



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

## **EFEITO DO EXERCÍCIO AERÓBIO SOBRE AS CÉLULAS PROGENITORAS DO ENDOTÉLIO**

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física da Universidade de Coimbra com vista à obtenção do grau de mestre em Biocinética.

Orientador: Professor Doutor Carlos Alberto Fontes Ribeiro.

Co-Orientador: Professora Doutora Paula Cristina V. B. Tavares.



Apoio: FCT Projeto Estratégico (Ref: PEst-C/SAU/UI3282/2011) e IBILI.

Sandra Marisa Pinto Pereira

Coimbra, 2013

*“A vida é maior que qualquer arte. E digo mais: o homem cuja vida mais se aproxima da perfeição é o maior artista de todos; pois o que é a arte sem a base e a estrutura de uma vida nobre?”*

*Mahatma Gandhi*

## **AGRADECIMENTOS**

A realização da presente dissertação de mestrado apenas foi exequível com o apoio e colaboração de um vasto conjunto de pessoas, às quais não podia deixar de apresentar a minha profunda gratidão e manifestar o meu sincero agradecimento.

Aos professores e orientadores, Doutor Carlos Fontes Ribeiro e Doutora Paula Tavares pelo seu total apoio, disponibilidade e acima de tudo pelo extraordinário profissionalismo e capacidade científica.

A todos os colegas do grupo de investigação, mestrado e trabalho que tão generosamente cooperaram na consecução do trabalho laboratorial, treino dos animais e apoio na realização das diversas etapas.

À Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física da Universidade de Coimbra por tonar possível a consecução da presente dissertação de mestrado.

Ao Doutor Artur Paiva e profissionais do Centro de Histocompatibilidade do Centro a tão ditosa ajuda na realização das análises sanguíneas por citometria de fluxo.

À Doutora Fátima Rosado, técnica superior do laboratório da Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física da Universidade de Coimbra pela sua colaboração.

À minha mãe, pelo incansável apoio nos momentos de desalento, pelas sábias palavras e conselhos que tão generosamente me prestou.

Aos meus amigos e colegas de serviço por toda a paciência, compreensão, partilha de experiências profissionais e encorajamento sobretudo nos momentos de maior preocupação.

À minha família e todos os que de alguma forma cooperaram e contribuíram para que este trabalho chegasse a bom porto, a minha gratidão fraterna.

## RESUMO

O músculo esquelético é um órgão ditado de uma extraordinária dinâmica seja em termos fisiológicos, bioquímicos, mecânicos e mesmo endócrinos. Devendo-se à sua arquitetura anatomofisiológica a mobilidade e desempenho motor eficiente.

O ajuste funcional entre todas as estruturas determinam que o músculo exiba toda a sua operacionalidade e quando sujeito a exercício físico aeróbio, as fibras, dado a sua plasticidade, podem sofrer uma modulação no sentido do aumento das fibras do tipo I. Em todo este processo que envolve necessariamente aumentos no consumo de oxigénio e nutrientes, este aporte estará garantido se existir uma rede sanguínea eficaz, aos quais estão subjacentes os mecanismos de vasculogénese e angiogénese.

A construção de uma rede capilar implica que sejam ativados mecanismos de sinalização, no sentido de desenvolver um conjunto de funcionalidades complexas, ainda algo controversas e com aspetos mecanísticos por desvendar. Assim, são ativados alguns fatores, como o óxido nítrico (NO), citocinas que induzem a ativação de proteases, o fator de estimulação das colónias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), bem como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), entre outros, que exercem um importante papel na produção e mobilização de Células Progenitoras Endoteliais (EPC's), da medula óssea para o sangue periférico. Estas células são assim mobilizadas para a corrente sanguínea, indo depois proceder à (re)construção vascular, tendo em conta as suas propriedades de células indiferenciadas.

Assim, o nosso objetivo foi investigar a influência do exercício físico aeróbio sobre o número e diferenciação de EPC's e a sua relação com a densidade capilar no músculo esquelético solear.

Ratos Wistar jovens, machos, foram sujeitos a um protocolo de exercício aeróbio durante 8 semanas. O grupo controlo foi submetido a um exercício suave (durante o período em que decorreu o protocolo). Ao sétimo dia pós exercício foi colhido sangue dos animais a partir da veia jugular (depois de sujeitos a anestesia geral). As EPC's foram determinadas em amostras de sangue total por citometria de fluxo, utilizando anticorpos anti-CD45,-CD34,-CD133, -CD146 e -KDR. A análise histológica do músculo solear incluiu uma coloração por ATPase e hematoxilina - eosina (HE), para contagem dos diferentes tipos de fibras e capilares por forma a obter o rácio capilar /

fibra (C: F). Os níveis séricos de VEGF dos ratos, foram determinados por doseamento com recurso a um kit de ELISA comercial específica para a espécie animal.

Os resultados mostraram um aumento da proporção de C: F no músculo solear do grupo treinado. Não houve diferença entre grupos das percentagens das células que marcaram com os anticorpos de células estaminais imaturas (CD34<sup>+</sup> e CD133<sup>+</sup>). Em relação às células que expressaram marcadores de maior diferenciação de linhagem endotelial, CD146<sup>+</sup>, verificou-se uma diminuição significativa, no grupo exercício. Os valores de KDR não diferiram significativamente entre os dois grupos.

Os níveis de VEGF apresentaram uma tendência no sentido de um aumento no grupo sujeito ao exercício.

Não podemos excluir que o exercício físico aeróbio ao ter aumentado a revascularização no músculo *soleus* dos ratos treinados, não tenha de fato mobilizado vários tipos de EPC's, presumidamente, provenientes da medula óssea. Provavelmente tal terá ocorrido mais precocemente e não no período em que se colheu o sangue. Também a diminuição das células CD146<sup>+</sup> pode significar a sua implantação no endotélio. Podemos igualmente estar na presença de outras linhagens celulares progenitoras em circulação com capacidade vasculogénica/angiogénica.

Estes são dados inconclusivos, tendo em conta que são necessários estudos mais alargados para a confirmação que de fato há uma resposta robusta ao exercício físico aeróbio, em termos de EPC's circulantes.

**PALAVRAS-CHAVE:** EPC's; Revascularização; Fibras musculares; Treino aeróbio; Ratos Wistar.

## ABSTRACT

Skeletal muscle is an organ with an extraordinary dynamic, either physiological, biochemical, mechanical or even endocrinal terms, due to its anatomical and physiological mobility architecture and efficient performance.

When undergoing aerobic exercise, the fibers, due to its plasticity, may suffer a modulation towards increasing fiber type I. To support this process, which involves necessarily the increase of the consumption of oxygen and nutrients there is a net effective circulation with the underlying mechanisms of vasculogenesis and angiogenesis.

The construction of a capillary network implies that signaling mechanisms are activated to develop a set of complex functionalities, still somewhat controversial. Thus, factors such as nitric oxide (NO), cytokines that induce activation of proteases, the Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), and the vascular endothelial growth factor (VEGF), among others are activated. They seem to have an important role in the production and mobilization of endothelial progenitor cells (EPC's) from the bone marrow into blood. These cells exert activity of vascular construction/rebuilding, considering the properties of undifferentiated cells, when there is a stimulus that calls them to mobilize.

Thus, our aim was to investigate the influence of exercise on the number and differentiation of EPC's and its correlation with the capillary density in soleus muscle.

Male Wistar rats did a aerobic protocol training for 8 weeks. The control group was submitted to a mild exercise (during the same time protocol). In the 7<sup>th</sup> day after exercise blood was collected from the jugular vein (after general anesthesia). EPCs were determined on whole blood samples by flow cytometry using antibodies anti-CD45, -CD34, -CD133, -CD146 and -KDR. The histological analysis of soleus muscle included an ATPase staining and hematoxylin-eosin staining to count and measure the different fiber types. The VEGF rat serum levels were determined by an ELISA commercial kit.

The results showed an increase of Capillaries: Fiber ratio in the soleus muscle of the trained group. Concerning EPC's in total blood, we found for immature cells (CD34<sup>+</sup> and CD133<sup>+</sup>) maintenance of the cell percentage after training. With regard to cells expressing markers of endothelial lineage differentiation, CD146<sup>+</sup>, they were significantly decreased in the exercise group.

VEGF levels exhibited a tendency to increase in the exercise group.

We cannot exclude that aerobic exercise while having increased revascularization in *soleus* muscle of trained rats didn't mobilize various types of EPC's. Probably such EPC's increase occurred early and not in our period of blood collection. The CD146<sup>+</sup> decrease may signify its implantation in the vascular endothelium. We may also be in the presence of other cell lineages of the circulating progenitor cells capable of vasculogenic/angiogenic effects.

These are inconclusive data. More extensive studies are needed to confirm a robust answer to aerobic exercise in terms of circulating EPC's.

**KEYWORDS:** EPC's; revascularization; muscle fibers; aerobic training; Wistar rats.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AcLDL - lipoproteínas de baixa densidade acetiladas

Ang-1 - angiopoietina-1

CAC's - células angiogénicas circulantes

CD - agrupamento de diferenciação (*cluster of differentiation*)

CEC's - células endoteliais circulantes

EC-CFU - unidades formadoras de colónias de células endoteliais (*colony-forming unit endothelial cells*)

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EPC's - células progenitoras endoteliais

FACS - *Fluorescence-activated cell sorting*

FGF's - fatores de crescimento dos fibroblastos

GM-CSF - fator estimulante de colónias de granulócitos-macrófagos (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

HPC's - células progenitoras hematopoiéticas

HSC's - células estaminais hematopoiéticas

ISHAGE - *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering*

KDR - recetor com domínio quinase de inserção (*kinase insert domain receptor*)

Lin - linhagens

MMP-9 - metaloproteinases da matriz 9

MNC - células mononucleares do sangue

MSC's - células estaminais mesenquimais

NO - óxido nítrico

Opn - osteopontina

PBS - Tampão fosfato-salino (*phosphate buffered saline*)

PDGF - fator de crescimento derivado das plaquetas

Sca-1 - *stem cell antigen-1*

SDF-1 - fator 1 derivado da célula do estroma (*stromal cell-derived factor-1*)

T<sub>amb</sub> - Temperatura ambiente

Tie-2 - recetor da Ang-1

UEA-1 - lectina de *Ulex europaeus*

VEGF - fator de crescimento vascular endotelial (*Vascular endothelial growth factor*)

## ÍNDICE GERAL

LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xii
ÍNDICE DE TABELAS .....	xiii
ÍNDICE DE GRÁFICOS .....	xiv
INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO I.....	4
1. ESTADO DA ARTE.....	5
1.1 Descoberta e caracterização das EPC's .....	5
1.2 EPC's e o seu papel na vasculogénese e angiogénese .....	12
1.3 Ação do Exercício Físico sobre as EPC's versus Fibras Musculares Esqueléticas.....	17
1.3.1 Mobilização e circulação no sangue periférico de EPC's .....	19
1.3.2 Migração e Diferenciação de EPC's .....	21
CAPÍTULO II.....	23
2. OBJETIVOS .....	24
CAPÍTULO III .....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	26
3.1 Desenho do Estudo.....	26
3.2 Caracterização dos animais em estudo .....	26
3.3 Protocolo de treino dos animais .....	27
3.4 Isolamento e caracterização das EPC's no sangue periférico total .....	29
3.4.1 Colheitas de sangue.....	29
3.4.2 Preparação das amostras para análise por citometria de fluxo .....	29
3.4.3 Análise por citometria de fluxo .....	30
3.5 Análise do tecido muscular esquelético .....	32
3.5.1 Análise histológica para caracterização das fibras musculares esqueléticas .....	32

3.5.2 Densidade capilar e contagem da relação capilar/fibra no músculo <i>Soleus</i> .....	33
3.6 Doseamento do VEGF .....	34
3.7 Análise Estatística .....	35
CAPÍTULO IV .....	36
4. RESULTADOS .....	37
4.1 Caracterização da amostra.....	37
4.2 Análise histológica .....	40
4.3 Análise do sangue total dos ratos .....	41
CAPÍTULO V .....	44
5. DISCUSSÃO .....	45
CAPÍTULO VI .....	50
CONCLUSÃO .....	51
BIBLIOGRAFIA .....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Células estaminais adultas da medula óssea. ....	7
Figura 2. Medula óssea e nichos de células estaminais hematopoiéticas.....	8
Figura 3. (Imagem à direita) Vasculogénese. (Imagem à esquerda) Angiogénese.. ....	13
Figura 4. Organograma experimental.....	26
Figura 5. Tapete rolante de treino dos animais.....	27
Figura 6. Imagem de um corte transversal do músculo solear corado com hematoxilina-eosina (HE).....	40
Figura 7. Imagem de um corte transversal do músculo solear corado de acordo com a técnica de ATPase a pH 9,4.....	40

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Protocolo de treino aeróbio dos animais ao longo de oito semanas. ....	28
--	----

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Evolução da massa corporal dos animais em estudo ao longo de oito semanas.....	37
Gráfico 2. Tempo percorrido pelos animais durante o teste resistência/velocidade. ....	38
Gráfico 3. Velocidade Máxima atingida pelos animais durante o teste resistência/velocidade.....	39
Gráfico 4. Distância percorrida pelos animais durante o teste resistência/velocidade....	39
Gráfico 5. Relação entre o número de capilares e o número de fibras musculares presentes no músculo solear de ratos treinados e controlo.....	41
Gráfico 6. Representação exemplificativa de uma imagem correspondente à seleção das populações de células marcadas com os anticorpos (anti-CD45; anti-CD133; anti-CD146; anti-CD34) e os gráficos biparamétricos de populações celulares que marcam CD133, CD146, CD34 respetivamente. ....	41
Gráfico 7. Percentagem de células circulantes (em sangue total) com anticorpos marcadores de células indiferenciadas (CD34 <sup>+</sup> e CD133 <sup>+</sup> ).....	42
Gráfico 8. Percentagem de células circulantes (em sangue total) com marcadores de células diferenciadas com características endoteliais (CD146 <sup>+</sup> e KDR <sup>+</sup> ).. ....	42
Gráfico 9. Concentração sérica de VEGF (pg/ml) nos grupos controlo e treinados.. ....	43

## INTRODUÇÃO

O músculo esquelético constitui, aproximadamente, 45% do peso corporal e é o maior sistema orgânico do ser humano, tendo um importante papel na homeostasia bioenergética, tanto em repouso como em exercício. Representa o principal local de transformação e de armazenamento de energia, sendo o destino final dos sistemas de suporte primários envolvidos no exercício, como o cardiovascular e o pulmonar.

O músculo esquelético é pelas suas características uma estrutura dinâmica, com elevada plasticidade capaz de alterar as suas capacidades funcionais, morfologia e condições metabólicas em função das exigências impostas. Aumentos na sua atividade contráctil, devidas ao exercício físico aeróbio, levam a uma série de adaptações fisiológicas e bioquímicas, na modulação do tipo de fibras, na arquitetura circulatória e biogénese mitocondrial. Estas mudanças são a base para a melhoria do desempenho físico e benefícios gerais na saúde, pelo que o exercício regular deve tornar-se numa estratégia não farmacológica, alvo no combate a estilos de vida atuais promotores de patologias do foro cardiovascular e metabólico.

Porém, a prática regular de exercício físico apenas consegue explicar cerca de 60% dos benefícios a nível cardiovascular por efeitos na regulação da tensão arterial, em fatores envolvidos nos processos inflamatórios e hemostáticos, no perfil lipídico e glicémico, bem como na massa corporal (Mora *et al.*, 2007). Os restantes 40% dos mecanismos fisiológicos benéficos envolvidos permanecem ainda por esclarecer. Mas, é sem dúvida, reconhecido o seu efeito protetor a nível da função endotelial, tendo em conta que estes resultados salutares não sejam totalmente mediados segundo os reconhecidos tradicionais fatores de risco (Green *et al.*, 2003; Joyner *et al.*, 2009).

Não menos importante é ainda o efeito do exercício físico aeróbio a nível das fibras musculares esqueléticas, uma vez que este aumenta a proporção de fibras do tipo I, que pelas suas características fisiológicas carecem de um maior aporte de nutrientes e oxigénio. Assim, é expectável que esta transformação culmine num aumento da vascularização. Embora este fato esteja bem documentado, é ainda algo controversa a origem dos “novos” capilares. Capilares que localmente vão adquirir uma arquitetura que permita dar resposta às necessidades em termos de nutrientes e de oxigénio, uma vez que todos os seres vivos, animais e plantas, exceção feita em relação aos

organismos especialmente adaptados a viver em condições anaeróbias, requerem oxigénio para uma eficiente produção de energia. O oxigénio livre terá aparecido na atmosfera terrestre há aproximadamente 2000 milhões anos, acompanhando a evolução dos organismos fotossintéticos, sendo hoje um dos elementos mais abundante na crosta terrestre.

A produção do oxigénio terá sido igualmente beneficiada pelo aparecimento da camada de ozono na alta atmosfera e pela absorção das radiações ultravioletas solares, o que permitiu a evolução dos organismos para uma maior complexidade.

Verifica-se que a concentração do oxigénio celular depende das necessidades de cada célula e das velocidades com que ele entra nesta e é consumido. Para que os mecanismos de funcionamento celular sejam assegurados e com uma atividade sadia é necessária uma rede sanguínea capaz e eficiente, pelo que um endotélio adaptado e íntegro é de fulcral importância na prevenção de determinadas patologias.

A descoberta de uma população celular designada por células progenitoras endoteliais (EPC's) na década de 90 do século passado veio desafiar o paradigma da neovascularização, demonstrando que determinadas células estaminais hematopoiéticas (HSC's) são capazes de formar novos vasos sanguíneos, mesmo na ausência de uma rede de vasos pré-existente. Faz-se então importante esclarecer em que medida estas células podem servir como um biomarcador em situações de doença cardiovascular, e qual o seu potencial terapêutico. Ao mesmo tempo, interessa estabelecer o seu papel emergente em termos fisiológicos num contexto de prática de exercício físico aeróbio. Será este um estímulo que potenciará a mobilização e presença de EPC's no sangue periférico?

Sem dúvida, estas são questões de primordial interesse que necessitam de estudo e esclarecimento, pelo que é objetivo deste trabalho enriquecer este tema e dar um contributo para a compreensão de como a transformação das fibras musculares resultantes do exercício aeróbio é também acompanhada pela modificação da arquitetura da rede sanguínea e qual a proveniência celular para a construção destes novos vasos, nomeadamente em relação às EPC's circulantes no sangue periférico.

