



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

**IMPLICAÇÕES DA IL-6 E DO ÓXIDO NITRICO NA REVASCULARIZAÇÃO
MUSCULAR PROMOVIDA PELO EXERCÍCIO FÍSICO SOB O EFEITO DE
IBUPROFENO.**

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.

Orientadora: Professora Doutora Paula Cristina V. B. Tavares.

Co-Orientador: Professor Doutor Carlos Alberto Fontes Ribeiro.

Priscila de Jesus Santos

Coimbra, 2015

AGRADECIMENTOS

São os acontecimentos inesperados que nos faz amadurecer e entender, ou não, o porquê de tudo que ocorre ao nosso redor. Essas mudanças constantes, boas ou más, é que nos trazem um belo sorriso ao final de cada fase, de cada batalha. E, por isso, temos de sempre agradecer a todos que sempre estão à nossa volta nos enchendo de esperança.

Agradeço a Deus, por todas as bênçãos concedidas na minha vida, principalmente desde quando iniciei um novo caminho do outro lado do oceano. A ti sou eternamente grata, não só pelos bons, mas também por todos os ensinamentos presentes em cada escolha e em cada obstáculo.

Aos meus pais, Silvanete Santos e José Hailton dos Santos, aos quais não só agradeço, mas dedico toda essa trajetória. Por abdicarem de vossos sonhos para realizarem os meus, pelo apoio, carinho, compreensão, por entender o sentido da minha mudança radical, por tornar tão simples as minhas escolhas inesperadas e por todo esforço realizado para me manter no mestrado, mesmo quando parecia impossível.

Agradeço também ao meu irmão Kaio Miguel Santos e a toda minha família e amigos, como minha tia Maria Reginilda, minhas primas Ana Beatriz, Deborah Regina, aos amigos(a), que mesmo não sendo possível citar todos, sintam-se abraçados.

E nessa longa trajetória, cheia de histórias, tenho que agradecer à minha família emprestada, a família portuguesa. À Tiago Duarte por todo apoio, incentivo, dedicação, carinho, compreensão e por se fazer tão presente em todos os momentos, como um grande amigo e companheiro. Também agradeço à sua família, principalmente à Dona Maria Rosa e Dona Emília Duarte por todo acolhimento e apoio. Sem esquecer Dona Jacinta, uma querida portuguesa que foi essencial na base que me fez chegar até aqui.

A turma do Mestrado em Biocinética 2013/2014, vocês são ótimos, foi uma experiência maravilhosa partilhar todo conhecimentos com vocês. Ao Gabriel Vecchi e a Cláudia Marques, amigos e conselheiros em todas as horas e a Susana Carmona pelo apoio.

À família Ginásio Happy Body, por todo apoio e confiança.

A orientadora Professora Doutora Paula Tavares e ao co-orientador Professor Doutor Carlos Ribeiro, pelo apoio acadêmico. À Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física da Universidade de Coimbra (FCDEFUC), pelo acolhimento, atenção, por oferecer bons professores e funcionários que auxiliam na formação acadêmica.

RESUMO

O exercício aeróbio tem múltiplas vantagens entre as quais a prevenção do risco cardiovascular. Embora este fato seja do conhecimento geral, muitos são os que frequentam academias por razões estéticas. Neste sentido são consumidas muitas substâncias desde suplementos a medicação com o intuito de aumentar a performance e diminuir a dor associada à fadiga, podendo assim aumentar o tempo de treino. Uma das substâncias utilizadas massivamente para este efeito é o ibuprofeno.

Em trabalhos anteriores tentamos saber qual a influencia deste fármaco a nível muscular esquelético e vascular. Para tal estudamos o grau de capilarização das fibras musculares, bem como o número de células progenitoras do endotélio (EPC's). Verificamos que o ibuprofeno tem um efeito de frenagem dos benefícios vasculares do exercício aeróbio. Este trabalho teve como objetivo estudar algumas das substâncias que estão implicadas na mobilização e diferenciação das EPC's, como sejam o óxido nítrico (NO) e a interleucina-6 (IL-6), relacionando-as com o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), já anteriormente quantificado.

Para a quantificação de NO e IL-6 no plasma e no músculo gastrocnêmio foram utilizados dois kits comerciais, um de ELISA (IL-6) e outro espectrofotométrico (NO). Os resultados mostraram um efeito de decréscimo nos níveis de NO e na IL-6 no grupo com treino aeróbio associado ao consumo de ibuprofeno.

Assim, os nossos resultados sugerem que a diminuição de mobilização e diferenciação das EPC's em ratos treinados, mas com administração simultânea de ibuprofeno parece dever-se a uma ação direta no mecanismo de controlo das EPC's. Isto é, ao inibir a COX há inibição das NOS que produzem menos NO. Esta baixa de NO estimula menos a produção de VEGF. Acresce que a IL-6 agrava a diminuição de NO criando um ciclo de decréscimo de estimulação das EPC's. Concluindo, a junção de ibuprofeno com o exercício aeróbio tende a diminuir a capacidade de vasculogênese promovida pelo exercício diminuindo assim os seus benefícios no músculo esquelético.

Palavras chave: Ibuprofeno, Exercício aeróbio, Óxido nítrico (NO), Interleucina - 6 (IL-6), Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), Células progenitoras do endotélio (EPC's), Vasculogênese.

ABSTRACT

The aerobic exercise has many advantages, such as the prevention of cardiovascular risk. Although this fact is well known, there are many who frequent gyms only for esthetic reasons. In this sense many substances are consumed from the medication supplements in order to increase performance and decrease pain associated with fatigue and can thus increase the training time. One of the substances massively used for this purpose is ibuprofen.

In previous work we tried to know what is the influence of this drug at skeletal muscle and vascular level. For this we study the degree of capillarity of the muscle fibers, as well as the number of endothelial progenitor cells (EPC's). We found that ibuprofen has a braking effect of the vascular benefits of aerobic exercise. This study aimed to study some of the substances that are involved in the mobilization and differentiation of EPC's, such as nitric oxide (NO) and interleucin-6 (IL-6), relating them to the vascular endothelial growth factor (VEGF), previously quantified.

For the quantification of NO and IL-6 in plasma and gastrocnemius muscle were used two commercial kits, an ELISA (IL-6) and other spectrophotometric (NO). The results showed a decrease effect in the levels of NO and IL-6 in the group with aerobic workout associated with ibuprofen consumption.

Thus, our results suggest that decreased mobilization and differentiation of EPC in rats trained but with simultaneous administration of ibuprofen appears to be due to a direct action of the EPC's control mechanism. That is, by inhibiting the COX there is an inhibition of NOS which produce less NO. This low NO stimulates least VEGF production. Furthermore, IL-6 exacerbates the reduction of NO creating a decrease cycle of EPC's stimulation. In conclusion, the combination of ibuprofen with aerobic exercise tends to decrease vasculogenesis capacity caused by exercise thereby reducing their muscle skeletal benefits.

Key-works: Ibuprofen, Aerobic exercise, nitric oxide (NO), Interleucin-6 (IL-6), vascular endothelial growth factor (VEGF), Endothelial progenitor cell (EPC's), vasculogenesi.

