, p. 1612-23, May 2008. ISSN 1474-547X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18468545 >.

EGAN, M. F. et al. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. **Cell,** v. 112, n. 2, p. 257-69, Jan 2003. ISSN 0092-8674.
Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12553913 >.

EGGERMONT, L. et al. Exercise, cognition and Alzheimer's disease: more is not necessarily better. **Neurosci Biobehav Rev,** v. 30, n. 4, p. 562-75, 2006. ISSN 0149-7634. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16359729 >.

GOMES, K.F.B. A influência da estratificação populacional na susceptibilidade genética ao diabetes mellitus tipo 1 em uma população brasileira. 2016. Tese de doutorado – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP.

GOTTESMANN, C. Is the delayed sleep phase syndrome a physical or psychological disease? A case report of disappearance following a change of latitude. **Psychiatry Clin Neurosci,** v. 54, n. 5, p. 543-6, Oct 2000. ISSN 1323-1316. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11043803 >.

GÖTZ, R.; RAULF, F.; SCHARTL, M. Brain-derived neurotrophic factor is more highly conserved in structure and function than nerve growth factor during vertebrate evolution. **J Neurochem,** v. 59, n. 2, p. 432-42, Aug 1992. ISSN 0022-3042.
Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1629719 >.

HALLBÖÖK, F. Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families. **Curr Opin Neurobiol,** v. 9, n. 5, p. 616-21, Oct 1999. ISSN 0959-4388.
Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10508739 >.

HELM, E. E. et al. The presence of a single-nucleotide polymorphism in the BDNF gene affects the rate of locomotor adaptation after stroke. **Exp Brain Res,** v. 234, n. 2, p. 341-51, Feb 2016. ISSN 1432-1106.
Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26487176 >.

HOLLOWAY, R. G. et al. A systematic review of cost-effectiveness research of stroke evaluation and treatment. **Stroke,** v. 30, n. 7, p. 1340-9, Jul 1999. ISSN 0039-2499. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10390305 >.

HU, Y.; RUSSEK, S. J. BDNF and the diseased nervous system: a delicate balance between adaptive and pathological processes of gene regulation. **J Neurochem,** v. 105, n. 1, p. 1-17, Apr 2008. ISSN 1471-4159.
Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18208542 >.

HUANG, V. S.; KRAKAUER, J. W. Robotic neurorehabilitation: a computational motor learning perspective. **J Neuroeng Rehabil,** v. 6, p. 5, 2009. ISSN 1743-0003. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19243614 >.

IBGE- Instituto de Geografia e Estatística. **Prevenção e Cuidado integrados para o Controle da Hipertensão Arterial e Diabetes** Mellitus. Rio de Janeiro: IBGE, 2011.

IBÁÑEZ, C. F. Emerging themes in structural biology of neurotrophic factors. **Trends Neurosci,** v. 21, n. 10, p. 438-44, Oct 1998. ISSN 0166-2236.
Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9786342 >.

IZQUIERDO, I. et al. The evidence for hippocampal long-term potentiation as a basis of memory for simple tasks. **An Acad Bras Cienc,** v. 80, n. 1, p. 115-27, Mar 2008. ISSN 0001-3765.
Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18345380 >.

JOUNDI, R. A. et al. The effect of BDNF val66met polymorphism on visuomotor adaptation. **Exp Brain Res,** v. 223, n. 1, p. 43-50, Nov 2012. ISSN 1432-1106. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22941316 >.

KAREGE, F. et al. Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity. **Biol Psychiatry,** v. 57, n. 9, p. 1068-72, May 2005. ISSN 0006-3223. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15860348 >.

KIM, J. M. et al. Associations of BDNF genotype and promoter methylation with acute and long-term stroke outcomes in an East Asian cohort. **PLoS One,** v. 7, n. 12, p. e51280, 2012. ISSN 1932-6203.
Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23240009 >.

KIM, W. S. et al. Effect of the presence of brain-derived neurotrophic factor val(66)met polymorphism on the recovery in patients with acute subcortical stroke. **Ann Rehabil Med,** v. 37, n. 3, p. 311-9, Jun 2013. ISSN 2234-0645.
Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23869328 >.

KNAEPEN, K. et al. Neuroplasticity - exercise-induced response of peripheral brain-derived neurotrophic factor: a systematic review of experimental studies in human subjects. **Sports Med,** v. 40, n. 9, p. 765-801, Sep 2010. ISSN 1179-2035.
Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20726622 >.

KUNUGI, H. et al. A novel polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene associated with late-onset Alzheimer's disease. **Mol Psychiatry,** v. 6, n. 1, p. 83-6, Jan 2001. ISSN 1359-4184.
Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11244490 >.

LOMMATZSCH, M. et al. The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. **Neurobiol Aging,** v. 26, n. 1, p. 115-23, Jan 2005. ISSN 0197-4580.
Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15585351 >.

LYNCH, M. Analysis of the presynaptic signalling mechanisms underlying the inhibition of LTP in rat dentate gyrus by the tyrosine kinase inhibitor, genistein. **Hippocampus,** v. 14, n. 1, p. 4, 2004. ISSN 1050-9631. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15058476 >.