Desta forma o trabalho de investigação, aqui proposto em apresentação sob dissertação de mestrado irá iniciar-se com uma revisão do estado da arte em relação aos trabalhos de investigação desenvolvidos e avanços alcançados, que no nosso

entendimento de alguma forma têm contribuído para o esclarecimento da adaptação do endotélio induzido pelo exercício físico e na sinalização para a mobilização de EPC's. Delineamos posteriormente os objetivos específicos e descrevemos a metodologia utilizada para concretizar os mesmos. Finalmente, apresentamos os resultados obtidos e a discussão dos mesmos, tendo presente o caminho já percorrido nesta área específica.

Concluiremos resumindo o alcance dos resultados obtidos, uma vez que todo este campo de investigação é vasto, carecendo ainda de estudos mais aprofundados, tendo em conta a vasta gama de sinais induzidos pelo exercício e a interação estabelecida entre eles.

**CAPÍTULO I**  
**ESTADO DA ARTE**

## 1. ESTADO DA ARTE

Os seres humanos são organismos multicelulares complexos e todas as suas células necessitam de uma fonte fidedigna e controlada de oxigénio, bem como de nutrientes, que são indispensáveis à sua sobrevivência e normal funcionamento. A difusão de oxigénio através dos tecidos é limitada a cerca de 100 a 200  $\mu\text{m}$ , portanto, torna-se necessária uma rede vascular altamente desenvolvida para assegurar que todas as células são, dentro desta distância, supridas de oxigénio (Risau, 1997; Hoeben *et al.*, 2004).

Os vasos sanguíneos de uma forma muito simplista são fundamentalmente compostos por uma camada íntima constituída por células endoteliais, que se interligam para formar os tubos que permitem a manutenção do fluxo sanguíneo e a perfusão dos tecidos. Este tecido aparentemente singelo é atualmente visto, não como uma mera estrutura inerte de separação entre o sangue e as células musculares lisas, mas como um importante sistema de regulação e sinalização vascular (Tavares e Fontes Ribeiro, 2007).

Para que o endotélio se mantenha íntegro, funcional e haja formação de novos vasos sanguíneos há necessidade de mecanismos que suportem estas condições, pelo que a descoberta de determinada linhagem celular que permite dar resposta a estas necessidades, gerou considerável interesse no campo da biologia vascular, tendo ficado conhecidas pelo nome genérico de células progenitoras endoteliais (EPC's).

### 1.1 Descoberta e caracterização das EPC's

A observação de que existia uma afinidade entre as células endoteliais e as células hematopoiéticas foi relatada pela primeira vez em 1920 por Florence Sabin. Até há bem pouco tempo a ocorrência de diferenciação de células endoteliais a partir de angioblastos era atribuída, exclusivamente, ao embrião em desenvolvimento.

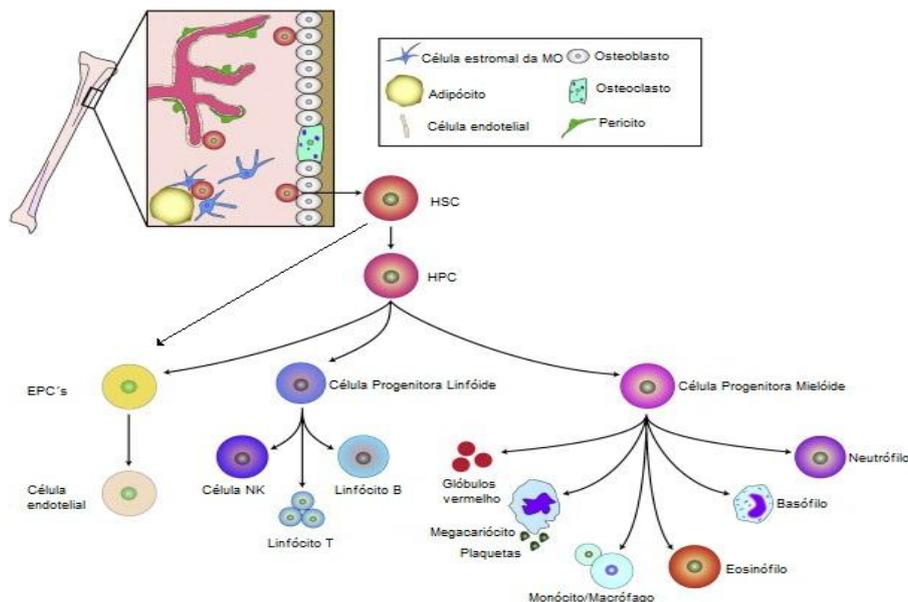
Deve-se ao trabalho desenvolvido por Asahara *et al.* em 1997, uma alteração nesta conceção pelo fato de terem conseguido isolar, a partir de uma amostra de sangue periférico humano, uma população de células mononucleares que demonstrou características antigénicas semelhantes a angioblastos embrionários, com a capacidade de *in vitro* se diferenciar em células endoteliais (EC's) e *in vivo* se expandir diferenciando-

se em endotélio com fenótipo maduro, tendo contribuído com cerca de 25% na revascularização de um tecido em isquemia aguda.

Pouco tempo após Shi *et al.* (1998) observaram que células da medula óssea foram importantes para a endotelização dos enxertos intra-aórticos de dacron em cães. Estes estudos sugerem, assim, a existência de uma população de células progenitoras mononucleares em circulação, acreditando-se serem provenientes da medula óssea, derivadas das células estaminais hematopoiéticas (HSC's) e com a capacidade para se diferenciarem em células endoteliais maduras. Ou, alternativamente, como foi sugerido por Yoder *et al.* (2007), originárias do próprio endotélio.

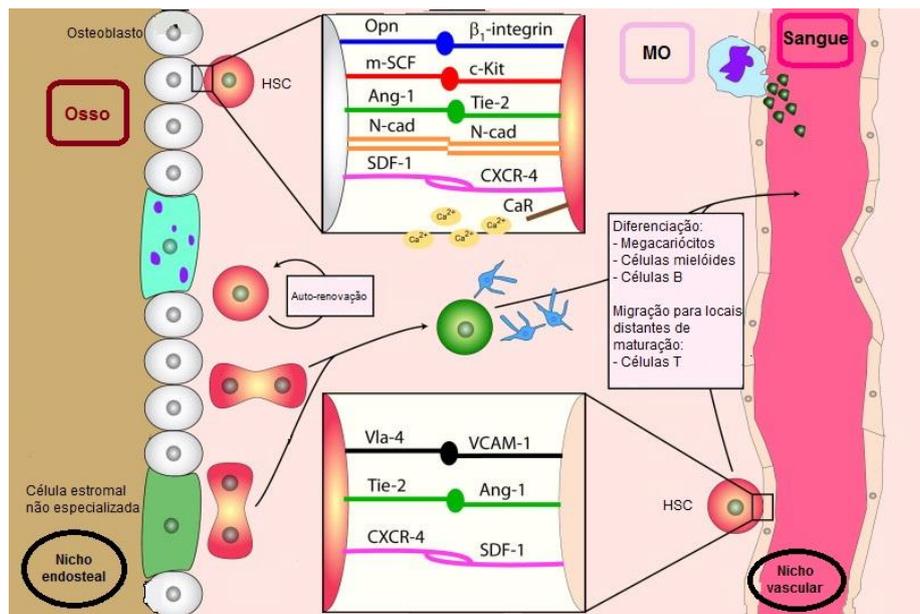
As EPC's compreendem aproximadamente 0,02% do total da medula óssea (comparada com 4% das células GR1<sup>+</sup> mielóides). As células GR1<sup>+</sup> mielóides residentes são uma população mielóide heterogênea, composta de monócitos, granulócitos e células dendríticas em estados imaturos, bem como células linfóides em estádios precoces de diferenciação, as quais sob determinados estímulos podem diferenciar-se em células mielóides e linfóides maduras (figura 1). A medula óssea adulta é conhecida por conter HSC's que se podem dividir em linhagens (Lin) do tipo positivo (Lin<sup>+</sup>) e negativo (Lin<sup>-</sup>), categorias estas no que diz respeito ao seu potencial de diferenciação em elementos figurados do sangue. As Lin<sup>-</sup> HSC's foi demonstrado conter uma população precursora de EPC's capazes de formar vasos sanguíneos (Bronte *et al.*, 2001; Kusmartsev e Gabrilovich, 2002; Kusmartsev e Gabrilovich, 2003).

Estudos pioneiros pré-clínicos e clínicos têm demonstrado que a introdução de células progenitoras endoteliais e hematopoiéticas derivadas da medula óssea podem restaurar a vascularização do tecido, após situações isquêmicas, nomeadamente em membros, retina e miocárdio. A identificação de mediadores celulares e de quimiocinas específicas, que facilitam o recrutamento seletivo de células estaminais derivadas da medula para órgãos específicos abre novos caminhos de pesquisa com o intuito de acelerar a vascularização do órgão e a sua regeneração. Na presença do fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) *in vitro*, ou após a transferência para destinatários saudáveis, ou mesmo com incorporação direta em vasos, verificou-se a diferenciação das EPC's, podendo mesmo ocorrer uma variação de tal forma eficiente do enxerto que pode chegar aos 95% em alguns leitos vasculares (Rafii e Lyden, 2003; Iwakura *et al.*, 2003).



**Figura 1.** Células estaminais adultas da medula óssea. A medula óssea alberga pelo menos dois tipos conhecidos de células estaminais adultas, as células estaminais mesenquimais (MSC's) e as células estaminais hematopoiéticas (HSC's), que dão origem às células progenitoras hematopoiéticas (HPC's), que por sua vez diferenciam-se em células progenitoras linfóides, células progenitoras mielóides, e provavelmente em EPC's. A origem precisa das EPC's ainda está em debate, uma vez que podem surgir diretamente das HSC's ou das HPC's. O microambiente da medula óssea é composto por células do estroma da medula óssea (que são fonte de SDF-1), adipócitos e células matriz do osso, os osteoblastos e os osteoclastos. Os vasos no interior da medula óssea, compostos de pericitos e endotélio, funcionam de modo a proporcionar uma barreira entre o sistema circulatório e o compartimento hematopoiético medular (MO, Medula óssea; Célula NK (*Natural Killer*)). Adaptado de Domen *et al.* (2006).

O compartimento da medula óssea compreende o nicho osteoblástico (ou endosteal), que fornece um microambiente para a manutenção das células estaminais, em que as HSC's residentes estão ancoradas à superfície endosteal por receptores cálcio sensíveis, e o nicho vascular que pode também ele albergar células estaminais e progenitoras endoteliais. Este microambiente da medula óssea muda de um estado de repouso para um estado ativado, com mobilização celular quando determinados fatores em circulação estão presentes e exercem a sua ação (fig. 2), incluindo o fator de crescimento vascular endotelial (*Vascular endothelial growth factor-VEGF*), fatores de crescimento dos fibroblastos (FGF's), GM-CSF, ou osteopontina (Opn), que vão por sua vez promover a mobilização celular hematopoiética e progenitora de ambos os nichos na circulação periférica (Wilson e Trumpp, 2006; Calzi *et al.*, 2010).



**Figura 2.** Medula óssea e nichos de células estaminais hematopoiéticas. A manutenção das HSC's, autorrenovação e diferenciação depende do microambiente em que residem. Esses microambientes especializados ou "nichos" incluem o nicho endosteal ou osteoblástico e o nicho vascular onde células estaminais e progenitoras residem perto do endotélio sinusoidal. HSC's podem estar ancoradas nos osteoblastos (células fusiformes, N-caderina<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>) e às células endoteliais, através de uma série de ligações, ligante/recetor (Opn/ $\beta_1$ -integrin; m-SCF/c-Kit; Ang-1/Tie-2; N-cad/N-cad; SDF-1/CXCR-4) e (VCAM-1/Vla-4; Ang-1/Tie2; SDF-1/CXCR-4) (Opn, osteopontina, m-SCF, fator de ligação de membrana de células estaminais; Ang-1, angiopoietina-1, N-cad, caderina neural; CXCR-4, quimiocina (motivo C-X-C) receptor 4; SDF-1, factor derivado da célula do estroma-1; CaR, receptor de cálcio; VLA-4, antígeno muito tardio 4; VCAM-1, molécula de adesão da célula vascular 1. Adaptado de Wilson e Trumpp (2006).

EPC's podem ser isoladas a partir de sangue periférico, de sangue do cordão umbilical, da medula óssea ou do fígado fetal. No entanto, constata-se que a definição desta população carece ainda de uma caracterização, o mesmo acontecendo com subpopulações de EPC's descritas em vários estudos. Assim, vários são os pontos controversos, dentro dos quais, qual a melhor forma de identificar estas células, como se processa a sua função de reparação tecidual e contribuição vascular, e finalmente, o que torna estas células tão especiais, qual o seu significado funcional quanto à sua utilização quando empregue como biomarcador preditivo de doença cardiovascular, visto que são vários os estudos que reportam uma correlação entre os fatores de risco cardiovascular e a redução da EPC's circulantes (Lyden *et al.*, 2001; Grant *et al.*, 2002; Peters *et al.*, 2005; Purhonen *et al.*, 2008).

As EPC's são caracterizadas pela co-expressão de antígenos celulares, quer hematopoiéticos, de células estaminais, quer de linhagem endotelial, bem como pela sua capacidade proliferativa, de migração e diferenciação em células com fenótipo endotelial maduras. Asahara *et al.* exploraram dois antígenos partilhados pelas células endoteliais e pelas HSC's de forma a isolar EPC's do sangue periférico, os quais são um grupo de glicofosfoproteínas como o grupamento de diferenciação, ou “*cluster of differentiation*” (CD)34, e o recetor do fator de crescimento endotelial vascular 2 [VEGF-R2, flk-1( *fetal liver kinase*) ou recetor com domínio quinase de inserção (KDR)] (Asahara *et al.*, 1997; Asahara *et al.*, 1999, Zengin *et al.*, 2006). Outros grupos de trabalho, no entanto, conseguiram identificar subpopulações de células estaminais em populações de células mononucleares CD34<sup>+</sup>/flk-1<sup>+</sup> que expressam antígenos determinantes adicionais de HSC's, incluindo por exemplo os epítomos CD117/c-kit (murino, humano), Sca-1 (*stem cell antigen-1*) (murino), CD133 (AC133, prometina) (humano) que são expressos por células hematopoiéticas mas não pelas células endoteliais maduras e recetor da angiopoeitina 2 (Tie-2) (Gehling *et al.*, 2000; Peichev *et al.*, 2000; Quirici *et al.*, 2001; Grant *et al.*, 2002; Kritzenberger e Wrobel, 2004; Shaw *et al.*, 2004; Zengin *et al.*, 2006; Matsumoto *et al.*, 2008).

A capacidade de modulação do fenótipo antigénico das células, em resposta às condições do ambiente, é algo comum a todas. Assim, as células endoteliais podem regular os níveis de VEGFR-2, Tie-2 (recetor da Ang-1, do tipo tirosina-quinase) em resposta ao stresse de cisalhamento (*shear stress*), e quando ativado um precursor, podem igualmente modular a expressão de CD133, CD34, ou outras proteínas de resposta às alterações a que são condicionadas. Pelo menos algumas HSC's são inicialmente CD34<sup>-</sup>, tornando-se subsequentemente CD34<sup>+</sup>. Isto descreve bem o conceito de plasticidade antigénica (Gallacher *et al.*, 2000; Gulati *et al.*, 2003; Schatteman *et al.*, 2007).

Um dos métodos de quantificação e análise de EPC's é a citometria de fluxo ou *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS), na qual a expressão de CD34 é essencial. No entanto, não há um consenso claro sobre que outros marcadores devem ser considerados dentro dos já mencionados, tendo em conta a raridade desta população celular no sangue periférico (100-200 células/ml). Recentemente tem sido sugerido que nem todas as células progenitoras são provenientes da medula óssea. O CD45 é

considerado um marcador panleucocitário (marcador de células hematopoiéticas), contudo, descobriu-se recentemente que tanto o CD45<sup>+</sup> como CD45<sup>-</sup> sca-1<sup>+</sup> lin<sup>-</sup> estão presentes na medula óssea de ratinhos. Outras moléculas de superfície, tal como o CD45 têm sido adicionados ao painel de marcadores por alguns investigadores, de maneira a aumentar a especificidade para este tipo de células, contudo não existe ainda uma uniformização e concordância nos resultados obtidos pelos diversos estudos que utilizam este marcador (Ingram *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2005; Kucia *et al.*, 2005; George *et al.*, 2006; Van Craenenbroeck *et al.*, 2008; Distler *et al.*, 2009; Schmidt-Lucke *et al.*, 2010).

A evolução constante nos protocolos de citometria de fluxo, a utilização de diversos anticorpos e protocolos de *gating* são fatores claros que complicam e tornam difícil a comparações com estudos mais antigos e mesmo entre estudos mais recentes.

A definição de EPC's passa também pela sua capacidade de proliferação e diferenciação em células endoteliais aderentes, adquirindo propriedades endoteliais e os seus marcadores (CD146<sup>+</sup>, CD31<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, fator von Willebrand (vWF<sup>+</sup>), Tie-1 e Tie-2 e caderina vascular endotelial e VEGFR-2<sup>+</sup>)(Rafii e Lyden, 2003; Urbich e Dimmeler, 2004; Timmermans *et al.*, 2009).

Uma outra população de células pode ser encontrada na circulação periférica tendo sido confundidas com EPC's, as células endoteliais circulantes (CEC's), que são reconhecidas como tendo um fenótipo endotelial maduro, uma vez que a sua proveniência se associa à sua separação do endotélio vascular/parede dos vasos, principalmente por trauma vascular e que podem contribuir de alguma forma para a neoangiogénese/vasculogénese. A diferença entre elas reside no fato das CEC's serem células diferenciadas maduras e terem uma capacidade de crescimento limitada. Estudos que utilizaram modelos com transplante de medula óssea mostraram que 95% das EC circulantes eram derivadas da parede dos vasos e apenas 5% provinham da medula EPC's (Lin *et al.*, 2000). Recentemente, outra linhagem celular não hematopoiética, CD45<sup>-</sup> e CD34<sup>+</sup>, foram identificadas como supostas EPC's, tendo por base a sua capacidade de formar colónias fenotípica e funcionalmente indistinguíveis das células endoteliais maduras (Case *et al.*, 2007).