LISTA DE ABREVIATURAS

CE's – Células Endoteliais

CFU's – Unidades Formadoras de Colônias (*colony-forming unit*)

CML – Células do Músculo Liso

COX – Cicloxigenase

COX-1 – Cicloxigenase-1

COX-2 – Cicloxigenase-2

COX-3 – Cicloxigenase-3

CRR – Proteína C-reativa

DAC – Doenças da Artéria Coronariana

ECM – Remodelação da Matriz Cardíaca

eNOS- Sintetase endotelial do óxido nítrico

EPC's – Células Progenitoras do Endotélio

EPO - Eritropoietina

ESC's – Células Estaminais Embrionárias

G-CSF – Estimulação de Colônias de granulócitos

IL-6 – Interleucina-6

KDR – Receptor com Domínio Quinase de Inserção (*kinase insert domain receptor*)

MMP's – Matriz Metaloproteinases

MMP-9 – Matriz Metaloproteinase-9

MNC's – Células Mononucleares

NO – Óxido Nítrico

nNOS – Neural NO síntese

PG – Prostaglandina

PGE2 – Prostaglandina E2

SDF-1 – Fator 1 Derivado da Célula do Estroma (*stromal cell-derived fator-1*)

SP – Sangue Periférico

VEGF – Fator de Crescimento Vascular Endotelial (vascular endothelial growth factor)

vWF – Fator de von Willebrand

ÍNDICE GERAL

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xi
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xii
CAPÍTULO I.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. ESTADO DA ARTE	16
2.1 Caracterização das EPC's	16
2.2 As EPC's e os processos de angiogênese e vasculogênese.....	22
2.3 Técnicas de identificação e marcadores das EPC's	28
2.4 Aplicações e influências das EPC's	35
2.4.1 O papel do NO.....	38
2.4.2 A interleucina 6 (IL-6)	41
2.4.3 A relação COX e Ibuprofeno	43
2.5 A relação exercício físico aeróbio e EPC's.....	44
2.6 Exercício físico aeróbio, EPC's e Ibuprofeno.....	45
CAPÍTULO II.....	48
3. OBJETIVOS	49
CAPÍTULO III	50
4. METODOLOGIA	51
4.1 Desenho do estudo	51

4.2 Caracterização dos animais em estudo	51
4.3 Protocolo de treino dos animais	51
4.4 Obtenção dos músculos para estudo	52
4.5 Obtenção das amostras de plasma	52
4.6 Metodologia específica deste trabalho.....	52
4.6.1 Doseamento de Nitritos/Nitratos em músculo e plasma	52
4.6.2 Preparação dos reagentes	53
4.6.3 Análise muscular e plasmática da IL-6	55
4.7 Análise estatística	56
CAPÍTULO IV	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
CAPÍTULO V	64
CONCLUSÃO.....	65
BIBLIOGRAFIA	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Caminho percorrido pelas EPC's a partir da medula óssea	18
Figura 2: Células progenitoras em análise de citometria de fluxo	20
Figura 3: Capacidade de formação dos vasos	20
Figura 4: EPC's diferenciadas em CE's	21
Figura 5: EPC's diferenciadas no músculo liso (CML)	22
Figura 6: Ensaio in vitro na formação de vasos	24
Figura 7: O recrutamento de CE's a partir do vasos sanguíneo pré-existente	26
Figura 8: EPC's envolvidas na reparação de vasos	28
Figura 9: Origem hemangioblastos de EPC's	30
Figura 10: Diferentes efeitos do VEGF.....	31
Figura 11: A expressão dos receptores de VEGF nas ISL-1 em progenitoras humanas	32
Figura 12: Esquema de isolamento das células da medula óssea nos vasos periféricos.....	34
Figura 13: Fatores que influenciam a proliferação das EPC's	36
Figura 14: Mobilização de EPC's da medula óssea e a importância do NO para a biologia das EPC's	40
Figura 15: Modelo de como a IL-6 é regulada em resposta a adaptação ao treinamento	42
Figura 16: Diluição dos reagentes	54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I: Expressão eNOS em vários subtipos de EPC's	42
--	----

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Percentagem de células marcadas com CD34 e CD133 em sangue total de ratos	46
Gráfico 2: Percentagem de células marcadas com CD146 e KDR em sangue total de ratos	47
Gráfico 3: Valores médios da massa corporal dos ratos durante o período de treino ...	60
Gráfico 4: Concentração de nitritos no plasma	60
Gráfico 5: Concentração de nitritos no músculo gastrocnêmio	60
Gráfico 6: Concentração de IL-6 no plasma e no músculo gastrocnêmio.....	62

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O exercício físico induz adaptações moleculares que melhoram o desempenho físico, tanto em condições de manutenção como em situações de prevenção ou reabilitação. Benéfico para a saúde, em intensidade moderada e realizado regularmente, o exercício físico aeróbio provoca importantes adaptações autonômicas e hemodinâmicas que influenciam o sistema cardiovascular. Além disso, provoca estímulos mecânicos e metabólicos, assim como induz a liberação de vários fatores de crescimento, citosinas e hormônios (Adams *et al.*, 2004; Miller-Kasprzak e Jagodzinski, 2007; Wahl *et al.*, 2008).

No músculo esquelético, é observado o desenvolvimento da vascularização, o que contribui para a sua irrigação, mas é com a prática do exercício físico que o aumento da vasculatura torna-se mais evidente. Com isso, há estudos que investigam a revascularização no músculo esquelético, ou seja, a relação entre o aumento dos vasos sanguíneos e o exercício físico aeróbio.

O sistema vascular requer constante remodelação e adaptação dinâmica da vasculatura em resposta às necessidades funcionais, sendo importante para o bom funcionamento do corpo humano por estar ligado a todos os órgãos e sistemas (Ritz *et al.*, 2014). Para, além disso, possui funções diversas e essenciais, como regular, controlar e reparar tecidos e vasos sanguíneos. Por isso, a formação de novos capilares é fundamental nos processos de cicatrização, regeneração do tecido e estabilização do fornecimento de sangue (Ritz *et al.*, 2014).

Já foi demonstrado pelo nosso grupo de trabalho que, em ratos Wistar, após a realização em treino aeróbio de longa duração, o percentual de células progenitoras do endotélio (EPC's) aumentam no sangue periférico, diminuindo, no entanto, o número de células diferenciadas ou em diferenciação. Estes resultados permitem inferir que há possibilidade de novas EPC's serem mobilizadas da medula óssea e migrarem para o músculo esquelético, uma vez que em outros estudos, com animais e humanos, foi evidenciado que estas células estão envolvidas nos processos de reparação e regeneração dos vasos sanguíneos.

Com isso, outros estudos foram realizados para entender melhor esse processo. Sabemos que há aumento das EPC's com a prática do exercício físico aeróbio bem como de outros fatores que estão ligados na migração e proliferação das EPC's, como o

óxido nítrico (NO), o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), a interleucina-6 (IL-6) e a enzima cicloxigenase (COX). Entretanto, e a propósito de intervenção da COX há necessidade de investigar melhor a sua atividade. Por esta razão o Ibuprofeno merece a nossa atenção. Acresce o fato de este fármaco ser extensivamente utilizado pelos frequentadores de academias para aumentar o tempo de desempenho muscular e reduzir a dor e estado de fadiga muscular.

O NO é essencial na proliferação das EPC's, pois, regula etapas fundamentais no reparo muscular, bem como a COX-2 que pode aumentar a ocorrência de EPC's no processo de angiogênese. O NO também regula a IL-6 durante o exercício físico, além de ter relação direta com o VEGF, que é responsável pela mobilização das EPC's. O Ibuprofeno altera o COX fazendo com que as respostas promovidas pelo exercício físico sejam modificadas, desta forma pode influenciar a função do NO e, conseqüentemente, do VEGF, IL-6 e COX-2. Será que no músculo esquelético há aumento do NO nestas condições?

Essa é uma questão relevante que salienta a importância do exercício físico aeróbio para o bom funcionamento do organismo e, principalmente, da vasculatura. Assim sendo, foi investigado se o NO é influenciado pelo exercício físico aeróbio e pelo exercício físico aeróbio com Ibuprofeno na formação de novos vasos sanguíneos que provêm das EPC's circulantes que, supostamente, migram para o músculo.

O aumento dos capilares pode ocorrer através dos processos de vasculogênese e angiogênese. O processo de vasculogênese, só recentemente reconhecido, ocorre com o surgimento de novos vasos sanguíneos através das EPC's diferenciadas, ou seja, mobilizadas da medula óssea, estas células migram e formam novos vasos sanguíneos. O processo de angiogênese ocorre quando novos capilares são formados a partir da migração e proliferação de células endoteliais maduras, ou seja, de EPC's já existentes nos vasos sanguíneos.

Porém, continuam incertos os conceitos necessários para responder à questão colocada. Isso porque, permanece por esclarecer a linha temporal da diferenciação e os mecanismos de mobilização destas células, as EPC's.

2 ESTADO DA ARTE

O exercício físico aeróbio melhora a função e regeneração dos músculos, cardíaco e esquelético, ativando e mobilizando células indiferenciadas ou recrutando estas células do sangue circulante (Wahl *et al.*, 2008), sendo disto exemplo as células progenitoras do endotélio (EPC's). A descoberta das EPC's mudou a visão dos mecanismos de reparação envolvidos na lesão vascular e, desde então, a possibilidade de explorar as ações biológicas destas células se tornou uma boa ferramenta para a terapia vascular (Miller-Kasprzak e Jagodzinski, 2007).