MOWLA, S. J. et al. Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. **J Neurosci,** v. 19, n. 6, p. 2069-80, Mar 1999. ISSN 0270-6474.
Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10066260 >.

NAKAHASHI, T. et al. Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. **FEBS Lett,** v. 470, n. 2, p. 113-7, Mar 2000. ISSN 0014-5793. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10734218 >.

NOTARAS, M.; HILL, R.; VAN DEN BUUSE, M. The BDNF gene Val66Met polymorphism as a modifier of psychiatric disorder susceptibility: progress and controversy. **Mol Psychiatry,** v. 20, n. 8, p. 916-30, Aug 2015. ISSN 1476-5578. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25824305 >.

OTERO, R. M. E. A. **Tipo celular no acidente vascular cerebral**. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. São Paulo. v.31**:** 3-9 p. 2009.

PAULSEN, O.; SEJNOWSKI, T. J. Natural patterns of activity and long-term synaptic plasticity. **Curr Opin Neurobiol,** v. 10, n. 2, p. 172-9, Apr 2000. ISSN 0959-4388. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10753798 >.

PEDERSEN, B. K. et al. Role of exercise-induced brain-derived neurotrophic factor production in the regulation of energy homeostasis in mammals. **Exp Physiol,** v. 94, n. 12, p. 1153-60, Dec 2009. ISSN 1469-445X.
Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19748969 >.

POCHET, R.; TIMMERMANS, J. P. Neurodegeneration and neuroplasticity in the peripheral and central nervous system. **Anat Rec (Hoboken),** v. 292, n. 12, p. 1847-8, Dec 2009. ISSN 1932-8494.
Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19943338 >.

REICHARDT, L. F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci,** v. 361, n. 1473, p. 1545-64, Sep 2006. ISSN 0962-8436. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16939974 >.

RICHARDSON, P. M. Neurotrophic factors in regeneration. **Curr Opin Neurobiol,** v. 1, n. 3, p. 401-6, Oct 1991. ISSN 0959-4388.
Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1688352 >.

SEIDL, E. M.; ZANNON, C. M. [Quality of life and health: conceptual and methodological issues]. **Cad Saude Publica,** v. 20, n. 2, p. 580-8, 2004 Mar-Apr 2004. ISSN 0102-311X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15073639 >.

SHIMIZU, E. et al. Serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in schizophrenia are indistinguishable from controls. **Neurosci Lett,** v. 351, n. 2, p. 111-4, Nov 2003. ISSN 0304-3940. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14583394 >.

SIM, M. S. et al. Association of brain-derived neurotrophic factor (Val66Met) genetic polymorphism with methamphetamine dependence in a Malaysian population. **Brain Res,** v. 1357, p. 91-6, Oct 2010. ISSN 1872-6240.
Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20736000 >.

SOUZA, C. A. E. A. **Influência da neuroplasticidade no controle motor.** Revista UNILUS Ensino e Pesquisa. Santos. v.10**:** 19 p. 2013.

SUPLEMENTAR., A. N. D. S. **Manual técnico para promoção de saúde e prevenção de risco e doenças na saúde suplementar.** 2011.

SZAPACS, M. E. et al. Exploring the relationship between serotonin and brain-derived neurotrophic factor: analysis of BDNF protein and extraneuronal 5-HT in mice with reduced serotonin transporter or BDNF expression. **J Neurosci Methods,** v. 140, n. 1-2, p. 81-92, Dec 2004. ISSN 0165-0270.
Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15589338 >.

TAUB, E. et al. Some anatomical observations following chronic dorsal rhizotomy in monkeys. **Neuroscience,** v. 5, n. 2, p. 389-401, 1980. ISSN 0306-4522.
Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6769070 >.

VOLPE, B. T. et al. Robotic devices as therapeutic and diagnostic tools for stroke recovery. **Arch Neurol,** v. 66, n. 9, p. 1086-90, Sep 2009. ISSN 1538-3687.
Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19752297 >.

WOLF, S. L. et al. Repetitive task practice: a critical review of constraint-induced movement therapy in stroke. **Neurologist,** v. 8, n. 6, p. 325-38, Nov 2002. ISSN 1074-7931. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12801434 >.

YAMAMOTO, H.; GURNEY, M. E. Human platelets contain brain-derived neurotrophic factor. **J Neurosci,** v. 10, n. 11, p. 3469-78, Nov 1990. ISSN 0270-6474.
Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2230938 >.

ZHANG, X. Y. et al. Effects of cigarette smoking and alcohol use on neurocognition and BDNF levels in a Chinese population. **Psychopharmacology (Berl),** v. 233, n. 3, p. 435-45, Feb 2016. ISSN 1432-2072.
Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26518023 >.

ZHAO, L. Y. et al. [Combination of morphine with low-dose naloxone for intravenous patient-controlled analgesia]. **Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao,** v. 27, n. 2, p. 228-31, Apr 2005. ISSN 1000-503X.
Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15960271 >.

DEIXAR EM BRANCO