Tendo em conta estas considerações, outro método utilizado na caracterização das EPC's baseia-se na avaliação do potencial para formar colónias com base em

culturas celulares, da quantificação do seu crescimento, capacidades funcionais que incluem proliferação, migração, adesão e apetência para vasculogénese *in vitro*. As células mononucleares do sangue (MNC) são isoladas por centrifugação em gradiente de densidade de Ficoll, o que permite a separação dos diversos elementos sanguíneos com diferente massa atómica ou molecular, tendo por base a sua densidade. Em seguida, estas células são colocadas em placas revestidas com fibronectina, para subsequente cultura e depois de 5-7 dias são observadas colónias aderentes onde emergem células fusiformes de um aglomerado de células redondas (unidades formadoras de colónias de células endoteliais, EC-CFU). Estas células aderentes exibem uma variedade de propriedades de células endoteliais, incluindo a absorção de lipoproteínas de baixa densidade acetiladas (AcLDL) e coloração com lectina de *Ulex europaeus* (UEA-1) que é específica para células endoteliais (Stephenson *et al.*, 1986; Asahara *et al.*, 1997; Hill *et al.*, 2003).

Os métodos *in vitro* podem ainda ser utilizados para identificar subconjuntos específicos de EPC's, uma vez que se acredita na existência de mais do que uma população de células mononucleares circulante no sangue periférico com funções na manutenção do endotélio vascular, conhecidas como células angiogénicas circulantes (CAC's). Expandir o número de células e modificar a função *ex vivo* pela exposição a determinados fatores ou modificando a expressão de genes, podem ser utilizados nestes métodos. Com base nos resultados destas técnicas foram descritos dois fenótipos distintos de EPC's, tornando-se essencial referir os três métodos de cultura mais comuns e o que os diferencia. O chamado ensaio de crescimento precoce (*early outgrowth assay*), o método relacionado com a análise de Hill e o ensaio de crescimento tardio (*late outgrowth assay*). Este último, contudo, evidencia que as células capazes de desenvolver a vasculogénese não são de origem hematopoiética (Kalka *et al.*, 2000; Vasa *et al.*, 2001; Hill *et al.*, 2003; Ingram *et al.*, 2004). De acrescentar que no último tipo de análise, as células são cultivadas em colagénio durante um período de tempo mais longo, de 14-21 dias, não expressam CD45 e não apresentam um potencial proliferativo clonal (Ingram *et al.*, 2004; Urbich e Dimmeler, 2004; Yoder *et al.*, 2007). No entanto, está estabelecido que as EC-CFUs são predominantemente compostas de monócitos e linfócitos em vez das verdadeiras CE's maduras que não têm capacidade real para formar vasos sanguíneos (Rohde *et al.*, 2007; Yoder *et al.*, 2009).

Esta caracterização *in vitro* também implica que essas células submetidas aos processos de cultura celular, muito provavelmente perdem algumas das suas características intrínsecas, quando retiradas do indivíduo e colocados em cultura (Hur *et al.*, 2004). Encontrar as células da medula óssea que derivam em endotélio *in vivo* é um grande desafio, pelo que autores sugerem a utilização de células geneticamente marcadas (Caballero *et al.*, 2007).

Estes achados de distintos e diferentes tipos de células deu também origem a alterações nos protocolos da citometria de fluxo, pelo que recentemente, a coloração para células CD45<sup>dim</sup>, CD34<sup>+</sup> e KDR<sup>+</sup> foi recomendado pela *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering* (ISHAGE), embora ainda não haja um claro consenso sobre um painel definido de marcadores para o reconhecimento de EPC's, uma vez que fracionalmente os marcadores de superfície expressos nestas células também estão presentes noutros tipos celulares (Schmidt-Lucke *et al.*, 2010).

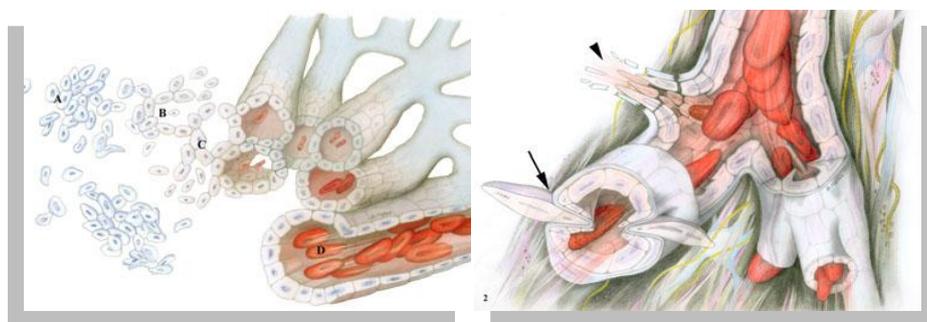
## 1.2 EPC's e o seu papel na vasculogénese e angiogénese

As EPC's deixam a medula óssea quando sujeitas a estimulação por diversas substâncias, entre as quais citocinas, sendo depois libertadas na circulação sanguínea. Isto, quando existe uma situação em que há lesão endotelial ou tecidual. Uma vez em circulação, estas células dirigem-se para os locais com danos e promovem a integridade vascular, mediando não só este mecanismo de reparação, mas levando a cabo a reperfusão de zonas isquémicas no interior dos tecidos (Schatteman *et al.*, 2007).

Após a descoberta das EPC's por Asahara *et al.* (1997), numerosos estudos demonstraram a sua contribuição nos processos de reparação, incluindo enfartes do miocárdio, isquémia de membros, cicatrização de feridas, aterosclerose, reparação endotelial endógena, e neovascularização de tumores em ratos e humanos (Asahara *et al.*, 1999; Dimmeler e Zeiher, 2004; Dimmeler *et al.*, 2010; Everaert *et al.*, 2010).

A neovascularização pós-natal era tida como resultado de uma remodelação a partir de células endoteliais totalmente diferenciadas, derivadas de vasos sanguíneos pré-existentes (Schaper *et al.*, 1971; Folkman e Shing, 1992; Folkman, 1995; Risau, 1995). Mas este paradigma, referido por Hertig (1935) como angiogénese, contrastou até há poucas décadas com a vasculogénese e veio a reconhecer uma nova interpretação.

Durante a embriogénese, os vasos sanguíneos podem desenvolver-se através de dois processos: pela diferenciação de precursores de células endoteliais (angioblastos), que se associam para formar vasos primitivos, processo este denominado de vasculogénese, e pela angiogénese em que novos capilares brotam de vasos pré-existentes (fig. 3). Este último mecanismo envolve a divisão celular endotelial, uma degradação seletiva da membrana basal e da matriz extracelular circundante, migração de células endoteliais, e a formação de uma estrutura tubular. Uma vez formados os vasos sanguíneos, as células endoteliais são submetidas a alterações específicas para gerar funcionalmente vasos distintos (Pardanaud *et al.*, 1989; Risau, 1995; Risau e Flamme, 1995).



**Figura 3.** (Imagem à direita) Vasculogénese, definida como sendo determinada pela diferenciação de células progenitoras endoteliais a partir de ilhas sanguíneas mesodérmicas e a sua organização num plexo vascular *de novo*. (A) ilhas sanguíneas (hemangioblastos), (B) hemoblastos, (C) angioblastos (D) eritrócitos no vaso. (Imagem à esquerda) Angiogénese é o crescimento de células endoteliais com formação de um tubo de células endoteliais (ponta da seta). Ou pelo mecanismo de intussuscepção, com divisão transluminal do vaso, invaginação e formação do pilar através do tecido intersticial (seta) (Kaßmeyer *et al.*, 2009).

A angiogénese encontra-se sujeita a um sistema de controlo complexo entre fatores proangiogénicos e antiangiogénicos. Nos adultos este processo tem de ter um equilíbrio fisiológico apertado entre os sinais estimuladores e os inibitórios no crescimento dos vasos sanguíneos. Em circunstâncias normais, a formação de novos vasos sanguíneos ocorre durante a cicatrização de feridas, regeneração de órgãos e no sistema reprodutor feminino durante os ciclos reprodutivos (ovulação, menstruação, implantação, gravidez) (Engerman *et al.*, 1967; Hobson e Denekamp, 1984).

Este mecanismo é igualmente considerado um fator muito importante em vários processos patológicos, uma vez que uma alteração local entre estímulos angiogénicos e outros inibitórios pode originar alterações no fenótipo angiogénico com o crescimento anormal da rede vascular nos tumores, na artrite reumatoide, na retinopatia diabética, e psoríase (Hanahan e Folkman, 1996).

Mas veio a descobrir-se ser passível a ocorrência de vasculogénese na fase adulta, iniciando-se com uma formação tipo *cluster*, ou “ilha de sangue”, que compreende angioblastos na sua periferia e células estaminais (*stem*) ou progenitoras hematopoiéticas (HSC’s) no centro (Flamme e Risau, 1992). Além desta associação espacial, os angioblastos e este tipo de células HSC’s compartilham determinantes antigénicos, incluindo a quinase fetal do fígado (fetal liver kinase) (Flk-1), e a Tie-2, que é um recetor tirosina quinase para a família da angiopoietina (ANG) [ANG-1, ANG-2, e ANG-3 (rato) / -4 (humana)] e CD34. Tendo em consideração este fato, é então concebível que estas células progenitoras possam derivar de um precursor comum (His W. 1900; Flamme e Risau, 1992; Weiss e Orkin, 1996; Asahara *et al.*, 1997).

Os estímulos propostos na literatura que resultam numa ativação da angiogénese e vasculogénese no adulto englobam a hipoxia e alterações em termos metabólicos que ocorrem com o aumento da atividade muscular, fatores mecânicos associados ao fluxo sanguíneo, como, por exemplo, o aumento do “*shear stress*” e a expressão de fatores de crescimento, como o VEGF, que tem a capacidade de ter uma ação direta ou indireta sob qualquer dos fatores referidos anteriormente (Adair *et al.*, 1990; Hudlicka, 1998; Gustafsson e Kraus, 2001; Brown e Hudlicka, 2003; Milkiewicz *et al.*, 2005).

Um dos fatores abordados nos diversos estudos sobre estas questões e provavelmente um dos mais importantes proangiogénicos trata-se de uma proteína inicialmente denominada de fator de permeabilidade vascular (*Vascular Permeability Factor* -VPF), mas tendo à *posteriori* ficado com a designação de fator de crescimento vascular endotelial (*Vascular endothelial growth factor*-VEGF). O VEGF é formado pela interação de duas proteínas, o que o torna num dímero proteico, e tem funções de sinalização com ação autócrina e parácrina, ativando recetores transmembranares principalmente expressos em células endoteliais. Esta proteína caracteriza-se por ser um dos membros da superfamília dos fatores de crescimento. A família VEGF atualmente é

composta por sete membros, (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F, e fator de crescimento da placenta (*Placental Growth Factor*- PGF-1). Todos os membros têm um domínio homólogo comum, sendo a região do núcleo constituído por um nó de cistina, com oito resíduos de cisteína, envolvido em pontes dissulfureto inter-e intramolecular (Neufeld *et al.*, 1999; Ortega *et al.*, 1999; Hiratsuka *et al.*, 2005; Shibuya, 2001).

O VEGF detém um papel reconhecido na vasculogénese, pelo que durante a embriogénese regula a densidade dos vasos sanguíneos e o tamanho, mas não desempenha nenhum papel na determinação dos padrões vasculares. Na vida pós-parto mantém a integridade das células endoteliais e é um potente mitógeno para as células endoteliais e sua migração (Breier, 2000; Barleon *et al.*, 1996).

O VEGF-A tem um papel mais ativo no processo angiogénico e por sua vez o VEGF-B, que foi descoberto em 1995, é mais abundantemente expresso no miocárdio adulto, músculo esquelético, e pâncreas. Em ratos embrionários há uma expressão elevada no coração em desenvolvimento, na gordura castanha, no músculo (incluindo a camada de músculo liso das artérias embrionárias), e na espinhal medula (Waltenberger *et al.*, 1994; Olofsson *et al.*, 1996; Neufeld *et al.*, 1999; Ortega *et al.*, 1999; Scrofani *et al.*, 2000).

Cada um dos fatores citados exerce o seu efeito angiogénico por acoplamento a recetores do tipo tirosina-quinase, podendo ser ativados um ou mais dos três recetores tirosina-quinase conhecidos para o VEGF (VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3). Além do domínio extracelular do VEGFR-1 (*Flt-1*, *fms like tyrosine-kinase receptor-1*) existem outros domínio, como, a região KDR conhecido como VEGFR-2/KDR/Flk-1, e o Flt-4 (VEGFR-3). Cada recetor tem sete domínios imunoglobulina *like* no domínio extracelular, uma única região transmembranar e uma sequência de consenso da tirosina quinase interrompida por um domínio de inserção da quinase (Kendall e Thomas.1993; Ortega *et al.*, 1999).

O VEGFR-1 localiza-se na superfície de células hematopoiéticas, macrófagos e monócitos, bem como no endotélio vascular, estando implicado na diferenciação de células endoteliais. Já o VEGFR-2 é encontrado em ambos os endotélios vascular e linfático estando envolvido na mitogénese em cultura de células endoteliais, enquanto o

VEGFR-3 se localiza, predominantemente, no endotélio linfático (Wiesmann *et al.*, 1997; Gille *et al.*, 2001; Bussolati *et al.*, 2001).

Fong *et al.* (1999) demonstraram que o aumento de diferenciação de hemangioblastos mesenquimais em ratos *knock-out* está associado a alterações primárias no VEGFR-1, enquanto que a formação de uma vasculatura desorganizada se deve a desarranjos fenotípicos secundários por causa da superlotação da população endotelial.

Os trabalhos desenvolvidos por Ziche *et al.* (1994, 1997) estabelecem a primeira linha de evidência que o óxido nítrico (NO) pode induzir angiogênese *in vivo*, sendo iniciada pela vasodilatação. Originalmente identificado como “fator de relaxamento derivado do endotélio”, o NO tem um efeito regulatório profundo sobre a vasculatura (Furchgott e Zawadzki, 1980). Para além da sua potente função vasodilatadora, o NO inibe a agregação das plaquetas, a adesão dos leucócitos, proliferação e migração do músculo liso, assegurando o seu papel ativo na manutenção da integridade vascular. A síntese do NO encontra-se sujeita a uma apertada regulação por parte de uma família de NO sintetases (NOS), que são isoenzimas que convertem a L-arginina a L-citrulina na presença de oxigénio molecular (Moncada, 1997).

O NO tem vindo a ser associado às fases iniciais da angiogênese em músculos estimulados, onde a inibição da atividade da óxido nítrico sintetase (NOS) aboliu o aumento na proliferação capilar (Hudlicka *et al.*, 2000).

A maioria dos estudos que envolvem crescimento de capilares e fatores envolvidos têm sido realizados em animais ou seres humanos submetidos a semanas de treino de resistência, que envolvem o recrutamento de fibras predominantemente oxidativas, isto é do tipo I. Em experiências recentes baseadas na prática de exercício explosivo de máxima intensidade, que recruta fibras glicolíticas, demonstraram também um aumento rápido no tamanho do leito capilar precedido por um aumento do VEGF (Van der Zee *et al.*, 1997; Suzuki, 2004; Waters *et al.*, 2004). Após a prática deste tipo de exercício físico foi verificado um aumento de capilares, inicialmente em torno das fibras glicolíticas (Waters *et al.*, 2004), que mostraram um maior nível de ARNm de VEGF (Birot *et al.*, 2003).

### 1.3 Ação do Exercício Físico sobre as EPC's versus Fibras Musculares Esqueléticas

O papel exercido pelas forças mecânicas no crescimento e remodelação dos vasos foi descrito há mais de 100 anos por Thoma (1893), que demonstrou em embriões de pinto a importância da velocidade do fluxo sanguíneo e/ou a pressão exercida e a forma como o tecido circundante se comportava em função do crescimento da vasculatura sob este efeito. Mais tarde, Clark (1918) e Clark e Clark (1939) demonstraram o papel que o fluxo sanguíneo tem no aumento e regressão de capilares durante o desenvolvimento de larvas de rã e no processo de cicatrização de feridas em orelhas de coelho. Apesar dos vastos trabalhos já realizados sobre a importância das forças mecânicas e dos mecanismos de transdução no crescimento dos vasos em tecidos adultos normais, estes carecem de estudos mais alargados tendo em vista o esclarecimento da proveniência das células utilizadas neste “*remodeling*” vascular.

Não obstante os avanços já alcançados no tratamento da disfunção endotelial e patologias subsequentemente associadas, António *et al.* (2010) sugerem que seria um ganho vantajoso desenvolver abordagens farmacológicas que promovam a reparação vascular, prevenindo igualmente a apoptose das células endoteliais, protegendo a estrutura e integridade funcional do endotélio. Assim, no contexto da promoção da saúde do sistema vascular seria sem dúvida muito benéfico identificar intervenções tais, que possam aumentar os níveis de EPC's circulantes e ao mesmo tempo melhorar a sua bioatividade.

Desta feita, tendo em conta estas recomendações, para além de terapias farmacológicas, uma intervenção não farmacológica como a prática de exercício físico pode ter um efeito fisiológico suficientemente potente para aumentar o número e função de EPC's circulantes. Este conceito tem por base resultados obtidos em programas de exercício na doença coronária e insuficiência cardíaca, constatando-se serem capazes de exercer um efeito positivo na melhoria da função endotelial em doentes com doença coronária e em que as EPC's pensa-se participarem na reparação de lesões endoteliais (Hambrecht *et al.*, 2000; Walsh *et al.*, 2003; Urbich e Dimmeler, 2004; Kawamoto e Losordo *et al.*, 2008).

A prática de exercício físico está na direta dependência dos músculos esquelético, especialmente aqueles que são recrutados para o exercício de endurance os quais precisam ser bem providos de O<sub>2</sub> e nutrientes. Os processos de adaptação em

resposta ao treino de endurance são bem conhecidos, sendo o mecanismo de neocapilarização essencial nesta adaptação. Durante muitos anos acreditou-se, como já referido, que o único mecanismo de crescimento de novos vasos sanguíneos em resposta ao exercício seria a angiogénese. Mas, nos últimos anos vários grupos de investigação foram capazes para mostrar os efeitos positivos das EPC's na formação e contribuição para o crescimento de novos vasos sanguíneos, tal como na sua presença no sangue periférico em resposta ao exercício físico (Adams *et al.*, 2004; Rehman *et al.*, 2003; Laufs *et al.*, 2004; Laufs *et al.*, 2005; Steiner *et al.*, 2005). Os estudos referidos utilizaram os mesmos métodos de análise, citometria de fluxo e culturas de células mononucleares para quantificar e determinar as EPCs pré e pós-exercício. Todavia os marcadores de superfície utilizados foram diferentes nos vários estudos apontados.