Estudos, com animais e humanos, evidenciam que as EPC's estão envolvidas nos processos de reparação e regeneração dos vasos sanguíneos. A criação de vasos sanguíneos em determinadas condições é mal esclarecida, mas estudos mostram que quando promovidos pelo exercício físico, é nítido o aumento da vascularização, a qual pode envolver dois processos, vasculogênese e angiogênese.

2.1 Caracterização das EPC's

A primeira identificação das EPC's a partir de sangue periférico ocorreu em 1997, em estudos publicados por Asahara *et al.* (1997). Desde então, a investigação com estas células tornou-se relevante para compreender a regeneração dos capilares, a terapia celular, bem como identificar funções e benefícios a indivíduos saudáveis ou não (Asahara *et al.*, 1997; Werling *et al.*, 2013).

As EPC's são células circulantes prematuras derivadas da medula óssea (Castillo-Melendez *et al.*, 2013; Miller-Kasprzak e Jagodzinski, 2007; Wang *et al.*, 2013), mas que também são geradas em diversos locais hematopoiéticos do embrião, o qual inclui o saco vitelino, a artéria umbilical, a placenta e, recentemente reconhecido, o coração (Nakako *et al.*, 2013; Swiers *et al.*, 2013). Estas pequenas células (10-15µm), Kones (2013), em cultura, apresentam que também podem ser provenientes de células estaminais embrionárias e a partir do sangue periférico, (Werling *et al.*, 2013), apesar da dificuldade de obter EPC's em quantidade suficiente para aplicação clínica.

O caminho pelo qual as EPC's se originam na medula óssea é dado por uma série de ativadores bioquímicos os quais são direcionados para desempenhar um papel

no desenvolvimento e na diferenciação dos precursores das EPC's circulantes (Traish e Galoosian, 2013). Estudos, com animais e humanos, evidenciam que as EPC's estão envolvidas nos processos de reparação e regeneração dos vasos sanguíneos, além de ter a capacidade de aumentar o NO endotelial (Kones, 2013).

Há anos que se investiga a biologia das EPC's e, ainda não existe um consenso sobre a aparência destas células (Timmermans *et al.*, 2009). As EPC's são mobilizadas através das células-tronco durante a hipóxia aguda e liberadas na circulação sanguínea em resposta aos fatores de crescimento, a liberação de citosinas e a diferenciação em células endoteliais maduras, assim, as EPC's endógenas tem a função de manter a integridade vascular e a homeostase e, quando necessário, são capazes de mediar e reparar uma lesão vascular, já que as EPC's estão envolvidas em vasculogênese pós-natal e reendotelização após lesão endotelial (Castillo-Melendez *et al.*, 2013; Miller-Kasprzak e Jagodzinski, 2007; Wang *et al.*, 2013).

A hipóxia de tecidos é indicado como sendo um regulador fisiológico importante para a regeneração cardíaca, (Jung *et al.*, 2013), pois, desencadeia uma variedade de sinais junto às moléculas do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) ou do fator derivado do estroma (SDF-1). O SDF-1 e o VEGF são considerados necessários na diferenciação e na migração das EPC's, pois, ambos receptores possuem níveis plasmáticos aumentados e, assim, acompanham a mobilização de células hematopoiéticas para a circulação, entre elas as EPC's (Jung *et al.*, 2013; Miller-Kasprzak e Jagodzinski, 2007).

A medula óssea é um precursor comum das células-tronco e das hematopoiéticas e angioblastos, as quais se originam da própria medula óssea (Chen *et al.*, 2013; Miller-Kasprzak e Jagodzinski, 2007; Traish e Galoosian, 2013). De forma simplificada, alguns autores explicam que a medula óssea produz hemangioblastos, os quais têm o objetivo de ser um precursor comum das hematopoiéticas às células estaminais, assim como os angioblastos também derivados da medula óssea, pois, estes quando são submetidos à diferenciação, na presença de ativadores tais como a elastase, catepsina G e matriz metaloproteinases (MMP's), são detectados na superfície de EPC's maduras durante a circulação na corrente sanguínea (Chen *et al.*, 2013; Miller-Kasprzak e Jagodzinski, 2007; Traish e Galoosian, 2013). O caminho percorrido na formação das EPC's é descrito (figura 1), desde a medula óssea até alcançar a fase de diferenciação.

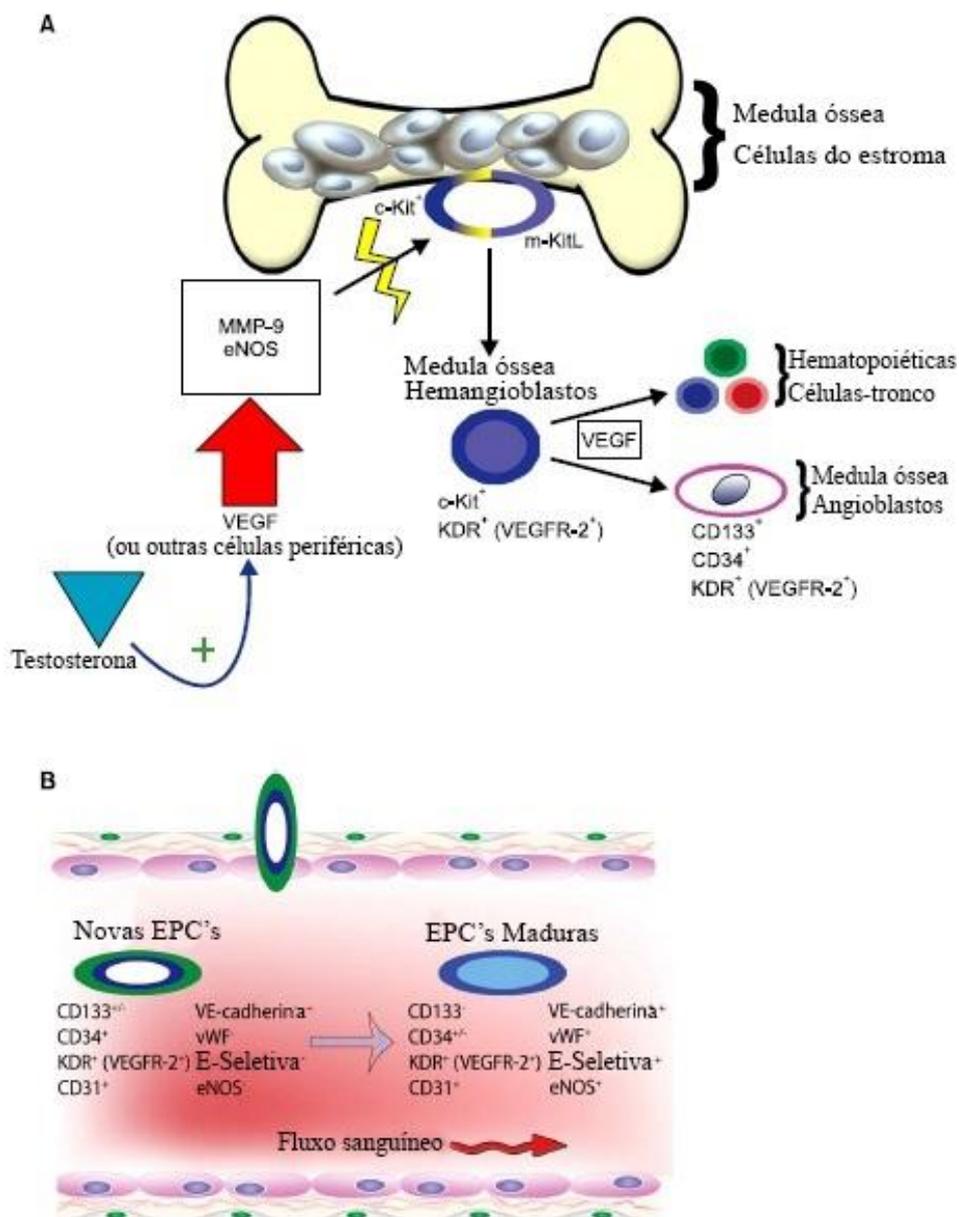


Figura 1: Ilustra o caminho desde o osso, onde se encontra a medula óssea e, as células progenitoras endoteliais, além dos vários gatilhos e antígenios da superfície celular das células progenitoras. Em **A**, a medula óssea produz angioblastos, que tem como função ser precursor comum de hematopoiéticas às células estaminais, bem como os angioblastos derivados da medula óssea, os quais são submetidos, posteriormente, a diferenciação na presença de ativadores adequados para EPC's. Já, em **B**, ilustra a diferenciação dos primeiros EPC's em marcadores específicos que são detectados na superfície das EPC's maduras durante a circulação na corrente sanguínea. Adaptado de Traish e Galoosian (2013).