O músculo esquelético é composto por uma grande variedade de fibras com propriedades morfológicas, bioquímicas e funcionais específicas sendo, por isso, considerado como um tecido extremamente heterogéneo (Torgan e Daniels, 2001). Esta diversidade de fibras musculares resulta do facto de muitas das proteínas miofibrilares, como é o caso das miosinas, poderem ser expressas sob várias isoformas (Pette, 2002). No caso específico das isoformas das cadeias pesadas de miosina (MHCs), pelo facto de possuírem um local de ligação ao ATP surgem como determinantes nas propriedades funcionais do músculo no qual elas são expressas, sendo frequentemente utilizadas como marcadores para delinear o tipo de fibra muscular (Bigard *et al.*, 1996; Pette e Staron, 2000; Baldwin e Haddad, 2002). Por conseguinte, as fibras musculares comportam-se como estruturas dinâmicas capazes de modular o seu fenótipo em resposta a estímulos mecânicos, exigências funcionais, neuronais ou hormonais (Pette e Staron, 2000; Stevens *et al.*, 2004). No entanto, esta maleabilidade muscular de resposta a variados estímulos não é exclusiva das fibras musculares, surgindo também alterações nas estruturas que lhes estão associadas, nomeadamente nas terminações nervosas, nos capilares e no tecido conjuntivo (Smith *et al.*, 1999; Fluck e Hoppeler, 2003). Esta transformação das fibras musculares foi comprovada pelo nosso grupo de trabalho, quando ratos Wistar são sujeitos a um plano de treino aeróbio.

McArdle *et al.* (2008) abordaram uma das diferenças principais entre o exercício aeróbio e o de força, afirmando que no primeiro há necessidade de ser bombeado um grande volume de sangue sob pressão sanguínea relativamente baixa, já

no segundo caso estamos na presença de um volume de sangue relativamente baixo que necessita de ser bombeado sob elevada pressão relativa.

### 1.3.1 Mobilização e circulação no sangue periférico de EPC's

Como já referido, a libertação de EPC's na circulação sanguínea periférica a partir da medula óssea é um mecanismo regulado por uma série de fatores que envolvem não só os de crescimento e enzimas, bem como fatores de ligação e recetores de superfície. As células estaminais ao estarem localizadas num microambiente conhecido por "nicho" de células estaminais são mantidas num estado indiferenciado e quiescente, que em condições basais se caracteriza pela fase G0 do seu ciclo celular e estão em contacto com células-mãe do estroma da medula óssea (Heissig *et al.*, 2002). Situações indutoras de stresse fisiológico, tais como exercício físico e a hipóxia, conduzem à libertação de citocinas (Takahashi *et al.*, 1999) que induzem a ativação de proteases (elastase, catepsina G e MMP-9) que clivam a matrix extracelular, que é responsável pela adesão das EPC's sobre as células estromais. Ao ser quebrada esta interação as células estaminais deixam a medula óssea (Heissig *et al.*, 2002; Urbich e Dimmeler, 2004).

Diversos processos induzidos pelo exercício têm acção sobre a formação, mobilização e capacidade regenerativa das EPC's e CAC's (Células Angiogénicas Circulantes), aumentando a presença destas células no sangue, quer em ratos quer em humanos (Laufs *et al.*, 2004). Durante a prática de exercício físico há em resultado das diversas forças mecânicas um aumento da tensão de cisalhamento nos vasos, que se vai traduzir num aumento do VEGF e do NO. A produção do NO pelas células endoteliais aumenta via um aumento na fosforilação pós-transcricional da sintetase do óxido nítrico endotelial (eNOS), que irá ativar a MMP-9 que cliva a ligação de membrana Kit ligante (mKitL). Este último liga-se a recetores cKit das EPC's, permitindo assim que estas células migrem para a zona vascular da medula óssea e passem para a corrente sanguínea, seguindo um gradiente de concentração do SDF-1 $\alpha$ . Fatores angiogénicos, tais como o VEGF (ligando para o KDR) e o SDF-1 $\alpha$  (ligando do CXCR4), são expressos por tecidos em hipóxia, direcionando assim as EPC's para a parede vascular danificada e onde podem integrar em termos celulares a camada danificada. Aumento

da capacidade anti-oxidante vai também impedir que o NO seja sujeito a ações de eliminação (Papapetropoulos *et al.*, 1997; Balligand *et al.*, 2009).

A população de CAC que são derivadas de células monócitos-macrófagos, ajudam a manter a homeostase vascular através da produção de citocinas angiogénicas com capacidade parácrina e autócrina. A sua função migratória, bem como a sua capacidade de produzir fatores angiogénicos, foi demonstrada no exercício (Balligand *et al.*, 2009; Van Craenenbroeck *et al.*, 2008; Van Craenenbroeck e Conraads, 2010; Conraads *et al.*, 2012).

Também o fator de estimulação das colónias de granulócitos (GM-CSF), juntamente com o VEGF e o SDF-1 têm um importante papel na ativação do mecanismo via MMP-9 tornando-se precursores da biossíntese, secreção e posterior mobilização das EPC's medulares, mediando assim a reendotelização pela estimulação dos seus respetivos recetores: CXCR4 e VEGFR-2 (Moore *et al.*, 2001; Heeschen *et al.*, 2003; Bahlmann *et al.*, 2004).

No estudo desenvolvido por Adams *et al.* (2004) o número de EPC's aumentou apenas em doentes com isquémia do miocárdio submetidos a exercício, por 24 horas e 48 horas pós exercício e não em doentes sem isquémia induzida ou em controlos saudáveis. Estão documentados aumentos no número de EPC's, analisadas por *Fluorescence-activated cell sorting* - FACS e CAC's, quantificadas por culturas celulares, 10 min pós-exercício (Rehman *et al.*, 2004).

Uma vez que alguns estudos investigaram o efeito de uma simples sessão de exercícios em tapete rolante ou bicicleta ergométrica sobre a mobilização de EPC's, seria necessário verificar se um período de tempo mais longo de exercício também pode influenciar o número e função das EPC's. Um dos primeiros estudos a abordar esta questão foi o de Laufs *et al.* (2004), feito em modelos animais, bem como em humanos com doença arterial coronária estável, tendo mostrado claramente que tanto nos animais como nos humanos uma intervenção de treino controlado num período de 3 ou 4 semanas permitiu um aumento significativo das EPC's circulantes e na redução da taxa de apoptose, quando comparados com valores doseados antes de realizarem o programa de treino.

Outro estudo avaliou os efeitos da corrida em indivíduos saudáveis, com diferentes intensidades e duração do exercício. Numa intensidade igual à velocidade no

limiar anaeróbio individual, durante 30 minutos (~82% VO<sub>2</sub>máx), assim como numa corrida a velocidade moderada, houve aumento do número de EPC's na circulação. O aumento máximo do número de EPC's circulantes foi observado nos testes de corrida intensa, após 10-30 minutos da corrida. Por outro lado o teste de corrida de intensidade moderada durante 10 minutos não se traduziu em alterações na contagem de EPC's (Laufs *et al.*, 2005).

Encontra-se ainda reportado que em situações de exercício extenuante e de elevada intensidade, como por exemplo no estudo que abrangeu atletas participantes saudáveis na maratona em "*Spartathlon*" (corrida de ultra distância) bem treinados, não havia aumento de EPC's em repouso em comparação com indivíduos normais. No entanto, observou-se um aumento marcado nas EPC's no fim da corrida e até às 48 h pós maratona. Depois deste período os valores foram normalizando, apesar de não ter sido avaliado quanto tempo na realidade demorou até o número de EPC's retornar aos valores de base. Este mecanismo desencadeado pelo exercício, segundo os investigadores, parece ser devido à indução de fatores angiogénicos provocado pelos tecidos em hipóxia, recrutando as células da medula óssea a fim de reparar o endotélio disfuncional. Um achado interessante do estudo foi a constatação de que as colónias de células endoteliais, derivadas das EPC's mobilizadas, continham células significativamente maiores do que as obtidas nos controles e nos atletas antes da corrida e 48 horas após a corrida (Goussetis *et al.*, 2009).

### 1.3.2 Migração e Diferenciação de EPC's

Os mecanismos que estão envolvidos no recrutamento das EPC's para os locais de neovascularização e a sua diferenciação, encontram-se ainda em estudo. Parece que na sua mobilização, recrutamento e incorporação estão envolvidos de forma coordenada uma sequência de eventos, que engloba etapas iniciais de adesão das EPC's às células endoteliais através da expressão de  $\beta_2$ -integrinas e quimiotaxia, transmigração e finalmente diferenciação em células endoteliais (Urbich e Dimmeler, 2004; Chavakis *et al.*, 2005, Yoder *et al.*, 2009).

Nas situações em que há um aumento de fluxo sanguíneo, este promove o aumento do "*shear stress*" a nível das células endoteliais que elevam a produção de

NO, que causa vasodilatação, angiogénese, inibição da agregação plaquetar e adesão de monócitos e leucócitos ao endotélio, bem como inibição do crescimento da musculatura lisa (Aicher *et al.*, 2003).

A hipóxia, ao funcionar como um dos estímulos que sinaliza o início da angiogénese no músculo, vai desencadear um aumento do fator induzido pela hipóxia (HIF-1 $\alpha$ ), que por sua vez estimula a produção de VEGF e adesão das EPC's (Adams *et al.*, 2004). Este mecanismo advém em consequência do desequilíbrio inicial da PO<sub>2</sub>, provocado pelo aumento do seu consumo durante o exercício, estimulando a expressão de VEGF com consequente proliferação de células endoteliais e formação de novos vasos sanguíneos.

Alguns estudos apontam para que várias substâncias como os estrogénios, e os inibidores da HMG-CoA redutase (estatinas) aumentaram o número e atividade funcional das EPCs *in vitro*, em ratos e doentes com doença coronária estável (Llevadot *et al.*, 2001; Dimmeler *et al.*, 2001; Iwakura *et al.*, 2003; Strehlow *et al.*, 2003; Loomans *et al.*, 2004; Urbich e Dimmeler, 2005).

Importa referir que em estudos com exercício aeróbio em doentes com insuficiência cardíaca crónica constatou-se um aumento agudo na migração de CAC, após uma sessão de exercícios simples, o que parece depois diminuir quando é reposto o reparo da função vascular. Estes resultados permitem concluir que o exercício detém a capacidade de corrigir também a migração de CAC, para além de todas as adaptações que desencadeia (Erbs *et al.*, 2010; Van Craenenbroeck *et al.*, 2010).

**CAPÍTULO II**  
**OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

O músculo esquelético é uma estrutura dinâmica, com elevada plasticidade e papel endócrino, para além de possuir a capacidade de alterar as suas características funcionais, morfológicas e metabólicas em função das exigências impostas. Assim sendo, todas estas propriedades são condicionadas pelo exercício físico ao determinar versatilidade na resposta e adaptação deste tecido a este estímulo.

O exercício físico aeróbio induz respostas adaptativas significativas no organismo quer a nível músculo-esquelético e cardiorrespiratório, quer ajustando modificações em termos de composição corporal. Considerando as alterações a nível do músculo esquelético, estas relacionam-se com o conteúdo mitocondrial, com as alterações enzimáticas, tamanho das fibras musculares e níveis de mioglobina, promovendo uma transformação das fibras musculares esqueléticas ao desenvolver um aumento das fibras tipo I, ao mesmo tempo que se espera que ocorra um aumento do número de capilares, melhorando assim a irrigação do músculo *per si*.

Sob esta perspetiva, pareceu-nos assim, justificado avaliar e ao mesmo tempo esclarecer quais os mecanismos envolvidos nas mudanças vasculares a nível do músculo esquelético. Assim, na tentativa de um melhor esclarecimento de alguns dos fenómenos mencionados, o objetivo deste trabalho foi averiguar quais os mecanismos envolvidos no processo de “revascularização” induzidos pelo exercício aeróbio.

Deste modo, propusemo-nos em ratos Wistar:

- 1- Avaliar o número de EPC's circulantes no sangue periférico no grupo controlo e no grupo sujeito a um protocolo de exercício físico aeróbio.
- 2- Procurar uma eventual relação entre a prática de exercício aeróbio e o número de EPC's nos seus vários estadios de diferenciação.
- 3- Determinar e confirmar, a nível do músculo solear o aumento do número de capilares, após oito semanas de exercício aeróbio, relacionando-os com as fibras musculares.
- 4- Confirmar uma possível relação entre a mobilização dos tipos de EPC's e o aumento da rede sanguínea no músculo solear.

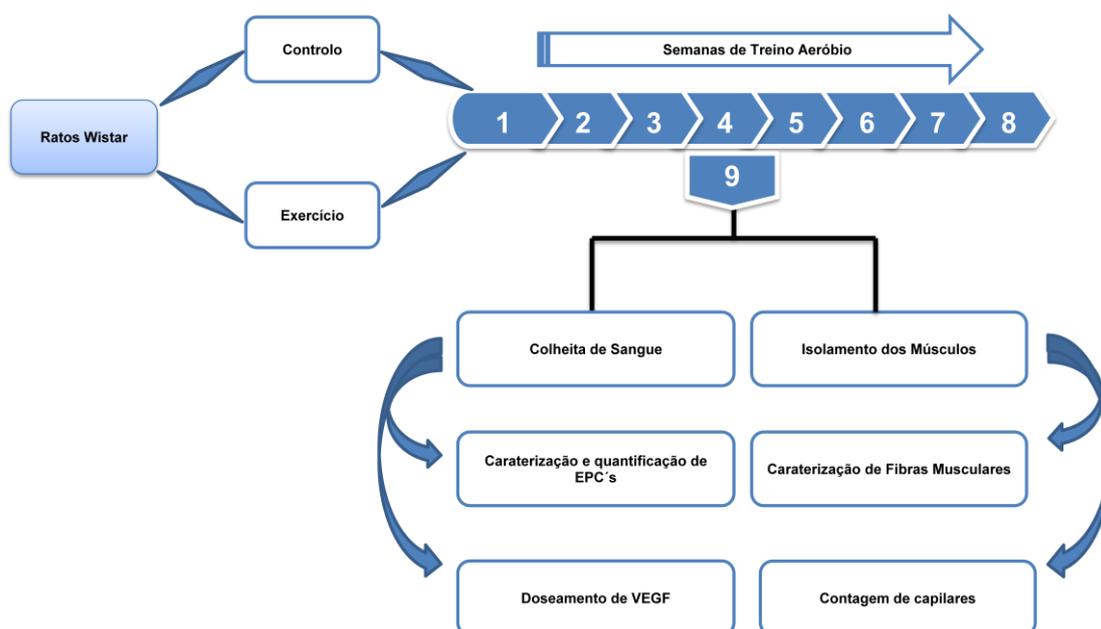
**CAPÍTULO III**  
**MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Desenho do Estudo

Para atingir os objetivos projetados no estudo foram utilizados ratos Wistar machos, sujeitos a treino aeróbio durante oito semanas, divididos em dois grupos, sendo um deles o grupo controlo.

Um esquema geral do trabalho desenvolvido pode ser analisado no organograma que se segue.



**Figura 4.** Organograma experimental.

#### 3.2 Caracterização dos animais em estudo

No estudo foram utilizados ratos Wistar adultos, machos, com dez semanas de idade e com uma massa corporal inicial que variou entre os 200 e os 250 g. Foram divididos aleatoriamente, num grupo controlo e num segundo grupo que foi sujeito a treino aeróbio, durante um período de oito semanas.

Os animais provieram do Biotério Central da Universidade de Coimbra e transportados para um biotério de manutenção sediado no Departamento de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Os animais foram mantidos dois a três por gaiola, com comida sintética padronizada e água *ad libitum*, com condições de controladas de temperatura ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e humidade ( $50 \pm 10\%$ ) e ciclos de 12 horas luz/escuro de acordo com os parâmetros estabelecidos para a espécie em questão.

Os animais antes do início das experiências, aquando da sua chegada ao laboratório, são aclimatizados durante cerca de uma semana.

A massa corporal dos animais foi avaliada antes do início do protocolo de treino e semanalmente com recurso a uma balança digital Kern & Sohn GmbH, Germany, modelo CB 6 KI, sempre no mesmo horário e antes da realização de exercício físico.

### 3.3 Protocolo de treino dos animais

O protocolo de treino de exercício aeróbio foi desenvolvido num tapete rolante ajustado para os animais em estudo.

O equipamento utilizado constou de um tapete rolante modelo LE 8700 Treadmill Control, (Panlab SL), que estava ligada a um processador informático que registava todos os dados do treino (tempo de treino, velocidade do tapete rolante, número de choques aplicados e duração do somatório de choques no intervalo de treino por rato) (fig. 5).



**Figura 5.** Tapete rolante de treino dos animais (Fonte: autora).

Todos os ratos, quer os em regime de treino aeróbio quer os do grupo controlo, tiveram uma sessão inicial de habituação que constou de uma caminhada durante 10 minutos a  $10 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Os ratos do grupo controlo foram sujeitos a um plano de exercício uma vez por semana, que consistiu numa caminhada no tapete durante um período de oito minutos a uma velocidade de  $6 \text{ cm.s}^{-1}$ , durante as oito semanas, de forma a estarem sob as mesmas condições psico-motoras que os restantes animais em treino aeróbio, permitindo deste modo que os resultados sejam corretamente comparados, com a mínima interferência do sistema nervoso central.

Em relação ao protocolo de treino, este foi colocado em prática de acordo com o exposto na tabela I. O grupo sujeito ao protocolo de treino efetuou corrida aeróbia durante cinco dias úteis da semana, ao longo de oito semanas. Este plano obedeceu a um tipo de treino gradual com aumento da velocidade da corrida, tempos de corrida e inclinação do tapete rolante, sendo que a inclinação do tapete é introduzida apenas após a 6ª semana de treino.

**Tabela 1.** Protocolo de treino aeróbio dos animais ao longo de oito semanas.

Semana de treino	Velocidade máxima ( $\text{cm.s}^{-1}$ )	Tempo à velocidade máxima (minutos)	Tempo da sessão (minutos)	Inclinação do tapete rolante (%)
1	15	10	12	0
2	20	12	14	0
3	35	15	20	0
4	50	5	35	0
5	50	10	40	0
6	54	30	50	15
7	54	30	52	15
8	54	30	52	15

Findo o protocolo e de maneira a avaliar o efeito funcional do treino a nível da condição física dos ratos, como descrito por Eliakim *et al.* (1997), foi realizado um teste máximo de resistência *versus* velocidade, colocado em prática a todos ratos em estudo. Este teste consistiu num aquecimento inicial de quatro minutos de adaptação, com uma inclinação de 5%, depois durante mais 4 minutos a uma velocidade de  $15 \text{ cm.s}^{-1}$ . A velocidade aumentou a um ritmo de  $6 \text{ cm.s}^{-1}$  a cada 4 minutos, sendo o teste dado por terminado quando o rato deu sinais de exaustão.

### 3.4 Isolamento e caracterização das EPC's no sangue periférico total

A caracterização das EPC's presentes no sangue total periférico baseou-se na quantificação e análise por citometria de fluxo, tendo em conta a expressão de determinados marcadores de superfície que foram expostos a anticorpos conjugados com fluorocromos.

#### 3.4.1 Colheitas de sangue

Para o procedimento de colheita de sangue, os ratos foram anestesiados com cetamina por via intraperitoneal (dose de  $2 \text{ ml.Kg}^{-1}$ ). O sangue foi colhido da veia jugular (agulha Terumo, NEOLUS, Bélgica; 21G x 1'', 0,8 x 25), sendo o anticoagulante (100  $\mu\text{l}$  de EDTA a 6%) colocado previamente na seringa. Seguidamente, o sangue (2 ml) foi cuidadosamente transferido para tubos de polipropileno para posterior análise.

As colheitas foram efetuadas uma semana após o término do protocolo de treino.

#### 3.4.2 Preparação das amostras para análise por citometria de fluxo

A partir de uma amostra de sangue periférico total recolhido em EDTA, fez-se um hemograma e preparou-se um tubo para cada marcação.

No sangue periférico as EPC's estão pouco representadas, pelo que as amostras devem ser processada até duas horas após a colheita.

Foram retirados 500 µl de amostra e colocados a incubar com os anticorpos conjugados com fluorocromos, de forma a fazer a marcação de superfície, à temperatura ambiente ( $T_{amb}$ ), protegidos da luz durante 15 minutos. Todos os anticorpos [anti-CD34 FITC (Isocianato de fluoresceína) (Antibodies-online.com), anti-CD133 FITC (Millipore), anti-CD146 FITC (Antibodies-online.com), anti-KDR PE (Ficoeritrina) (BD Biosciences)] foram adicionados na quantidade de 1 µl, com exceção do anti-CD45 PerCP-Cy5.5 (Clorofila Peridina conjugada com Cianina) (BD Biosciences) do qual apenas se utilizou 0,5 µl.

Após a incubação com os anticorpos, foram adicionados 4,5 mL de tampão de lise para eritrócitos (Facs Lysing, BD Biosciences) (1:10). As amostras foram novamente incubadas, depois de homogeneizadas, 15 minutos no escuro com agitação suave à  $T_{amb}$ .

Seguidamente, as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 1500 rpm (Kubota 5930) a 20°C. Depois deste procedimento as amostras são devidamente decantadas e ao *pellet* foi adicionado 2 ml de PBS (Tampão fosfato-salino ou *phosphate buffered saline*) (1:10) (GIBCO 10x, pH 7,4). Após agitação em vortex foram novamente centrifugadas (5 minutos a 1500 rpm a 20°C) e este processo repetido por mais uma vez. Posteriormente à última lavagem e decantação, os tubos foram ressuspendidos com 250 µl de PBS e as amostras passadas pelo citómetro.

### 3.4.3 Análise por citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica na qual são medidas características físicas e/ou químicas de células ou de outras partículas (Shapiro, 2003).

A suspensão celular a analisar é injetada no citómetro, dirigindo-se para o núcleo central contido na câmara de fluxo. Nesta câmara existe um líquido de envolvimento (*Sheath fluid*) que não se mistura com a suspensão celular. No núcleo central as células formam um fluxo laminar que mantém, hidrodinamicamente, as células alinhadas de forma que passem uma a uma em frente ao feixe luminoso.

A interação das células ou das partículas com o feixe luminoso origina sinais que vão ser alcançados por detetores adequados. A informação recolhida pode agrupar-se em dois tipos fundamentais: a que é originada pela dispersão da luz e a que está relacionada com a emissão de luz por fluorocromos adicionados à célula ou partícula, ao serem excitados pela fonte luminosa. A dispersão da luz é um processo físico em que uma célula interage com a luz incidente e muda a direção da luz. Dentro das características celulares que contribuem para a dispersão da luz estão o tamanho da célula, a membrana celular, o núcleo e o material granular do interior da célula. A luz não se dispersa de igual forma em todas as direções, avaliando-se que luz que dispersa para a frente (“*forward scatter*”, FSC) e uma medida do tamanho celular, enquanto a luz que é dispersa em ângulo recto (“*side scatter*”, SSC) depende da complexidade celular (Orfao e Buitrago, 1995).

A fluorescência é indicada pela emissão de energia luminosa pelos compostos fluorescentes que se encontram ligados aos anticorpos monoclonais. Estes compostos absorvem energia, fazendo com que um eletrão passe a um nível energético superior. No momento em que esse eletrão regressa ao seu estado de repouso, emite um fóton e liberta energia. Os sinais são depois convertidos em dados digitais para serem representados através de gráficos monoparamétricos e biparamétricos (Orfão e Buitrago, 1995).

Diferentes protocolos técnicos de citometria de fluxo têm sido recomendados para identificar e caracterizar EPC's, alguns recomendam coloração das EPC's diretamente a partir do sangue total após a lise de eritrócitos, enquanto outros usam sangue periférico após centrifugação por gradiente de densidade onde posteriormente é selecionada a camada de células mononucleares, mas este último foi recentemente associado com uma perda de EPC's (Ingram *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2005; George *et al.*, 2006; Van Craenenbroeck *et al.*, 2008 (1); Distler *et al.*, 2009; Schmidt-Lucke *et al.*, 2010)

A aquisição e análise das amostras foram realizadas num citómetro de fluxo FACS-Canto II (três lasers e oito cores de configuração), usando um detetor de dispersão para tamanho (FSC-*forward scatter*) e complexidade interna (SSC-*side scatter*) e um detetor de emissão de fluorescência. Cada 1.000.000 totais de eventos foram analisados através de *software* FACSDiva 6.1.2 (BD Biosciences).

A compensação de fluorescência é feita automaticamente e verificada de forma periódica através do uso de *CompBeads* (BD Biosciences). Os ajustes de amplificação para FSC e SSC foram usados no modo linear, para os canais de fluorescência foi usado o modo logarítmico e posteriormente, pela análise pelo *software* Infinicyt 1,5 cytognos (versão 1,5 Salamanca, Espanha) foi convertida para o modo analógico.

A população de linfócitos foi utilizada como controle interno de referência.

### 3.5 Análise do tecido muscular esquelético

A remoção dos tecidos, nomeadamente do *Soleus*, para análise histológica, imunohistoquímica e biologia molecular foi realizada após as colheitas de sangue e sacrifício dos animais por sobredose de anestésico (cetamina).

Uma porção dos tecidos musculares foi colocada em azoto líquido (destinada às experiências de biologia molecular), que serviu para a histologia simples e enzimática.

#### 3.5.1 Análise histológica para caracterização das fibras musculares esqueléticas

O fragmento muscular foi cuidadosamente alinhado, fixado com gele tecidular (*Jung, Tissue Freezing Medium®*, *LeicaMicrosystems, Alemanha*) num suporte de cortiça, mergulhado em isopentano durante aproximadamente 10 segundos e em seguida congelado em azoto líquido a  $-170^{\circ}\text{C}$ .

O bloco congelado, que preserva a atividade enzimática do tecido, foi colocado no criostato (temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ ) para realização de cortes com cerca de 5-10  $\mu\text{m}$ , e em seguida as fatias foram colocadas nas lâminas para o processamento das técnicas de coloração com Hematoxilina-Eosina.

As preparações depois de montadas foram sujeitas a observação por microscopia ótica e fotografadas para avaliação da estrutura morfológica dos tecidos, integridade e alterações das fibras induzidas pelo exercício físico.

Todas as técnicas e colorações histoquímicas mencionadas são segundo os protocolos descritos por Dubowitz e Sewry (2007).

Para avaliação dos vários tipos de fibras musculares podem ser usadas várias metodologias, destacando-se as colorações baseadas na reação da Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Redutase (NADH-Redutase) e da atividade da enzima Adenosina Trifosfatase miofibrilhar (ATP-ase). Decidimos optar pelo método da reação da ATP-ase em que as amostras dos tecidos foram pré-incubadas a diferentes valores de pH (9,4 e 4,3) de acordo com o método desenvolvido por Guth e Samaha (1969). A enzima ATP-ase presente nas miofibrilhas apresenta um comportamento histoquímico variável e dependente do grau de inibição provocado pelos diferentes pH's dos meios de incubação onde se processa a reação, pelo que é tendo em conta este comportamento que este método nos permite diferenciar os tipos de fibras musculares, com vista à determinação das suas características funcionais e metabólicas.

O princípio em que assenta esta técnica diz respeito à capacidade que a enzima tem em remover o fosfato terminal ao ATP, que posteriormente se vai combinar com o cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) da solução de incubação, formando fosfato de  $\text{Ca}^{2+}$  insolúvel. O  $\text{Ca}^{2+}$  é substituído por cobalto, por remoção com sulfato de cobalto, que mancha a zona de atividade da enzima a preto.

Assim, os diferentes tipos de fibras musculares ao terem na sua constituição moléculas de miosina um pouco diferentes, isto é, com quantidades diferentes de ATP, vão reagir de forma diferente segundo o pH da solução em que a reação histoquímica se desenvolve para a ATPase. Se a reação for a um pH básico (9,4) as fibras do tipo II, as reativas, vão demonstrar-se segundo uma coloração castanho-escuro e as do tipo I, não reativas, ficam bege claro ou brancas. Se a reação decorrer a um pH ácido (4,3) as fibras tipo I demonstram-se com uma tonalidade escura e as tipo II clara.

### 3.5.2 Densidade capilar e contagem da relação capilar/fibra no músculo *Soleus*

A caracterização e estudo da organização vascular por contagem do número de capilares versus número de fibras musculares, nas amostras de tecido muscular do solear, foi efetuada por coloração com fosfatase alcalina utilizando um indoxil-tetrazólio, em secções de tecido congeladas numa orientação transversal e com contraste com eosina. Este é um método de deteção de células endoteliais de capilares, como descrito por Takeshita *et al.* (1994). A contagem dos capilares (número médio de

capilares/mm<sup>2</sup>) foi realizada em campos de imagem selecionados aleatoriamente. Os resultados foram expressos pela relação capilar/fibra muscular (C: F).

### 3.6 Doseamento do VEGF

Antes do sacrifício dos animais procedeu-se à colheita de cerca de 5ml de sangue em seringa com anticoagulante (250 µl de EDTA a 6%), que serviu para o doseamento do VEGF.

O doseamento do VEGF foi realizado com recurso a um *kit* comercial “Quantikine Rat VEGF” (R&D Systems), que se baseia no método ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Este método emprega a técnica quantitativa de imunoensaio enzimático tipo sanduíche, em que um anticorpo monoclonal foi pré-revestido numa microplaca. A quantificação é feita por imunoabsorvência, através da ligação do VEGF presente no plasma de rato com o anticorpo monoclonal que está imobilizado na microplaca (Engvall e Perlman, 1971).

As amostras de sangue foram centrifugadas a 1500 g a 4°C de forma separar os componentes do sangue e obtermos o plasma. Todos os reagentes e amostras devem estar à T<sub>amb</sub>.

Colocou-se inicialmente em cada poço da placa 50 µL do diluente de ensaio (RD1-41), que era uma solução de proteína tamponada com conservantes e depois adicionou-se por poço 50 µL da solução padrão (*Rat VEGF Standard*), controlo (*Rat VEGF Control*), amostras, em duplicado, sendo completados um total de 96 poços.

Foi a incubar durante 2 horas à T<sub>amb</sub> numa microplaca horizontal orbital shaker (0,12 órbita " ), fixado em 500 ± 50 rpm. O VEGF presente nas soluções é ligado pelo anticorpo que se encontra imobilizado na placa.

Depois foram aspirados cada um dos poços e foram a lavar por cinco vezes, de forma a remover quaisquer substâncias não ligadas.

Em seguida foram adicionados a cada poço 100 µL da solução de *Rat VEGF Conjugate*, que continha um anticorpo policlonal conjugado com peroxidase de rábano, fazendo-se depois uma incubação durante mais 1 hora à T<sub>amb</sub>, no agitador. Foi repetido o processo de aspiração e número de lavagens anteriormente referido, de forma a remover qualquer reagente anticorpo-enzima não ligado.

Adicionou-se em seguida 100  $\mu$ L da solução substrato (reagentes de cor com peróxido de hidrogénio estabilizado e cromogénio estabilizado (tetrametilbenzidina) em volumes iguais) a cada poço, que produz uma reação com a enzima presente que origina uma solução de cor azul que se torna amarela quando ocorre a paragem da reação por adição da solução STOP. Assim, incubou na bancada por 30 minutos à  $T_{amb}$  protegida da luz e depois foram adicionados 100  $\mu$ L da solução STOP (solução diluída de ácido clorídrico) a cada poço com agitação suave da placa para assegurar a mistura completa.

Determinou-se então a densidade óptica a 450 nm, com a correção do comprimento de onda para 540 nm ou 570 nm.

A intensidade da cor medida é proporcional à quantidade de VEGF ligada no passo inicial. Os valores da amostra foram então lidos na curva padrão.

### 3.7 Análise Estatística

A análise comparativa entre variáveis foi realizada através do teste de Mann-Whitney para comparação entre duas variáveis relacionadas. O teste foi escolhido tendo em consideração o número da amostra e a sua distribuição de normalidade, o que obriga a uma análise não-paramétrica.

Os resultados apresentam-se expressos em médias e erro-padrão da média. Foram considerados significativos os valores comparados ao nível de significância de  $p \leq 0,05$ .

Para a realização dos testes foi utilizado o programa InStat versão 3.1a para Macintosh.

## **CAPÍTULO IV**

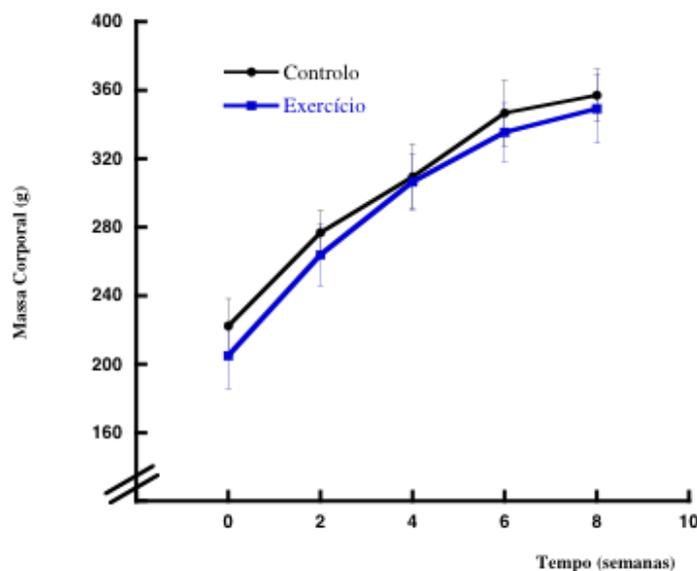
### **RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

Os dados obtidos das diversas técnicas experimentais utilizadas neste estudo serão apresentados sob a forma gráfica com a respetiva apresentação do seu significado.

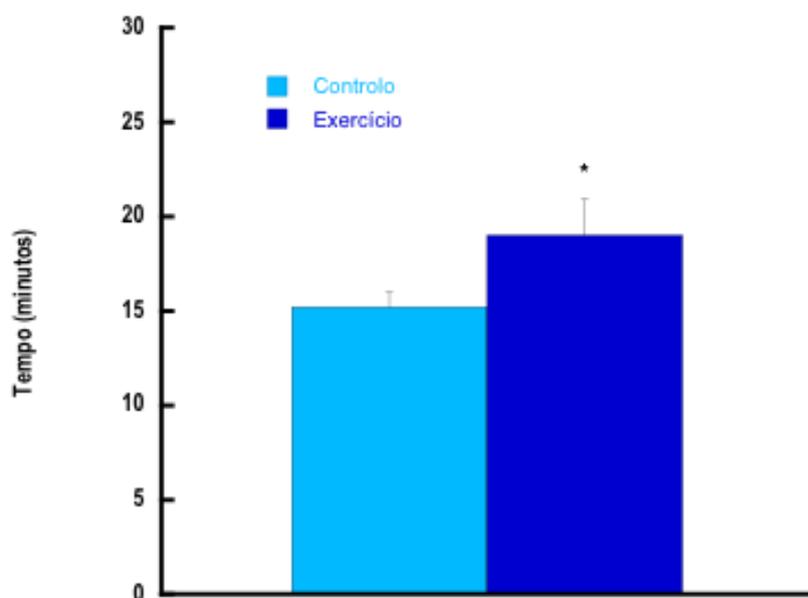
### 4.1 Caracterização da amostra

O rato é um animal comumente usado para medir e avaliar as respostas anatómicas, metabólicas e até moleculares quando sujeito a um plano de treino físico, dado as semelhanças das suas características em termos de parâmetros fisiológico-moleculares e mesmo anatómicos relativamente às do ser humano. Desta forma, tal como descrito anteriormente na secção de materiais e métodos o estudo presente foi desenvolvido em ratos Wistar machos, tendo como base um treino aeróbio com a duração de oito semanas. No início das experiências e no início de cada semana até ao completar do estudo foi avaliada a massa corporal dos animais. O gráfico 1 reporta o aumento progressivo da massa corporal relativo ao crescimento dos animais. Porém, o treino não alterou este parâmetro quando comparado com o grupo controlo.

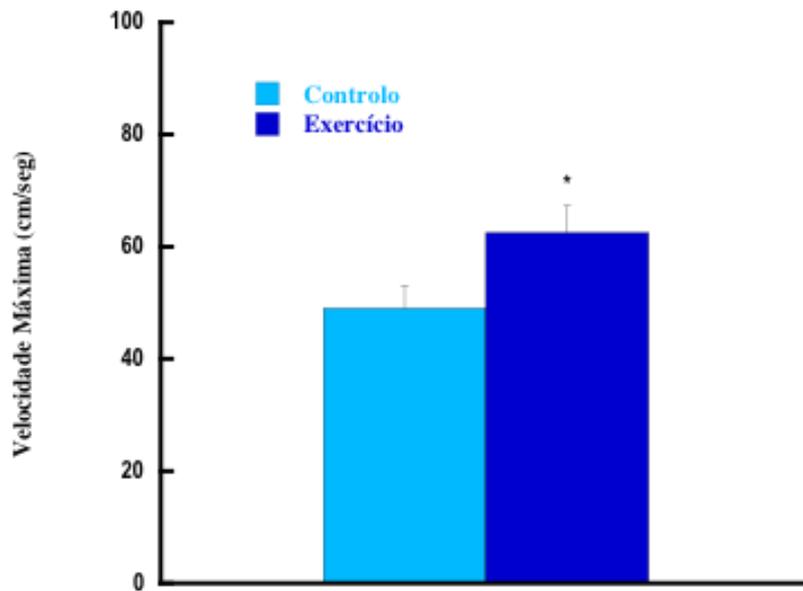


**Gráfico 1.** Evolução da massa corporal dos animais em estudo ao longo de oito semanas. Os pontos representam a média dos animais avaliados e os traços verticais o erro padrão. Controlo n = 6; Exercício n = 4.