Como ocorrem com as células, as EPC's circulantes podem reduzir em número, Gao *et al.* (2014); este evento pode ser atribuído ao aumento da apoptose e senescência, bem como a redução da migração a partir da medula óssea. Os mecanismos de reparo vascular podem ser afetados pela diminuição da mobilização de EPC's, causada pela redução da biodisponibilidade do NO (Aicher *et al.*, 2003; Radenkovic *et al.*, 2013). O aumento do NO, (Dimmeler *et al.*, 2001), pode ser estimulado por vários fatores, como as estatinas, o exercício físico, entre outros; desta forma, a mobilização de EPC's é aumentada.

Nesse contexto, a síntese endotelial do óxido nítrico (eNOS) gera NO nos vasos sanguíneos, influenciando a capacidade migratória de EPC's, *in vitro* (Aicher *et al.*, 2003). Desta forma, a eNOS reflete uma melhoria da mobilização de EPC's ocasionada pela estimulação das estatinas ou do VEGF (Dimmeler *et al.*, 2001; Mheid *et al.*, 2014). Porém, Gao *et al.* (2014), sugere que o eNOS não contribui como regulador fisiológico da mobilização e função das EPC's.

Em um estudo realizado por Jung *et al.* (2013), foram isoladas células progenitoras cardíacas humanas a partir de tecido cardíaco de crianças, as quais possuíam patologias, o que tornou possível a recolha do material. Este material passou por um processo durante 10 dias, no qual foi submetido a fármacos para diferenciar as células vasculares miogênicas, dentre outros segmentos e métodos como a imunofluorescência; na identificação das células (figura 2 à figura 5). Assim, apresenta a caracterização das células progenitoras cardíacas, sugerindo que as células progenitoras possuem características semelhantes, mesmo quando diferem na sua especificidade.

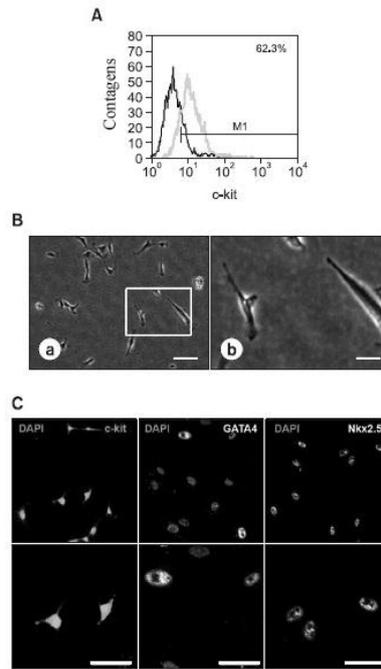


Figura 2: (A) análise de citometria de fluxo mostrou que a partir de P1 a P6, uma média de 62,3% de células progenitoras cardíacas derivadas de humanos era c-kit-positivo. (B) Morfologia de EPC's. Após a cultura das células obtidas a partir da aurícula cardíaca humana enzimaticamente digerido (a), as células progenitoras classificadas usando micro c-kit conjugado apareceu como fibroblastos (b). (C) imunomarcção para marcadores de células progenitoras cardíacas demonstraram que as EPC's foram positivas para c-kit (vermelho) e cardíacafatores de transcrição, GATA4 e Nkx2.5 (verde). c-kit foi detectado no citoplasma da célula, e Nkx2.5 GATA4 e foram detectadas nanúcleos celulares. Barra de escala representa 100 mm (Jung et al., 2013).

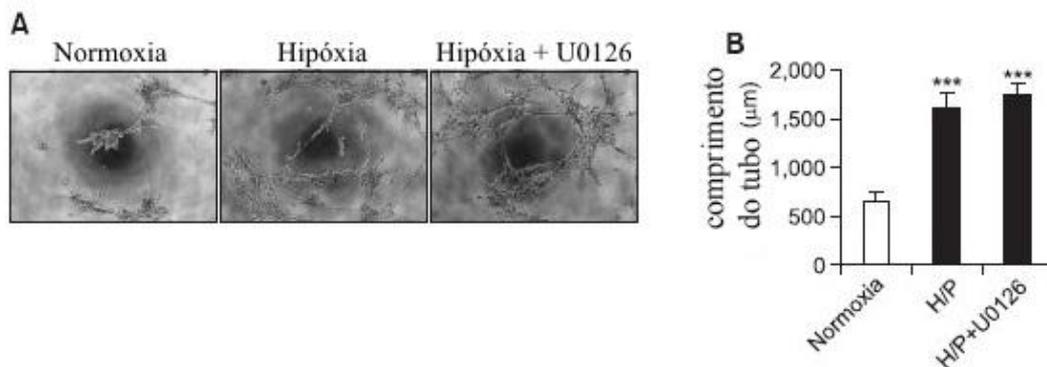


Figura 3: Capacidade de formação dos tubos. As EPC's foram cultivadas em Matrigel durante 5 horas após a exposição em uma normoxia, H / P, ou H / P + U0126. (A) EPC's tubulares representativas são mostradas ($\times 100$ ampliações). (B) A capacidade de EPC's para formar tubos foi analisada medindo comprimento do tubo através do programa J imagem. Capacidade de formação do tubo de EPC's sob H / P e H / P + U0126 foi significativamente maior do que sob condição da normoxia. *** $p < 0,001$. Adaptado de Jung et al. (2013).

Durante a análise de possibilidades das EPC's humanas que auxiliam na formação da estrutura vascular, foi observada a capacidade através da hipóxia e da inibição de ERK. A capacidade da formação dos vasos sanguíneos (figura 3), através das EPC's foi registrada, mostrando que houve um aumento na formação das estruturas de novos vasos. As células-tronco, também residentes no músculo cardíaco, contribuem significativamente para a reparação vascular, como também são capazes de se diferenciar em células endoteliais e em células musculares lisas. As figuras 4 e 5 mostram imagens do processo de diferenciação de células progenitoras em células vasculares (figura 4 e figura 5), obtidos através de métodos diferentes.

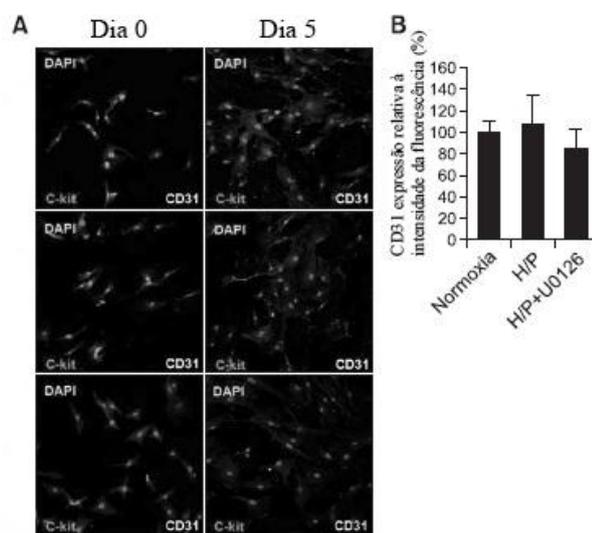


Figura 4: EPC's diferenciadas em células endoteliais por tratamento de bFGF durante 5 dias após o pré-tratamento com a hipóxia ou U0126. (A, B) As células foram coradas para c-kit (vermelho) ou CD31 (verde). Os núcleos foram corados com DAPI (azul). Expressão do endotelial marcador de células CD31 (verde) após induzida por bFGF CE diferenciação não foi diferente entre normóxia, H / P, ou / P + U0126 grupos H. Adaptado de Jung et al. (2013).