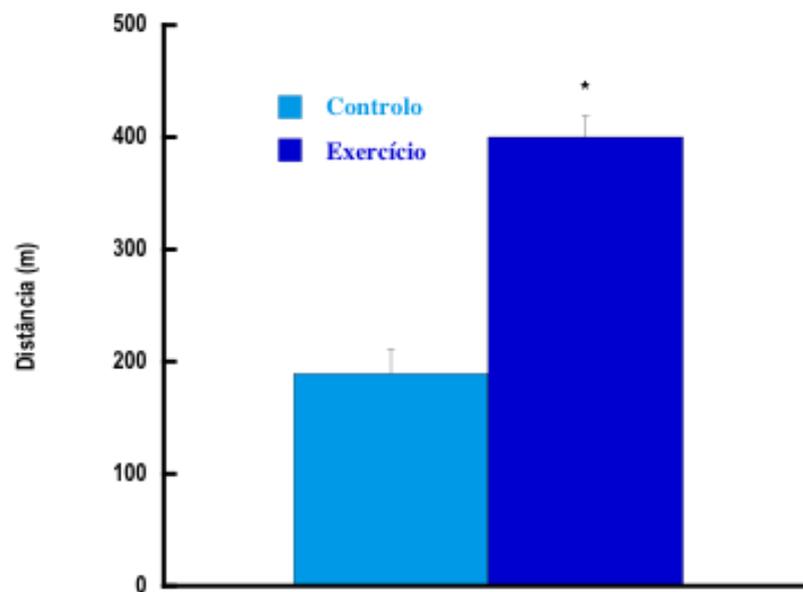
Sendo a duração do protocolo de exercício relativamente longa, este abarcou proporcionalmente uma série de adaptações por parte dos animais. Com o objetivo de avaliar a eficácia do treino foi realizado um teste de resistência velocidade até à fadiga. Foi registado o tempo que o animal aguentou em corrida, a velocidade máxima atingida e a distância total percorrida. Os resultados podem ser analisados através dos gráficos que se seguem. O gráfico 2 refere-se ao tempo de teste para cada grupo. Podemos verificar que o grupo treinado conseguiu atingir um tempo de teste superior. No gráfico 3 que diz respeito à velocidade máxima atingida, vemos que a velocidade máxima alcançada foi também maior no grupo treinado. De igual modo, no gráfico 4 é demonstrado que os animais treinados percorreram uma maior distância comparado com os ratos controlo.



**Gráfico 2.** Tempo percorrido pelos animais durante o teste resistência/velocidade. As barras representam médias dos valores obtidos e as linhas verticais o erro padrão. Controlo n = 6; Exercício n = 4. \*p < 0,05 em relação ao controlo.



**Gráfico 3.** Velocidade Máxima atingida pelos animais durante o teste resistência/velocidade. As barras representam médias dos valores obtidos e as linhas verticais o erro padrão. Controlo n = 6; Exercício n = 4. \*p < 0,05 em relação ao controlo.

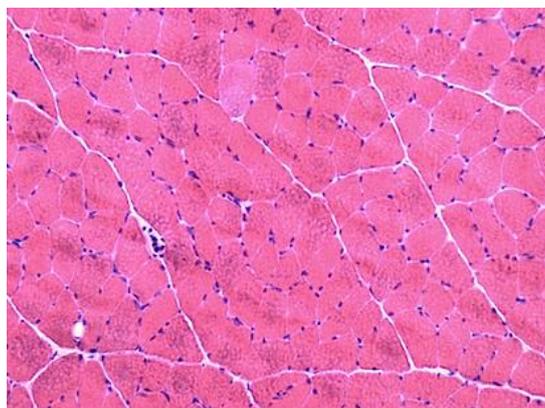


**Gráfico 4.** Distância percorrida pelos animais durante o teste resistência/velocidade. As barras representam médias dos valores obtidos e as linhas verticais o erro padrão. Controlo n = 6; Exercício n = 4. \*p < 0,05 em relação ao controlo.

## 4.2 Análise histológica

Após a remoção do músculo solear dos animais foram realizadas dois tipos de análises histológicas (como descrito na metodologia): uma coloração hematoxilina-eosina (HE) (figura 6) e uma coloração pelo método de ATPase (figura 7).

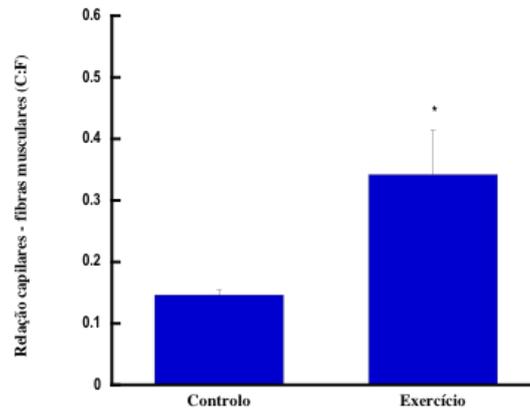
Estas diferentes colorações permitiram averiguar a integridade do tecido muscular, classificar o tipo de fibras e fazer a contagem de capilares e fibras totais. Os resultados obtidos nesta contagem foram expressos pela relação entre o número de capilares e o número total de fibras (C:F) num campo previamente estabelecido e mantido igual para todas as amostras. Deste modo, verificámos que no músculo solear a relação C:F era consideravelmente maior no grupo treinado aerobiamente do que no grupo controlo (gráfico 5).



**Figura 6.** Imagem de um corte transversal do músculo solear corado com hematoxilina-eosina (HE). As fibras aparecem coradas a tonalidade vermelha e os núcleos, infiltrados e vasos (entre eles os capilares) a azul. A fotografia é referente a um rato treinado.



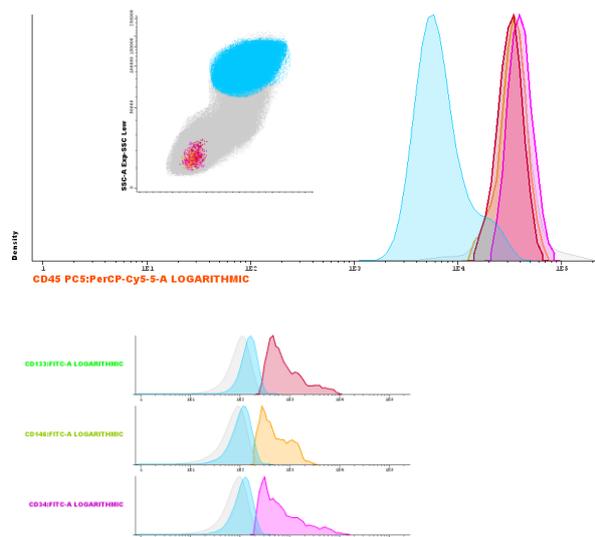
**Figura 7.** Imagem de um corte transversal do músculo solear corado de acordo com a técnica de ATPase a pH 9,4. As fibras claras são fibras tipo I e as coradas de castanho escuro são fibras tipo II. Os capilares apresentam-se com coloração castanha. A fotografia é referente a um rato controlo.



**Gráfico 5.** Relação entre o número de capilares e o número de fibras musculares presentes no músculo solear de ratos treinados e controlo. As barras representam médias dos valores obtidos e as linhas verticais o erro padrão. Controlo n = 6; Exercício n = 4. \*p < 0,05 em relação ao controlo.

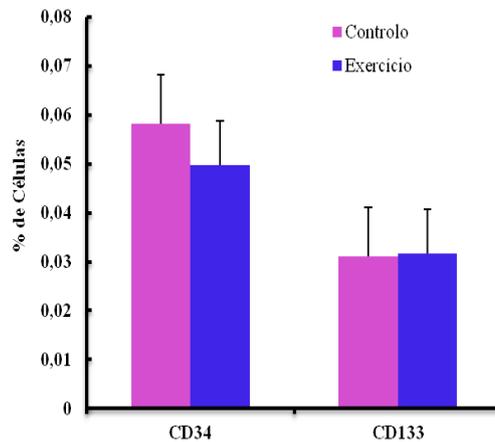
### 4.3 Análise de EPC's em sangue

Visando o objetivo deste trabalho, a questão colocada em análise direcionava-se no sentido de esclarecer qual a origem das células que vão conduzir ao aumento do número capilares no músculo esquelético, que podemos constatar ter ocorrido tal como descrito no gráfico 5 e que igualmente é reforçado pela literatura consultada. Assim, foi colocada a hipótese de haver uma contribuição por parte das EPC's na neo-vascularização induzida pelo exercício físico. Com base na técnica de citometria de fluxo analisámos a quantidade de células circulantes em sangue total periférico.



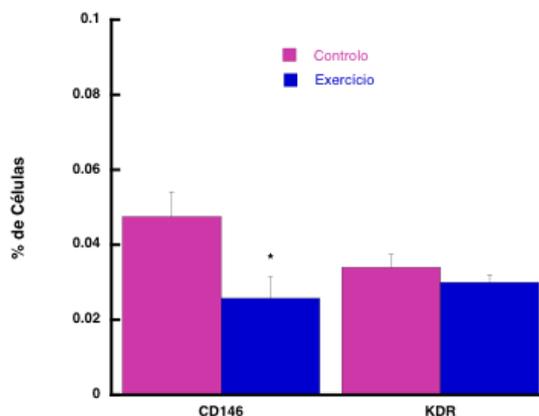
**Gráfico 6.** Representação exemplificativa de uma imagem correspondente à seleção das populações de células marcadas com os anticorpos (anti-CD45; anti-CD133; anti-CD146; anti-CD34) e os gráficos biparamétricos de populações celulares que marcam CD133, CD146, CD34 respetivamente.

As células com marcadores estaminais de indiferenciação (CD34, CD133) não se mostraram diferentes em percentagem, entre os dois grupos, CD34<sup>+</sup> (0,0583 ± 0,0113 vs 0,0498 ± 0,0112) e CD133<sup>+</sup> (0,0311 ± 0,0121 vs 0,0318 ± 0,0065) controlo e exercício respetivamente (gráfico 7).



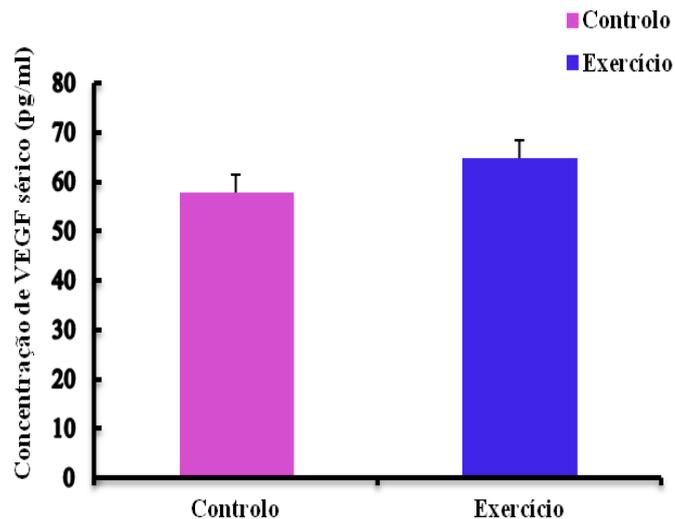
**Gráfico 7.** Percentagem de células circulantes (em sangue total) com anticorpos marcadores de células indiferenciadas (CD34<sup>+</sup> e CD133<sup>+</sup>). As barras representam médias dos valores obtidos e as linhas verticais o erro padrão. Controlo n = 4; Exercício n = 4.

Já no que se refere aos marcadores de diferenciação endotelial, verificámos uma diminuição significativa na percentagem das células CD146<sup>+</sup> (0,048 ± 0,007 vs 0,026 ± 0,006) mas sem alteração na percentagem das células KDR<sup>+</sup> (0,037 ± 0,007 vs 0,028 ± 0,006) nos grupos controlo e exercício (Gráfico 8).



**Gráfico 8.** Percentagem de células circulantes (em sangue total) com marcadores de células diferenciadas com características endoteliais (CD146<sup>+</sup> e KDR<sup>+</sup>). As barras representam médias dos valores obtidos e as linhas verticais o erro padrão. Controlo n = 4; Exercício n = 4. \*p < 0,05 relativamente ao controlo.

Para a que ocorra a mobilização celular e diferenciação das células progenitoras em células endoteliais é fundamental a existência de VEGF. Ao analisarmos esta proteína verificámos uma forte tendência para aumento ( $p = 0,04$ ) no grupo treinado  $64,84 \pm 1,99$  quando comparado com o controlo  $57,73 \pm 2,95$  (Gráfico 9).



**Gráfico 9.** Concentração sérica de VEGF (pg/ml) nos grupos controlo e treinados. Cada valor individual corresponde à média aritmética de quatro doseamentos. As barras representam médias dos valores obtidos e as linhas verticais o erro padrão. Controlo  $n = 5$ ; Exercício  $n = 4$ .

## **CAPÍTULO V**

### **DISCUSSÃO**

## 5. DISCUSSÃO

A descoberta de células em circulação no sangue periférico com potencial regenerativo e reparador de lesões do foro cardiovascular veio transformar o conceito relacionado com a neovascularização e reendotelização, nomeadamente conceitos ligados a processos de vasculogénese e angiogénese. Estes mecanismos estão na dependência de estímulos que desencadeiam este tipo de resposta, isto é, na mobilização e diferenciação, bem como no recrutamento de linhagens celulares para locais onde estão inevitavelmente a ser necessárias para ações de restabelecimento ou formação de novos vasos sanguíneos.

Neste estudo foi colocada a hipótese de que o exercício físico aeróbio ao induzir respostas adaptativas significativas a nível músculo esquelético possa ser ele também um dos estímulos positivos na produção e mobilização de células progenitoras endoteliais.

Concebemos e realizámos o estudo com recurso a modelos animais, ratos Wistar jovens, que pelas suas características em termos de parâmetros anatómico-fisiológicos se assemelham ao ser humano. Sendo também o modelo animal mais utilizado nos estudos de análise fisiológica (Santos *et al.*, 2010; Andreollo *et al.*, 2012).

Colocámos em prática um protocolo de treino aeróbio, tendo-se verificado que não houve variação da massa corporal entre o grupo controlo e o treinado, o que não corresponde ao esperado, uma vez que esperávamos que um rato treinado tivesse aumento da massa corporal. No entanto, terão ocorrido mecanismos compensatórios tendo os ratos não treinados progressivamente aumentado a percentagem de gordura, enquanto os outros, estando exercitados aumentaram a massa muscular.

O teste de esforço físico máximo é utilizado como ferramenta para avaliação do desempenho físico após um período de treino físico aeróbio. Com vista a testar a eficácia do protocolo de treino posta em prática no grupo de animais sujeito ao exercício, verificámos através dos resultados obtidos no teste resistência/velocidade que cruzando os parâmetros de velocidade máxima atingida, tempo que aguentaram em corrida até à fadiga e distância percorrida, o grupo sujeito a exercício deteve valores significativamente mais elevados em relação ao controlo, pois obtiveram valores de velocidade máxima superiores, num período de tempo superior e acabaram por ir mais longe em termos de distância. Isto levou-nos a concluir que o treino de oito semanas

proporcionou uma melhoria funcional, logo, foi eficaz em relação ao grupo mantido em sedentarismo.

Existe evidência de que ocorre adaptações do músculo esquelético no exercício aeróbio de longa duração, principalmente no que respeita à proporção entre as fibras musculares do tipo I e tipo II, sendo que, com a prática de exercício deste tipo há um aumento das fibras tipo I, o que inevitavelmente terá de se traduzir num aumento de capilares. Esta relação verificou-se pelo aumento significativo do rácio do número de capilares versus número de fibras musculares, no músculo solear dos ratos treinados em relação ao controlo. Na maioria dos casos, o músculo esquelético apresenta uma arquitetura vascular com um *design* do tipo paralelo ou oblíquo, de acordo com a descrição do fornecimento sanguíneo, segundo a classificação do músculo esquelético (Myrhage e Eriksson, 1984) o músculo solear é classificado como classe III, por causa da presença de uma grande artéria central, artéria sural externa, e uma rede de circulação colateral difusa que se estende através do ventre muscular. É pelo arranjo tri-dimensional dos vasos sanguíneos que é garantida a homogeneidade do suprimento vascular. Hudlika (1992) relatou que a microcirculação do músculo esquelético é um sistema dinâmico que muda em tamanho e forma, dependendo de processos patológico específicos, ao mesmo tempo que igualmente se ajusta tendo em conta as exigências funcionais impostas.

Esta variação do número de capilares implicou um aumento da vascularização local, uma vez que partimos do princípio que esta situação pode ser atribuída ao mecanismo de vasculogénese. Assim, o endotélio formado teve de provir de linhagens celulares progenitoras com esta capacidade. Os resultados obtidos em relação às células com marcadores de células estaminais (*stem cell*) indiferenciadas (CD34<sup>+</sup> e CD133<sup>+</sup>), provenientes da medula óssea não demonstraram claramente aumentos significativos. Contudo, esta situação pode ser atribuída ao fato das colheitas de sangue se terem realizado uma semana após o término do exercício físico, o que poderá explicar o regresso já a uma situação fisiológica basal, não havendo por isso diferenças significativas entre grupos. Estes dados vão de encontro aos do estudo desenvolvido por Bonsignore *et al.* (2010) em atletas amadores de corrida, sujeitos a um protocolo de maratona, não tendo verificado diferenças no número total de células CD34<sup>+</sup> no final da prova e após 18-20 horas, em relação às obtidas em repouso dois a três dias antes da

prova. A possível explicação apresentada é que durante a maratona, células progenitoras hematopoiéticas podem migrar a partir do sangue para os tecidos periféricos posteriormente, e nas primeiras horas após o final da corrida, vai ocorrer uma reposição deste tipo de células por meio da migração de EPC's da medula óssea para o sangue periférico. Outros estudos, mostraram igualmente, que a diminuição de EPC's na circulação sanguínea, após uma maratona, não estava implicada numa resposta dependente do fator idade, ou seja, com o envelhecimento. Esta situação verificava-se que também ocorria em atletas mais jovens e mesmo em atletas após uma corrida de 246 Km, sendo de curta duração as alterações no padrão circulante deste tipo de células regressando aos valores iniciais do indivíduo no dia após a corrida (Adams *et al.*, 2008; Goussetis *et al.*, 2009).