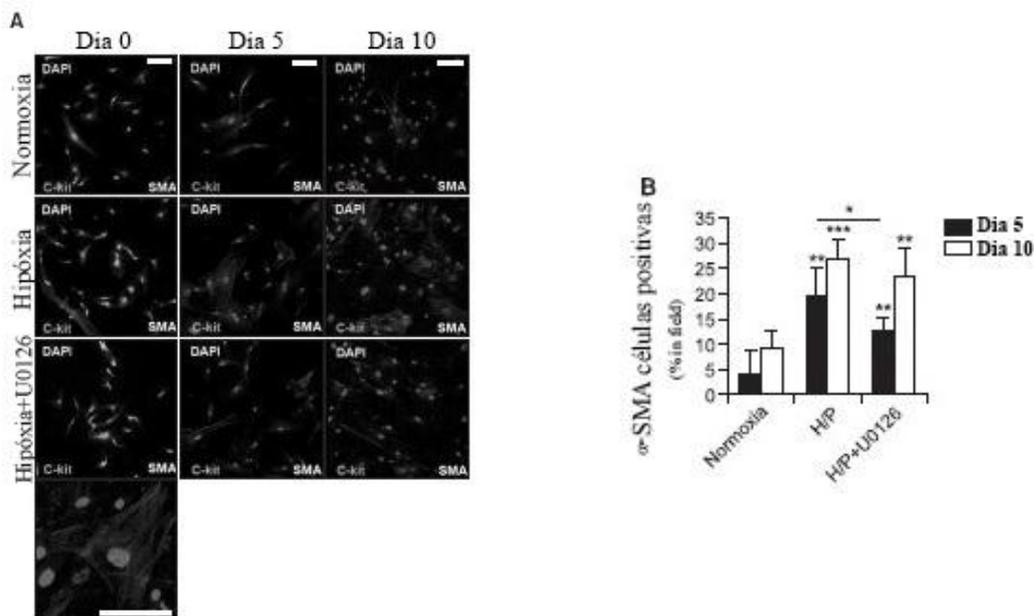


Figura 5: EPC's diferenciadas em células do músculo liso (CML) por tratamento de PDGF-BB por 10 dias. (A) As células foram coradas para c-kit (vermelho) ou-actina de músculo liso (α -SMA, verde). Os núcleos foram corados com DAPI (azul). (B) H / P ou H / P + U0126 grupos mostrou reforçada diferenciação SMC induzida por PDGF-BB como comparado com o grupo de normóxia. A diferenciação SMC foi avaliada por análise quantitativa da coloração para a célula do músculo liso marcador α -SMA (verde). Barra de escala representa 100 mm. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $p < 0,0$. Adaptado de Jung et al. (2013).

Para os processos de cicatrização, regeneração do tecido e estabilização do fornecimento de sangue, é fundamental a formação de novos capilares (Ritz *et al.*, 2014). Estes podem ser formados pelas EPC's através dos processos de vasculogênese ou angiogênese.

2.2 As EPC's e os processos de angiogênese e vasculogênese

Desde a primeira evidência de que o SP é considerado um reservatório de EPC's, provenientes da medula óssea que circulam nos vasos sanguíneos com propriedades reparadoras, foram encontrados em alguns estudos, dados de que as EPC's desempenham um papel significativo em lesões no endotélio, ocorrendo na reendotelização e na neovascularização (Miller-Kasprzak e Jagodzinski, 2007). Outro

local importante é o cordão umbilical, pois, este contém as EPC's em maior potencial proliferativo proveniente de fontes do SP ou da medula óssea.

As EPC's têm por função reparar a vasculatura e formar novos vasos sanguíneos. Isso ocorre por estas células possuírem a capacidade de proliferar, migrar e se diferenciar (in vivo e in vitro) (figura 6) em células endoteliais (Asahara *et al.*, 1997; Werling *et al.*, 2013). As EPC's migram para o local lesionado no tecido, onde ocorre a neovascularização, realiza a regeneração endotelial, a cicatrização através de uma proliferação de células que possuem a capacidade de se diferenciar em células endoteliais vasculares maduras e, secretam fatores de crescimento pró-angiogênicos, ou seja, contribuem para a reparação vascular (Castilo-Melendez *et al.*, 2013; Miller-Kasprzak e Jagodzinski, 2007; Zampetaki *et al.*, 2008).

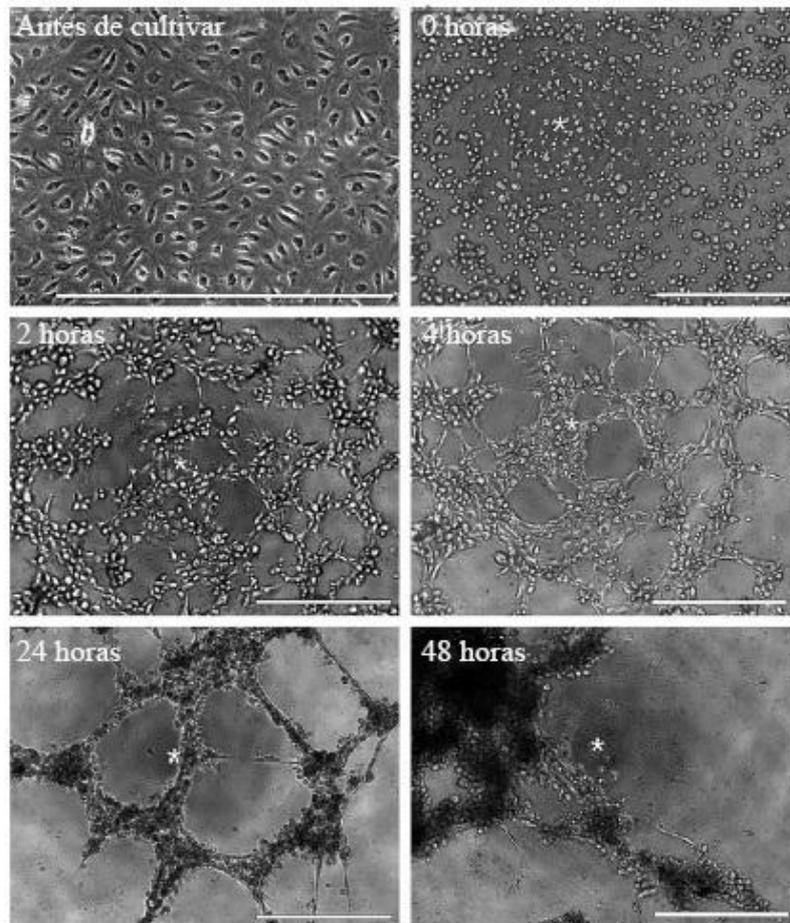


Figura 6: Ensaio *in vitro* na formação de vasos. O painel superior esquerdo apresenta EPC's finais cultivadas em uma placa normal de TC, que antes de serem cultivadas há 20000 células provenientes do "Cultrex Basement Membrane Extract". As demais figuras mostram o momento da migração celular e formação de vasos dentro de duas horas (médio esquerdo), extensa rede celular formada dentro de cinco horas (médio direito e inferior esquerdo) e, as estruturas do vaso contraído dentro de 48horas (canto inferior direito) fazendo com que as células se aglutinem. O asterisco (*) localiza a mesma posição ao longo do tempo, em cada imagem. As barras de escala são de 500µm. Adaptado de Werling *et al.*, 2013.

Investigadores acreditam que as EPC's maduras se abrigam em locais lesionados no endotélio e estão envolvidas em processos de reconstrução vascular, Traish e Galoosian (2013), porém, há células progenitoras circulantes com características similares às EPC's; isto se explica pelo fato de que ambas originam a partir de células-tronco hematopoiéticas da medula óssea, as quais migram para a circulação periférica, ocorre a neovascularização e se diferenciam ao amadurecer as CE's (Traish e Galoosian, 2013).

Historicamente, a neovascularização pós-natal, Asahara *et al.* (2011); Folgman *et al.* (1992), foi distinta pelo mecanismo de angiogênese, por ocorrer através da proliferação e migração das CE's existentes. Porém, foi descoberto que as EPC's na neovascularização podem se diferenciar em CE's, ocorrendo a vasculogênese, Asahara *et al.* (2011), que até então era descrito por ser realizado apenas no período embrionário.