Verificámos que os níveis de concentração sérica de VEGF (pg/ml) que podem de alguma forma contribuir para esta explicação, evidenciou apenas uma tendência para aumento, ou melhor, estariam já numa situação de retorno basal, após ter cessado o estímulo por parte do exercício físico. Diferentes padrões de libertação de fatores de crescimento, entre os quais o VEGF, GM-CSF, e eritropoietina podem ser modulados pelo tipo e intensidade do exercício físico realizado (Rehman *et al.*, 2004; Morici *et al.*, 2005).

A mobilização de células progenitoras provenientes da medula óssea tem sido observada em várias espécies animais, o que sugere que mecanismos semelhantes estão envolvidos. Parece que durante a sua mobilização existe uma complexa interação entre as citocinas/quimiocinas, proteases, e moléculas de adesão. Embora a compreensão das vias moleculares associadas a este mecanismo ainda não seja totalmente claro, vários estudos demonstraram que o VEGF é uma das moléculas mais potentes neste processo de libertação de EPC's (Asahara *et al.*, 1999, Kalka *et al.*, 2000). Em termos mecanísticos pensa-se que o VEGF ativa a MMP-9, o qual estimula as células estaminais a migrar do nicho quiescente da medula óssea (Heissig *et al.*, 2002). No estudo desenvolvido por Mobius-Winkler *et al.* (2009) verificaram que houve um aumento temporário significativo do VEGF, que ocorreu no máximo após 10 min de exercício máximo.

Diferentes controlos negativos são atualmente utilizados em vários estudos, apenas variando os isotipos de anticorpos específicos, mas que são rotulados com as

mesmas cores (Adams *et al.*, 2004; Sandri *et al.*, 2005; Lenk *et al.*, 2005), isto, associado ao fato de não existirem anticorpos para detecção da autofluorescência das células (Roederer, 2001). Estas são condicionantes da técnica laboratorial que pode ter influenciado de alguma forma os resultados obtidos. Para além destes fatores, um outro que dificulta a caracterização das EPC's é o fato da expressão do marcador de células estaminais CD34 não se restringir apenas a este tipo de células, mas também ser expresso em células endoteliais microvasculares maduras (Fina *et al.*, 1990; Sauter *et al.*, 1998). Em vista disto, Handgretinger *et al.* (2003) sugeriu o CD133 como um marcador hematopoiético celular mais imaturo, que está ausente em células endoteliais maduras e células monocíticas, pelo que deve ser considerado como um melhor marcador para a identificação das EPC's.

Adicionalmente, vários autores sugerem que EPC's mais imaturas na medula óssea são CD133<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>/Ve-caderina<sup>-</sup>, enquanto EPC's circulantes perdem o marcador CD133 precocemente e começam a expressar mais marcadores de célula endotelial, (CD133<sup>-</sup>/CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>/Ve-caderina<sup>+</sup>) (Hristov *et al.*, 2003). Em síntese, a identificação adequada das EPC's é ainda incerta, mas por razões de ordem prática, a definição CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> é a mais frequentemente usada.

Verificámos ainda que na marcação de células mais diferenciadas com características endoteliais (CD146<sup>+</sup> e KDR<sup>+</sup>) houve uma diminuição significativa na percentagem das células CD146<sup>+</sup>, mas não sendo proporcional às KDR<sup>+</sup>, traduzindo que possa ter ocorrido diferenciação celular e organização no endotélio, depois da sua mobilização da medula óssea. Esta diferença na percentagem das células KDR<sup>+</sup> também poderá ser atribuída ao fato deste marcador não ser o mais específico para os animais em estudo, no caso ratos Wistar.

Importa referir que as células endoteliais circulantes (CEC) têm sido definidas como células CD146<sup>pos</sup>, sendo consideradas marcadores celulares de lesão endotelial, tendo o seu aumento sido detetado em diferentes condições associadas a lesões vasculares, como angioplastias coronárias, síndromes coronárias e, mais recentemente, em enfartes agudos do miocárdio e insuficiência cardíaca crónica (Lee *et al.*, 2005; Erdbruegger *et al.*, 2006; Bonello *et al.*, 2006). No entanto, num estudo desenvolvido por Mobius-Winkler *et al.* (2009), foi avaliado em homens saudáveis desportistas 120

minutos a 210 minutos, depois um teste máximo em cicloergómetro, que houve um aumento significativo deste tipo de células em circulação.

Não podemos excluir que o exercício físico aeróbio ao ter aumentado a revascularização no músculo *soleus* dos ratos treinados, não tenha de fato mobilizado vários tipos de EPC's, presumidamente, provenientes da medula óssea. Provavelmente tal terá ocorrido mais precocemente e não no período em que se colheu o sangue. Também a diminuição das células CD146<sup>+</sup> pode significar a sua implantação no endotélio. Podemos igualmente estar na presença de outras linhagens celulares progenitoras em circulação com capacidade vasculogénica/angiogénica.

## **CAPÍTULO VI**

### **CONCLUSÃO**

## CONCLUSÃO

Os mecanismos que relacionam o exercício físico aos aspetos estruturais anatómicos, bioquímicos e funcionais de resposta ao treino encontram-se ainda sob intensa investigação científica. Tais como o efeito do exercício aeróbio na produção, mobilização e migração das EPC's e qual o seu papel em termos de revascularização muscular esquelética, aquando da mudança adaptativa no tipo de fibras musculares.

O presente estudo revelou que o número de EPC's circulantes no sangue periférico de jovens ratos Wistar, em termos percentuais, não variou significativamente entre o grupo sujeito a exercício físico aeróbio e o grupo controlo, sedentário portanto. Contudo, foi confirmado que o protocolo de exercício aeróbio imposto, após oito semanas de treino, culminou num aumento do rácio capilares/fibra musculares nos animais exercitados.

Os resultados obtidos permitem ainda estabelecer uma relação aproximada entre a presença de EPC's em vários estadios de diferenciação em circulação, em consequência do estímulo provocado pelo exercício aeróbio, via ativação de fatores de crescimento do tipo VEGF, uma vez que se verificou uma forte tendência para aumento no grupo exercitado.

Não podemos, porém, excluir que o exercício físico aeróbio ao ter aumentado a revascularização no músculo *soleus* dos ratos treinados não tenha de fato mobilizado vários tipos de EPC's, presumidamente provenientes da medula óssea. Todavia, não estando numa fase tão precoce de indiferenciação mas num estadio de diferenciação já mais avançado. Provavelmente tal terá ocorrido mais precocemente e não no período em que se colheu o sangue, dado o metabolismo acelerado do rato. Também a diminuição das células CD146<sup>+</sup> pode significar a sua implantação no endotélio. Podemos igualmente estar na presença de outras linhagens celulares progenitoras em circulação com capacidade vasculogénica/angiogénica.

Estes são dados inconclusivos, tendo em conta que são necessários estudos mais alargados para a confirmação que de fato há uma resposta robusta ao exercício físico aeróbio, em termos de EPC's circulantes.

## BIBLIOGRAFIA

- Adair TH, Gay WJ, Montani JP. 1990. Growth regulation of the vascular system: evidence for the metabolic hypothesis. *Am J Physiol Heart CircPhysiol* 259: 393–404.
- Adams V, Linke A, Breuckmann F, Leineweber K, Erbs S, Kränkel N, Bröcker-Preuss M, Woitek F, Erbel R, Heusch G, Hambrecht R, Schuler G, Möhlenkamp S. 2008. Circulating progenitor cells decrease immediately after marathon race in advanced-age marathon runners. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 15: 602–607.
- Adams V, Lenk K, Linke A, Lenz D, Erbs S, Sandri M, Tarnok A, Gielen S, Emmrich F, Schuler G, Hambrecht R. 2004. Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 684–690.
- Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, Zeiher AM, Dimmeler S. 2003. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 9: 1370–1376.
- Andreollo NA, Santos EF, Araújo MR, Lopes LR. 2012. Idade dos ratos versus idade humana: qual é a relação? *ABCD Arq. Bras. Cir. Dig.* [online]. 25(1): 49-51. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-67202012000100011>.
- António N, Fernandes R, Rodriguez-Losada N, Jiménez-Navarro MF, Paiva A, Galván ET, Gonçalves L, Ribeiro CF, Providência LA. 2010. Stimulation of endothelial progenitor cells: a new putative effect of several cardiovascular drugs. *Eur J Clin Pharmacol* 66(3): 219-230.
- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. 1999. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85: 221–228.
- Asahara T, Takahashi T, Masuda H. 1999. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone-marrow endothelial progenitor cells. *EMBO J* 18: 3964–3972.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275: 965–967.
- Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM, Landry AL, Hertel B, Duckert T, Boehm SM, Menne J, Haller H, Fliser D. 2004. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood* 103: 921–926.

- Baldwin K, Haddad F. 2002. Skeletal muscle plasticity: cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. *Am J Phys Med Rehabil* 81: S40-51.
- Balligand JL, Feron O, Dessy C. 2009. eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *Physiol Rev* 89: 481–534.
- Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. 1996. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 87: 3336-3343.
- Bigard XA, Janmot C, Merino D, Lienhard F, Guezennec YC, D'Albis A. 1996. Endurance training affects myosin heavy chain phenotype in regenerating fast-twitch muscle. *J Appl Physiol* 81: 2658-2665.
- Birot OJ, Koulmann N, Peinnequin A, Bigard XA. 2003. Exercise induced expression of vascular endothelial growth factor mRNA in rat skeletal muscle is dependent on fibre type. *J Physiol* 552: 213–221.
- Bonello P, Basire A, Sabatier F, Paganelli F, Dignat-George F. 2006. Endothelial injury induced by coronary angioplasty triggers mobilization of endothelial progenitor cells in patients with stable coronary artery disease. *J Thromb Haemost* 4: 979–81.
- Bonsignore MR, Morici G, Riccioni R, Huertas A, Petrucci E, Veca M, Mariani G, Bonanno A, Chimenti L, Gioia M, Palange P, Testa U. 2010. Hemopoietic and angiogenetic progenitors in healthy athletes: different responses to endurance and maximal exercise. *J Appl Physiol* 109: 60–67.
- Breier G. 2000. Functions of the VEGF/VEGF receptor system in the vascular system. *Semin Thromb Hemost* 26: 53-559.
- Bronte V, Serafini P, Apolloni E, Zanovello P. 2001. Tumor-induced immune dysfunctions caused by myeloid suppressor cells. *J. Immunother.* 24: 431–446.
- Brown MD, Hudlicka O. 2003. Modulation of physiological angiogenesis in skeletal muscle by mechanical forces: involvement of VEGF and metalloproteinases. *Angiogenesis* 6: 1–14.
- Bussolati B, Dunk C, Grohman M, Kontos CD, Mason J, Ahmed A. 2001. Vascular endothelial growth factor receptor-1 modulates vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis via nitric oxide. *Am J Pathol* 159: 993–1008.

- Caballero S, Sengupta N, Afzal A, Chang KH, Li Calzi S, Guberski DL, Kern TS, Grant MB. 2007. Ischemic vascular damage can be repaired by healthy, but not diabetic, endothelial progenitor cells. *Diabetes* 56: 960–967.
- Calzi SL, Neu MB, Shaw LC, Kielczewski JL, Moldovan NI, Grant MB. 2010. EPCs and pathological angiogenesis: When good cells go bad. *Microvasc Res* 79: 207–216.
- Case J, Mead LE, Bessler WK, Prater D, White HA, Saadatzadeh MR, Bhavsar JR, Yoder MC, Haneline LS, Ingram DA. 2007. Human CD34<sup>+</sup> AC133<sup>+</sup> VEGFR-2<sup>+</sup> cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. *Exp Hematol* 35: 1109–1118.
- Chavakis E, Aicher A, Heeschen C, Sasaki K, Kaiser R, El Makhfi N, Urbich C, Peters T, Scharffetter-Kochanek K, Zeiher AM, Chavakis T, Dimmeler S. 2005. Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. *J Exp Med* 201: 63–72.
- Clark ER, Clark EL:1939. Microscopic observations on the growth of blood capillaries in the living mammal. *Am J Anat* 64: 251-299.
- Clark ER. 1918. Studies on the growth of blood vessels in the tail of frog larvae. *Am J Anat* 23: 37–88.
- Conraads VM, Van Craenenbroeck EM, Maeyer CD, Van Berendoncks AM Beckers PJ, Vrints CJ. 2012. Unraveling new mechanisms of exercise intolerance in chronic heart failure. Role of exercise training. *Heart Fail Rev* Published online: 10 June.
- Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, Rutten H, Fichtlscherer S, Martin H, Zeiher AM. 2001. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/ Akt pathway. *J Clin Invest* 108: 391–397.
- Dimmeler S, Zeiher AM. 2004. Vascular repair by circulating endothelial progenitor cells: the missing link in atherosclerosis? *J Mol Med (Berl)* 82: 671–677.
- Dimmeler S. 2010. Regulation of bone marrow-derived vascular progenitor cell mobilization and maintenance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30: 1088–1093.
- Distler JH, Allanore Y, Avouac J, *et al.* 2009. EULAR scleroderma trials and research group statement and recommendations on endothelial precursor cells. *Ann. Rheum. Dis* 68(2): 163–168.
- Domen J., *et al.* 2006. Bone Marrow (Hematiopoietic) Stem Cells. *Stem Cell Information: The National Institutes of Health resource for stem cell research.*

- Dubowitz V, Sewry CA. 2007. Muscle biopsy: a practical approach. 3<sup>rd</sup> ed. London: Elsevier Health Science 21:124.
- Eliakim A, Moromisato M, Moromisato D, Brasel JA, Roberts C Jr, Cooper DM. 1997. Increase in muscle IGF-I protein but not IGF-I mRNA after 5 days of endurance training in young rats. *Am J Physiol.* 273: 1557-61.
- Engerman RL, D Pfaffenbacvh D, Davis MD. 1967. Cell turnover of capillaries. *Lab. Invest.* 17: 738–743.
- Engvall E, Perlman P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* 8(9): 871-4.
- Erbs S, Hollriegel R, Linke A, Beck EB, Adams V, Gielen S, Mobius-Winkler S, Sandri M, Krankel N, Hambrecht R, Schuler G. 2010. Exercise training in patients with advanced chronic heart failure (NYHA IIIb) promotes restoration of peripheral vasomotor function, induction of endogenous regeneration, and improvement of left ventricular function. *Circ Heart Fail* 3: 486–494.
- Erdbruegger U, Haubitz M, Woywodt A. 2006. Circulating endothelial cells: a novel marker of endothelial damage. *Clin Chim Acta* 373: 17–26.
- Everaert BR, Van Craenenbroeck EM, Hoymans VY, Haine SE, Van Nassauw L, Conraads VM, Timmermans JP, Vrints CJ, Hoymans VY *et al.* 2010. Current perspective of pathophysiological and interventional effects on endothelial progenitor cell biology: focus on PI3 K/AKT/eNOS pathway. *Int J Cardiol* 144: 350–366.
- Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA, Greaves MF. 1990. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 75: 2417–2426.
- Flamme I, Risau W. 1992. Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. *Development.* 116(2): 435-9.
- Fluck M, Hoppeler H. 2003. Molecular basis of skeletal muscle plasticity--from gene to form and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 146: 159-216.
- Folkman J, Shing Y. 1992. Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 267(16): 10931-4.
- Folkman J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1: 27–31.
- Fong GH, Rossant J, Gersenstein M, Breitman ML. 1995. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature.* 376: 66–70.

- Furchgott RF, Zawadzki JV 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 288:373–376.
- Gallacher L, Murdoch B, Wu DM, Karanu FN, Keeney M, Bhatia M. 2000. Isolation and characterization of human CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> and CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood* 95: 2813–2820.
- Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schafer B, Hossfeld DK, Fiedler W. 2000. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 95: 3106–3112.
- George J, Shmilovich H, Deutsch V, Miller H, Keren G, Roth A. 2006. Comparative analysis of methods for assessment of circulating endothelial progenitor cells. *Tissue Eng*. 2006; 12(2):331–335.
- Gille H, Kowalski J, Li B, LeCouter J, Moffat B, Zioncheck TF, Pelletier N, Ferrara N. 2001. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol Chem* 276: 3222–3230.
- Goussetis E, Spiropoulos A, Tsironi M, Skenderi K, Margeli A, Graphakos S, Baltopoulos P, Papassotiriou I. 2009. Spartathlon, a 246 kilometer foot race: Effects of acute inflammation induced by prolonged exercise on circulating progenitor reparative cells. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 42: 294–299.
- Grant MB, May WS, Caballero S, Brown GA, Guthrie SM, Mames RN, Byrne BJ, Vaught T, Spoerri PE, Peck AB, Scott EW. 2002. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat. Med.* 8: 607–612.
- Green DJ, Walsh JH, Maiorana A, Best MJ, Taylor RR, O’Driscoll JG. 2003. Exercise-induced improvement in endothelial dysfunction is not mediated by changes in CV risk factors: pooled analysis of diverse patient populations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: 2679–87.
- Gulati R, Jevremovic D, Peterson TE, *et al.*. 2003. Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood. *Circ. Res* 93(11): 1023–1025.
- Gustafsson T, Kraus WE. 2001. Exercise-induced angiogenesis-related growth and transcription factors in skeletal muscle, and their modification in muscle pathology. *Front Biosci* 6: 75–89.
- Guth L, Samaha FJ. 1969. Quantitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. *Exp Neurol* 25: 138-152.