Assim, estudos não recentes, afirmavam que os novos vasos sanguíneos são formados a partir da migração e proliferação de CE's maduras, a angiogênese, Shi *et al.* (1998), porém, com a descoberta das EPC's, estudos, recentes, observaram que os novos vasos sanguíneos são formados por EPC's diferenciadas, a vasculogênese. Com isso, novos estudos apontam que ambos os processos (figura 7) podem ocorrer.

Os processos de vasculogênese e de angiogênese são fundamentais na cicatrização, na regeneração do tecido, além da estabilização do fornecimento de sangue no local lesionado (Ritz *et al.*, 2014), assim, são definidos como processos responsáveis pela formação de novos vasos sanguíneos (Miller-Kasprzak e Jagodzinski, 2007).

O processo de vasculogênese, só recentemente reconhecido, ocorre com o surgimento de novos vasos sanguíneos através das EPC's diferenciadas, ou seja, mobilizadas da medula óssea (figura 7). O processo de angiogênese ocorre quando novos vasos sanguíneos são formados a partir da migração e proliferação de células endoteliais maduras, ou seja, de EPC's já existentes no endotélio. Deste modo, alguns autores definem (figura 7) a vasculogênese como processo que ocorre durante a embriogênese, enquanto a angiogênese ocorre durante o desenvolvimento das embrionárias e na vida pós-natal (Miller-Kasprzak e Jagodzinski, 2007).

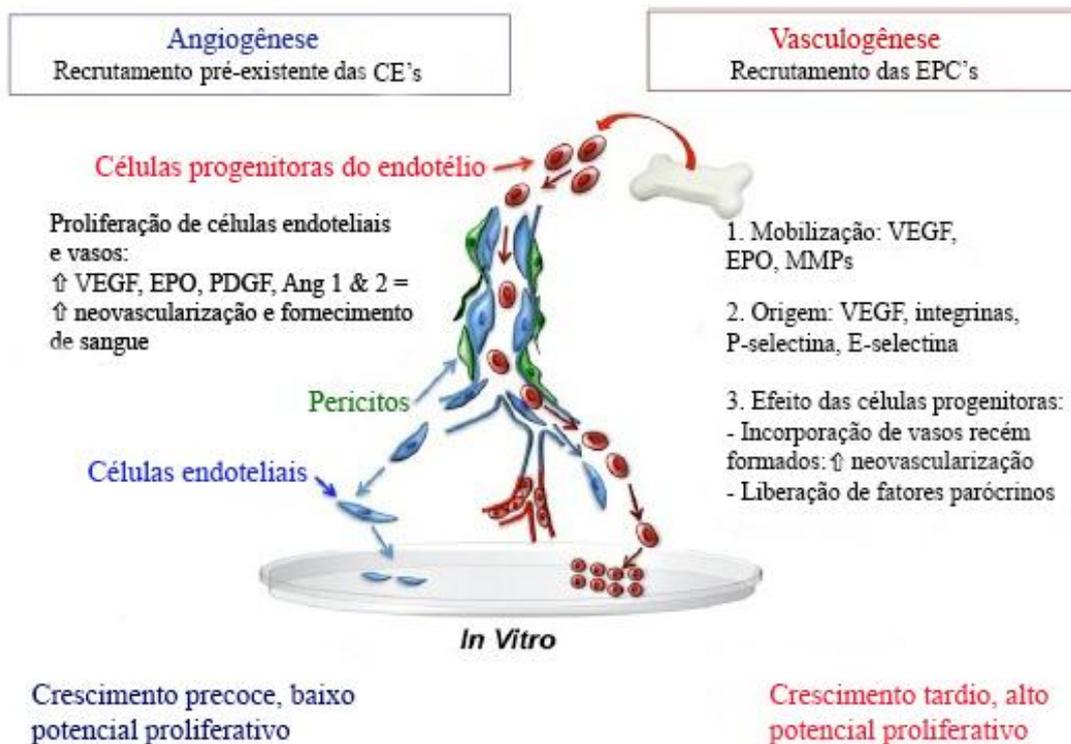


Figura 7: O recrutamento de células endoteliais a partir da parede do vaso pré-existente desempenha um papel crítico na regulação da angiogênese e vasculogênese pós-natal. Mobilizar as EPC's da medula óssea ou dos vasos sanguíneos do cordão umbilical com elevada capacidade proliferativa pode ter o potencial para migrar e incorporar no tecido vascular lesionado. Adaptado de Castillo-Melendez et al. (2013).

A angiogênese, (Cochain *et al.*, 2013), representa o surgimento de micro vasos formados de capilares pré-existent. Os sinais angiogênicos como a hipóxia, os fatores de crescimento ou o NO, quando exposto, ativam as CE's (Cochain *et al.*, 2013). O plasma, quando extravasa proteína, admite a formação de uma matriz provisória para migração das CE's, assim, enquanto o vaso micro vascular é conduzido por CE's para alongar o capilar existente (Cochain *et al.*, 2013).

A angiogênese começa com um aumento vascular da permeabilidade (figura 6), seguido pela membrana basal e extracelular na degradação da matriz através da MMP's. As CE's após iniciarem o processo de diferenciação, migram ao longo das extensões recém-depositadas da matriz extracelular para formar ramificações, assim, o lúmen contendo os vasos é formado e integrado na circulação (Castillo-Melendez *et al.*, 2013).

Estudos apresentam que durante vários anos, o crescimento vascular e a remodelação, pós-natal, foram tradicionalmente explicadas como o resultado da

capacidade proliferativa e migratória de células endoteliais maduras. Desta forma, foi observado que as EPC's diferenciadas brotam nos vasos sanguíneos existentes, dando lugar a nova vasculatura (Miller-Kasprzak e Jagodzinski, 2007). Com a descoberta das EPC's circulantes no SP, provenientes da medula óssea, ampliou-se a visão do processo angiogênico em humanos (Miller-Kasprzak e Jagodzinski, 2007).

O sistema vascular requer constante remodelação e adaptação dinâmica em resposta às necessidades funcionais e, em resposta aos sinais moleculares, por exemplo, segundo (Red-Horse *et al.*, 2007), quando um adulto possui condições de hipóxia-isquemia, tem sido observado que, geralmente, novos vasos sanguíneos são formados. Desta forma, fica subentendido que isto ocorre como resultado do processo de angiogênese, onde há proliferação local, de migração e remodelação das células endoteliais que ocorrem a partir do endotélio maduro pré-existente (Castillo-Melendez *et al.*, 2013).

O processo de angiogênese depende de uma matriz dos fatores de crescimento, as MMP's, além das citocinas e integrinas. Com isso, alguns fatores pró-angiogênicos já foram identificados, incluindo o vascular, o fator de crescimento derivado das plaquetas provenientes do VEGF, EPO e angiopoietina 1 e 2, os quais são fatores independentes (Castillo-Melendez *et al.*, 2013; Miller-Kasprzak e Jagodzinski, 2007). Pesquisas sugerem que a mobilização das EPC's na medula óssea, tem uma função significativa na vasculatura das coronárias e na ocorrência de enxertos vasculares.

O desequilíbrio da angiogênese e anti-angiogênese, que inibe o crescimento de vasos sanguíneos, segundo Mishra *et al.* (2013), poderia ser um dos principais mecanismos patogênicos durante uma lesão, por exemplo cardíaca _ como a pressão alta, isquemia e infarto _ porém, a capacidade de existir restauração através da angiogênese, potencializa a recuperação da lesão.

Para caracterizar e identificar as EPC's, estudos sugerem diversas técnicas de identificação, nas quais marcadores são utilizados para referir às diferentes fases destas células.

2.3 Técnicas de identificação e marcadores das EPC's

A identificação das EPC's é baseada na superfície de células que se manifestam em variados marcadores de proteínas, segundo Miller-Kasprzak e Jagodzinski (2007). Não há definição de apenas um único marcador de EPC's, pois, estas células mostram ser um grupo heterogêneo associados com diferentes perfis de expressão antigênicos da superfície celular.