- Hambrecht R, Wolff A, Gielen S, Linke A, Hofer J, Erbs S, Schoene N, Schuler G. 2000. Effect of exercise on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 342: 454–460.
- Hanahan D., Folkman J. 1996. Patterns and Emerging Mechanisms Review of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell*. 86: 353-364.
- Handgretinger R., Gordon P.R., Leimig T., *et al.*. 2003. Biology and plasticity of CD133<sup>+</sup> hemopoietic stem cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 996: 141–151.
- Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. 2003. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 102: 1340–1346.
- Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S. 2002. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*. 109: 625–637.
- Hertig AT. 1935. Angiogenesis in the early human chorion and in the primary placenta of the macaque monkey. *Contnb. Embryol. Carnegie Inst. Washington* 25: 37-81.
- Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. 2003. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 348: 593–600.
- Hiratsuka S, Kataoka Y, Nakao K, Nakamura K, Morikawa S, Tanaka S, Katsuki M, Maru Y, Shibuya M. 2005. Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A) Is Involved in Guidance of VEGF Receptor-Positive Cells to the Anterior Portion of Early Embryos. *Mol Cell Biol*. 25(1): 355–363.
- Hristov M, Erl W, Weber PC. 2003. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 1185–1189.
- His W. 1900. *Abhandl. K.S. Ges. Wiss. Math.-Phys.* 22: 171.
- Hobson B, Denekamp J. 1984. Endothelial proliferation in tumors and normal tissues continuous labeling studies. *Br. J. Cancer*, 49: 405–413.
- Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. 2004. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol. Rev.* 56: 549-80.

- Hudlicka O, Brown MD, Silgram H. 2000. Inhibition of capillary growth in chronically stimulated rat muscles by *N*-nitro-L-arginine (L-NNA), nitric oxide synthase inhibitor. *Microvasc Res* 59: 45–51.
- Hudlicka O. 1998. Is physiological angiogenesis in skeletal muscle regulated by changes in microcirculation? *Microcirculation* 5: 7–23.
- Hudlika O. 1992. Growth of capillaries in skeletal and cardiac muscle. *Circ Res* 50: 451-460.
- Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, *et al.*. 2004. Characteristic of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:288-93.
- Ingram DA, Caplice NM, Yoder MC. 2005. Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood*. 2005; 106(5): 1525–1531.
- Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, *et al.*. 2004. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* 104(9): 2752–2760.
- Iwakura A, Luedemann C, Shastry S, Hanley A, Kearney M, Aikawa R, Isner JM, Asahara T, Losordo DW. 2003. Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury. *Circulation* 108: 3115–3121.
- Joyner MJ, Green DJ. 2009. Exercise protects the cardiovascular system: effects beyond traditional risk factors. *J Physiol* 587: 5551–8.
- Kalka C, Masuda H, Takahashi T, *et al.*. 2000. Transplantation of *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97(7): 3422–3427.
- Kaßmeyer S, Plendl J, Custodis P, Bahramsoltani M. 2009. New Insights in Vascular Development: Vasculogenesis and Endothelial Progenitor Cells. *Anat. Histol. Embryol.* 38: 1–11.
- Kawamoto A, Losordo DW. 2008. Endothelial progenitor cells for cardiovascular regeneration. *Trends Cardiovasc Med* 18: 33–37.
- Kendall RL, Thomas KA. 1993. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10705-10709.

- Khan SS, Solomon MA, McCoy JP Jr. 2005. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry B Clin. Cytom* 64(1): 1–8.
- Kritzenberger M, Wrobel KH. 2004. Histochemical in situ identification of bovine embryonic blood cells reveals differences to the adult haematopoietic system and suggests a close relationship between haematopoietic stem cells and primordial germ cells. *Histochem. Cell Biol.* 121: 273–289.
- Kucia M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. 2005. Are bone marrow stem cells plastic or heterogenous—that is the question. *Exp Hematol* 33: 613–623.
- Kusmartsev S, Gabrilovich DI. 2003. Inhibition of myeloid cell differentiation in cancer: the role of reactive oxygen species. *J. Leukoc. Biol.* 74: 186–196.
- Kusmartsev S, Gabrilovich DI. 2002. Immature myeloid cells and cancer-associated immune suppression. *Cancer Immunol. Immunother* 51: 293–298.
- Laufs U, Urhausen A, Werner N, Scharhag J, Heitz A, Kissner G, Bohm M, Kindermann W, Nickenig G. 2005. Running exercise of different duration and intensity: effect on endothelial progenitor cells in healthy subjects. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 12: 407–414.
- Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jurgens K, Miche E, Bohm M, Nickenig G. 2004. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circul* 109: 220–226.
- Lee KW, Lip GYH, Tayebjee M, Foster W, Blann AD. 2005. Circulating endothelial cells, von Willebrand factor, interleukin-6, and prognosis in patients with acute coronary syndromes. *Blood* 105: 526–532.
- Lenk K, Adams V, Lurz P, Erbs S, Linke A, Gielen S, Schmidt A, Scheinert D, Biamino G, Emmrich F, Schuler G, Hambrecht R. 2005. Therapeutical potential of blood-derived progenitor cells in patients with peripheral arterial occlusive disease and critical limb ischaemia. *Eur Heart J* 26: 1903–1909.
- Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. 2000. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 105: 71–77.
- Lindstrom M, Thornell LE. 2009. New multiple labelling method for improved satellite cell identification in human muscle: application to a cohort of power-lifters and sedentary men. *Histochem Cell Biol* 132: 141–157.
- Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, Uchida S, Masuda H, Kawamoto A, Walsh K, Isner JM, Asahara T. 2001. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest* 108: 399–405.

- Loomans CJ, de Koning EJ, Staal FJ, Rookmaaker MB, Verseyden C, de Boer HC, Verhaar MC, Braam B, Rabelink TJ, van Zonneveld AJ. 2004. Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes* 53: 195–199.
- Lyden D, Hattori K, Dias S, *et al.*. 2001. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat. Med.* 7: 1194–1201.
- Matsumoto T, Mifune Y, Kawamoto A, Kuroda R, Shoji T, Iwasaki H, Suzuki T, Oyamada A, Horii M, Yokoyama A, Nishimura H, Lee SY, Miwa M, Doita M, Kurosaka M, Asahara T. 2008. Fracture induced mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for bone healing. *J. Cell. Physiol.* 215: 234–242.
- Mcardle WD, Katch FI, Katch VL. 2008. *Fisiologia do Exercício: Energia, nutrição e desempenho humano.* 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan AS.
- Milkiewicz M, Hudlicka O, Brown MD, Silgram H. 2005. Nitric oxide, VEGF, and VEGFR-2: interactions in activity-induced angiogenesis in rat skeletal muscle *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: 336–343.
- Mobius-Winkler S, Hilberg T, Menzel K, Golla E, Burman A, Schuler G, Adams V. 2009. Time-dependent mobilization of circulating progenitor cells during strenuous exercise in healthy individuals. *J Appl Physiol* 107: 1943–1950.
- Moncada S. 1997. Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. *Ann NY Acad Sci.* 811: 60–67.
- Moore MA, Hattori K, Heissig B, Shieh JH, Dias S, Crystal RG, Rafii S. 2001. Mobilization of endothelial and hematopoietic stem and progenitor cells by adenovector-mediated elevation of serum levels of SDF-1, VEGF, and angiopoietin-1. *Ann N Y Acad Sci* 938: 36–45.
- Mora S, Cook N, Buring JE, Ridker PM, Lee IM. 2007. Physical Activity and Reduced Risk of Cardiovascular Events: Potential Mediating Mechanisms. *Circulation* 116: 2110–8.
- Morici G, Zangla D, Santoro A, Pelosi E, Petrucci E, Gioia M, Bonanno A, Profita M, Riccobono L, Bellia V, Testa U, Bonsignore MR. 2005. Supramaximal exercise mobilizes haematopoietic progenitors and reticulocytes in athletes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289: R1496–R1503.
- Myrhaage R, Eriksson E. 1984. Arrangement of the vascular bed in different types of skeletal muscles. *Prog Appl Microcirc* 5: 1-14.

- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 13: 9–22.
- Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, von Euler G, Joukov V, Saksela O, Orpana A, Pettersson RF, Alitalo K, and Eriksson U .1996. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2576–2581.
- Orfão, A; Buitrago, JMG. 1995. Fundamentos de la citometria de flujo. *La Citometria de flujo en el Laboratorio Clinico. Salamanca SEQC*: 11-30.
- Ortega N, Hutchings H, Plouet J. 1999. Signal relays in the VEGF system. *Front Biosci* 4: 141–152.
- Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WA. 1997. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest.* 100: 3131–3139.
- Pardanaud L, Altman C, Kitos P, Dieterien-Lievre F. 1989. Relationship between vasculogenesis, angiogenesis and haemopoiesis during avian ontogeny. *Development.* 105(3): 473-85.
- Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. 2000. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95: 952–958.
- Pette D, Staron RS. 2000. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech* 50: 500-509.
- Pette D. 2002. The adaptive potential of skeletal muscle fibers. *Can J Appl Physiol* 27: 423-448.
- Peters BA, Diaz LA, Polyak K *et al.* 2005. Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nat. Med.* 11, 261–262.
- Practical Flow Cytometry. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc; 1-2.
- Purhonen S, Palm J, Rossi D, Kaskenpaa N, Rajantie L, Yla-Herttuala S, Alitalo K, Weissman IL, Salven P. 2008. Bone marrow-derived circulating endothelial precursors do not contribute to vascular endothelium and are not needed for tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 6620–6625.
- Quirici N, Soligo D, Caneva L, Servida F, Bossolasco P, Deliliers GL. 2001. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. *Br. J. Haematol.* 115: 186–194.

- Rafii S, Lyden D. 2003. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat. Med.* 9: 702–712.
- Rehman J, Li J, Parvathaneni L, Karlsson G, Panchal VR, Temm CJ, Mahenthiran J, March KL. 2004. Exercise acutely increases circulating endothelial progenitor cells and monocyte / macrophage derived angiogenic cells. *J Am Coll Cardiol* 43: 2314–2318.
- Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. 2003. Peripheral blood ‘endothelial progenitor cells’ are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 107(8): 1164–1169.
- Risau W, Flamme I. 1995. Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11: 73–91.
- Risau W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 17, 386: 671-4.
- Risau W. 1995. Differentiation of endothelium. *FASEB J.* 9: 926-936.
- Roederer M. 2001. Spectral compensation for flow cytometry: Visualization artifacts, limitations, and caveats. *Cytometry* 45: 194–205.
- Rohde E, Bartmann C, Schallmoser K, Reinisch A, Lanzer G, Linkesch W, Guelly C, Strunk D. 2007. Immune cells mimic the morphology of endothelial progenitor colonies in vitro. *Stem Cells* 25: 1746–1752.
- Sandri M, Adams V, Gielen S, Linke A, Lenk K, Krankel N, Lenz D, Erbs S, Scheinert D, Mohr FW, Schuler G, Hambrecht R. 2005. Effects of exercise and ischemia on mobilization and functional activation of blood-derived progenitor cells in patients with ischemic syndromes: Results of 3 randomized studies. *Circulation* 111: 3391–3399.
- Santos MRV, Souza VH, Menezes IAC, Bitencurt JL, Rezende-Neto JM, Barreto AS, Cunha FA, Marçal RM, Teixeira-Silva F, Quintans-Júnior LJ, Barbosa APO. 2010. Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. *Scientia Plena* 6(10): 106101-6.
- Sauter B, Foedinger D, Sterniczky B, Wolff K, Rappersberger K. 1998 Immunoelectron microscopic characterization of human dermal lymphatic microvascular endothelial cells: Differential expression of cd31, cd34, and type iv collagen with lymphatic endothelial cells vs blood capillary endothelial cells in normal human skin, lymphangioma, and hemangioma in situ. *J Histochem Cytochem* 46: 165–176.
- Shapiro, HM. 2003. What (And What Good) Is Flow Cytometry?. In: Shapiro, HM.

- Schaper W, Brahaner MD, Lewi P. 1971. DNA synthesis and mitoses in coronary collateral vessels of the dog. *Circ. Res.* 28: 671-9.
- Schatteman G.C, Dunnwald M, Jiao C. 2007. Biology of bone marrow-derived endothelial cell precursors. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 292: H1–H18.
- Schmidt-Lucke C, Fichtlscherer S, Aicher A, *et al.*. 2010. Quantification of circulating endothelial progenitor cells using the modified ISHAGE protocol. *PLoS One* 5(11):e13790.
- Scrofani SD, Fabri LJ, Xu P, Maccarone P, Nash AD. 2000. Purification and refolding of vascular endothelial growth factor-B. *Protein Sci* 9: 2018–2025.
- Shaw JP, Basch R, Shamamian P. 2004: Hematopoietic stem cells and endothelial cell precursors express Tie-2, CD31 and CD45. *Blood Cells Mol. Dis.* 32: 168–175.
- Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR *et al.*. 1998 Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 92: 362–367.
- Shibuya M. 2001. Structure and Function of VEGF/VEGF-receptor System Involved in Angiogenesis. *Cell Structure and Function.* 26: 25-35.
- Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, Hormigo A, Kushner J, Milde T, St. Clair R, Baljevic M, White I, Jin DK, Chadburn A, Murphy AJ, Valenzuela DM, Gale NW, Thurston G, Yancopoulos GD, D'Angelica M, Kemeny N, Lyden D, Rafii S. 2008. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133<sup>+</sup> and CD133<sup>-</sup> metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest* 118(6): 2111–2120.
- Smith HK, Plyley MJ, Rodgers CD, McKee NH. 1999. Expression of developmental myosin and morphological characteristics in adult rat skeletal muscle following exercise-induced injury. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 80: 84-91.
- Steiner S, Niessner A, Ziegler S, Richter B, Seidinger D, Pleiner J, Penka M, Wolzt M, Huber K, Wojta J, Minar E, Kopp CW. 2005. Endurance training increases the number of endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk and coronary artery disease. *Atherosclerosis* 181: 305–310.
- Stephenson TJ, Griffiths DW, Mills PM. 1986. Comparison of Ulex europaeus I lectin binding and factor VIII-related antigen as markers of vascular endothelium in follicular carcinoma of the thyroid. *Histopathology* 10: 251–260.

- Stevens L, Bastide B, Bozzo C, Mounier Y. 2004. Hybrid fibres under slow-to-fast transformations: expression is of myosin heavy and light chains in rat soleus muscle. *Pflugers Arch* 448: 507-514.
- Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U, Priller J, Laufs K, Ghaeni L, Milosevic M, Bohm M, Nickenig G. 2003. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation* 107: 3059–3065.
- Suzuki J. 2004. Time-course of changes in VEGF expression and capillarity in the early stages of exercise training with Co treatment in rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 181: 225–232.
- Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. 1999. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 5: 434–438.
- Takeishi S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM *et al.*. 1994. *J Clin Invest* 93: 662-670.
- Tavares P, Fontes Ribeiro C. 2007. Função endotelial e exercício físico. *Boletim Sociedade Portuguesa Educação Física* 32: 11-20.
- Timmermans F, Plum J, Yöder MC, Ingram DA, Vandekerckhove B, Case J. 2009. Endothelial progenitor cells: identity defined? *J Cell Mol Med* 13: 87-102.
- Thoma R. 1893. *Untersuchungen über die Histogenese und Histomechanik des Gefäßsystems*. Stuttgart, Enke Verlag.
- Torgan CE, Daniels MP. 2001. Regulation of myosin heavy chain expression during rat skeletal muscle development in vitro. *Mol Biol Cell* 12: 1499-1508.
- Urbich C, Dimmeler S. 2005. Risk factors for coronary artery disease, circulating endothelial progenitor cells, and the role of HMG-CoA reductase inhibitors. *Kidney International* 67: 1672–1676.
- Urbich C, Dimmeler S. 2004. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ. Res* 95(4):343–353.
- Van Craenenbroeck EM, Hoymans VY, Beckers PJ, Possemiers NM, Wuyts K, Paelinck BP, Vrints CJ, Conraads VM. 2010. Exercise training improves function of circulating angiogenic cells in patients with chronic heart failure. *Basic Res Cardiol* 105: 665–676.

- Van Craenenbroeck EM, Conraads VM. 2010. Endothelial progenitor cells in vascular health: focus on lifestyle. *Microvasc Res* 79: 184–192.
- Van Craenenbroeck EM, Vrints CJ, Haine SE, Vermeulen K, Goovaerts I, Van Tendeloo VFI, Hoymans VY, Conraads VMA. 2008. A maximal exercise bout increases the number of circulating CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> endothelial progenitor cells in healthy subjects. Relation with lipid profile. *J Appl Physiol* 104: 1006–1013.
- Van Craenenbroeck EM, Conraads VM, Van Bockstaele DR, Haine SE, Vermeulen K, Van Tendeloo VF, Vrints CJ, Vicky Y, Hoymans VY. 2008 (1). Quantification of circulating endothelial progenitor cells: a methodological comparison of six flow cytometric approaches. *J. Immunol. Methods* 332: 31–40.
- Van der Zee R, Murohara T, Luo Z, Zolleman F, Passeri J, Lekutat C, Isner JM. 1997. Vascular endothelial growth factor (VEGF)/vascular permeability factor (VPF) augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation* 95: 1030–1037.
- Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, *et al.*. 2001. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 103(24): 2885–2890.
- Walsh JH, Bilsborough W, Maiorana A, Best M, O´Driscoll GJ, Taylor RR, Green DJ. 2003. Exercise training improves conduit vessel function in patients with coronary artery disease. *J Appl Physiol* 95: 20–25.
- Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, and Heldin CH. 1994. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 269: 26988–26995.
- Waters RE, Rotevatn S, Li P, Annex BH, Yan Z. 2004. Voluntary running induces fiber type-specific angiogenesis in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C1342–C1348.
- Weiss MJ, Orkin SH. 1996. In vitro differentiation of murine embryonic stem cells. New approaches to old problems. *J Clin Invest.* 97(3): 591–595.
- Wiesmann C, Fuh G, Christinger HW, Eigenbrot C, Wells JA, de Vos AM. 1997. Crystal structure at 17 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor. *Cell.* 91(5): 695-704.
- Wilson A, Trumpp A. 2006. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 93–106.
- Yoder MC. 2009. Defining human endothelial progenitor cells. *J. Thromb. Haemost* 7(Suppl. 1): 49–52.

- Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, Krasich R, Temm CJ, Prchal JT, Ingram DA. 2007. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* 109: 1801–1809.
- Zengin E, Chalajour F, Gehling UM, Ito WD, Treede H, Lauke H, Weil J, Reichenspurner H, Kilic N, Ergun S. 2006. Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development* 133: 1543–1551.
- Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, Zhang H-T, Donnini S, Granger HJ, Bicknell R. 1997. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not fibroblast growth factor induced angiogenesis. *J Clin Invest* . 99: 2625–2634.
- Ziche M, Morbidelli L, Masini B, Amerini S, Granger HJ, Maggi CA, Geppetti P, Ledda F. 1994. Nitric oxide mediates angiogenesis *in vivo* and endothelial cell growth and migration *in vitro* promoted by substance P. *J Clin Invest* 94: 2036–204.