Em 1997, segundo Wang *et al.* (2013), investigadores demonstraram pela primeira vez, que algumas células progenitoras específicas purificadas com o marcador CD34, sendo positivas hematopoiéticas do sangue periférico podem diferenciar, *ex vivo*, para um fenótipo endotelial; das células então chamadas de EPC's (Wang *et al.*, 2013). Desde então, diferentes marcadores vêm sendo utilizados para descrever o caminho das EPC's, *in vivo* (figura 8 e figura 9).

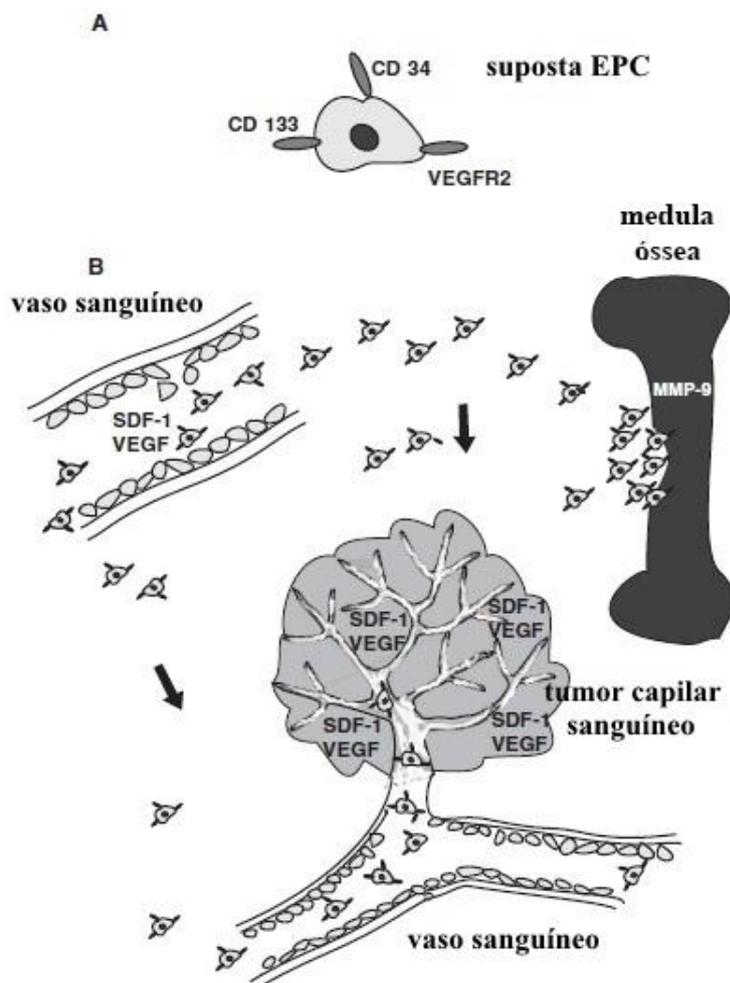


Figura 8: As EPC's estão envolvidas no endotélio na reparação de vasos e na angiogênese tumoral. A - CD34, CD133 e, o receptor vascular do fator de crescimento endotelial 2 (VEGFR2), são considerados marcadores comuns de EPC's. B - aumenta as expressões de matriz metaloproteinase-9 (MMP-9), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), e fator derivado do estroma (SDF-1) são responsáveis pela mobilização e atração de EPC's da medula óssea no SP. As EPC's no SP são incorporadas nas paredes do vaso lesionado durante a reparação da vascularização do tecido. Sob condições patológicas como a hipóxia e o tumor vascular para a supra-regulação de VEGF e expressão SDF, atraem EPC's e aumentam a formação da vasculatura no tumor, esses receptores também são capazes de estimular a proliferação das células endoteliais de forma

parácrina. Adaptado de Miller-Kasprzak e Jagodzinski (2007).

Os marcadores antigênicos mais utilizados para detecção das EPC's são: CD34, CD133, CD146 e KDR ou FLK-1. O CD34, para molécula de adesão; CD133, para superfície antigênio, que é uma glicoproteína da membrana, cuja expressão está relacionada com células-tronco hematopoiéticas de diferenciação em EPC's imaturas, sendo importante no isolamento das EPC's. O CD146 expressa a CE imatura, bem como o FLK-1/KDR ou, o VEGFR-2, que é uma proteína expressa predominantemente na superfície das células endoteliais a qual indica a diferenciação celular precoce (Castillo-Melendez *et al.*, 2013; Miller-Kasprzak e Jagodzinski, 2007; Traish e Galoosian, 2013). Há outros marcadores como: AC133, CXCR4 e CD105, mas que ainda são pouco utilizados (Traish e Galoosian, 2013). Os marcadores CD133, CD34 e KDR, não são exclusivos das EPC's, mas atualmente, são utilizados para distinguir as primeiras progenitoras endoteliais e sua linhagem endotelial (Botham *et al.*, 2013; Castillo-Melendez *et al.*, 2013).

Estudos demonstram que o antigênio de superfície CD34 é partilhado por EPC's, ou seja, identifica as células progenitoras hematopoiéticas e endoteliais maduras, assim, na medida em que as EPC's amadurecem, perdem o marcador CD133 e adquirem o VEGF, receptor 2 (VEGFR2), também conhecido como receptor contendo domínio de inserção da quinase (KDR) (figura 8 e figura 9) (Miller-Kasprzak e Jagodzinski, 2007; Wang *et al.*, 2013).

A EPO é mais um fator que auxilia na contagem de EPC's no sangue periférico e induz à diferenciação das EPC's (Miller-Kasprzak e Jagodzinski, 2007), outros estudos também apontam as estatinas e os inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima via ativação do fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) A-redutase (Miller-Kasprzak e Jagodzinski, 2007).

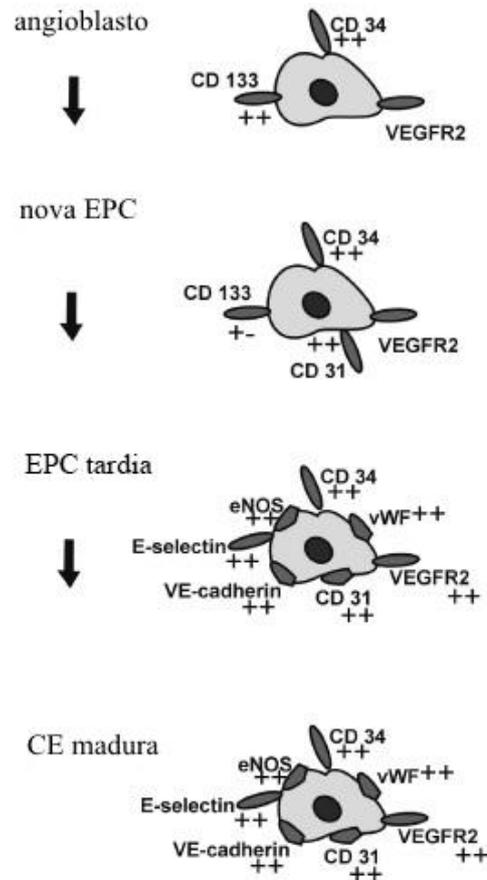


Figura 9: Origem hemangioblastos de EPC's. Esquema proposto da diferenciação de angioblastos em células endoteliais maduras (CE's). Hemangioblastos na medula-óssea que dão origem as EPC's, como CD133+, CD34+ e VEGFR2+ angioblastos. Esquema proposto de angioblasto humano na diferenciação de EPC's ao longo das etapas precoces e tardias. Inversamente ao subgrupo final de EPC's, os primeiros mostraram a expressão nos marcadores CD133 e CD31 e foram negativos para Fator Willebrand (vWF), caderina endotelial vascular (VE-caderina), selectina endotelial (E-selectina), e o expressão síntese óxido nítrico endotelial (eNOS). EPC's maduros ainda exibem expressão do marcador CD34 e não revelam a expressão da proteína CD133. vWF, eNOS, VE-caderina, E-selectina, CD31 e as proteínas são VEGFR2, também expressam em EPC's maduros. ++ e + representam maior e menor expressão do marcador, respectivamente. Adaptado de Miller-Kasprzak e Jagodzinski (2007).

Quando *in vitro*, as EPC's podem ser geradas entre três e cinco dias, a partir do volume de sangue, isso por que estas células, quando “jovens”, produzem mais VEGF (Rehman *et al.*, 2003). O VEGF e as suas funções, são cruciais na reparação cardíaca e, está envolvido na vasculogênese, angiogênese e linfangiogênese (figura 10). A função fisiológica do VEGF é focada, principalmente, no ciclo reprodutivo feminino e no processo de cicatrização de feridas (Miller-Kasprzak e Jagodzinski, 2007).

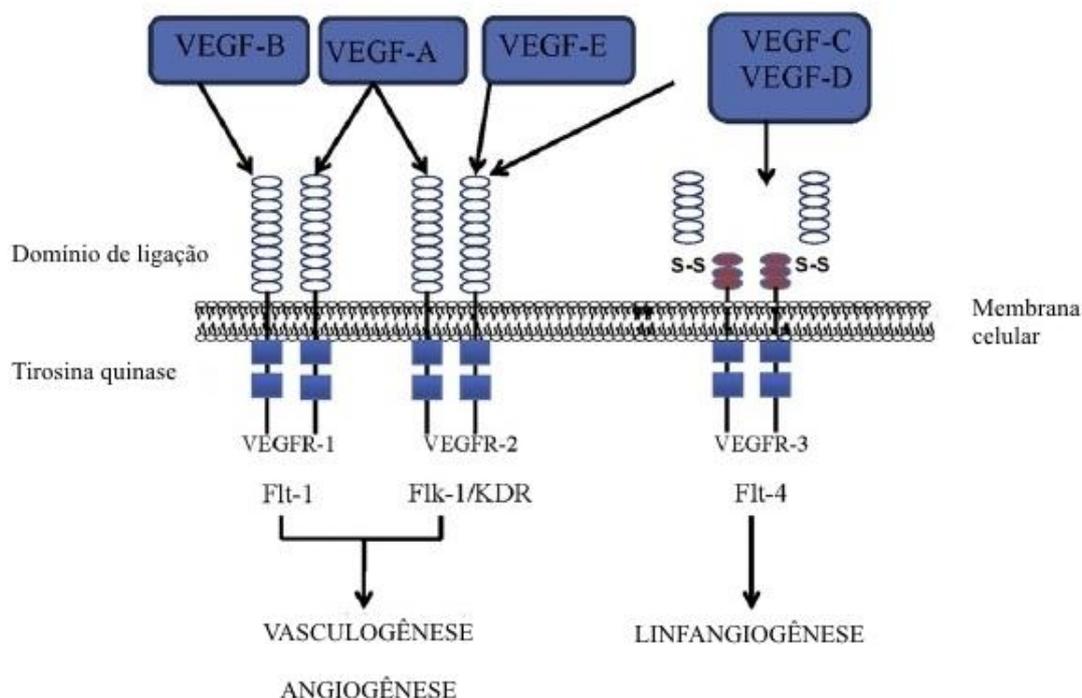


Figura 10: Diferentes efeitos do VEGF após a sua ligação a receptores correspondentes (VEGFR). VEGF1 e 2 up-regula vasculogênese e angiogênese através de Flt-1 e Flk-1/KDR, enquanto VEGF3 aumenta limfangiogenesis através de Flt-4. Adaptado de Mishra et al. (2013).

As combinações dos marcadores CD34 + de VEGFR2 , CD34 + CD133, CD133 + VEGFR2, e CD34 + CD133 + VEGFR2, foram utilizadas por diferentes investigadores que descreveram as EPC's, in vivo (Wang *et al.*, 2013). Em várias tentativas, investigadores descobriram que o dobro de células CD34 –positivas ++ VEGFR2, podem se comportar como EPC's (Wang *et al.*, 2013). Porém, algumas células progenitoras endoteliais maduras podem expressar com os mesmos marcadores. Isso ocorre porque o marcador de célula estaminal, CD133, pode ser mais preciso para definir sub-populações de células que representam as EPC's e não é expresso em células endoteliais maduras, ao contrário do marcador progenitor CD34.

O CD34 duplo positivo + CD133 + EPC's tem alta capacidade proliferativa e dão origem às colônias endoteliais, em cultura, sendo que CD133 + VEGFR2 + células duplo-positivas foram encontradas colonizando as superfícies laminais de assistência ventricular esquerda (Wang *et al.*, 2013). Uma hipótese curiosa é que as células CD133 + CD34 triplos + VEGFR2 + representam EPC's mais primitivas com alto potencial

proliferativo, que depois se transformam em CD133 - CD34 + + VEGFR2 EPC's com capacidade proliferativa mais limitada (Wang *et al.*, 2013).

Com os diversos experimentos dos marcadores para EPC's, mas não exclusivos, houve resultados positivos a especificidades das células, porém, ainda há muito para investigar, pois, estudos sugerem que ao mudar de "fase", as EPC's não respondem ao mesmo marcador induzido para ver o resultado do objetivo inicial. Como exemplo da funcionalidade dos marcadores (figura 11), encontra-se uma caracterização expressa pelos marcadores VEGF e CD 144, referidos nos estudos de Lui *et al.* (2013).

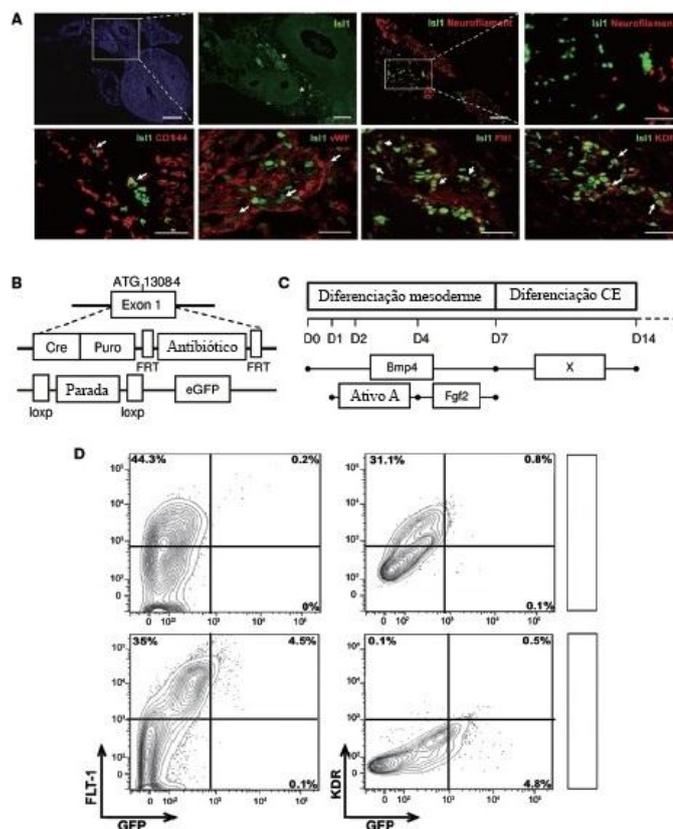


Figura 11: A expressão de receptores de VEGF nas ISL1 + em progenitoras humanas. (A) cortes congelados de um coração fetal humano após 9 semanas de gestação foram coradas para DAPI (barra de escala = 500 μm), ISL1, marcadores específicos de células endoteliais: CD144, vWF, VEGF - A receptor 1 (Flt1) ou 2 (KDR) ou neurofilamento (barra de escala = 50 μm e 10 μm). Células ISL1 + são indicadas por asteriscos brancos (barra de escala = 100 μm) e co-localização de marcadores ISL1 e EC são indicadas por setas brancas (barra de escala = 10 μm). (B) Esquema diagrama que mostra a ISL1 no rastreamento da linhagem construída no ESC's humanos. (C) protocolo de diferenciação utilizado para derivar a ISL1 + progenitores dos ESC's humanos e examina, qual fator angiocrino (X) é responsável pela diferenciação dos progenitores endoteliais. (D) FACS análise que mostra a expressão de VEGFR1 ou VEGFR2 no 4º dia ou 7º dia ISL1 + progenitores humanos. Adaptado de Lui *et al.* (2013).

Para avaliar as EPC's nos vasos sanguíneos, Miller-Kasprzak e Jagodzinski (2007), sugerem a análise de citometria de fluxo com um conjunto de anticorpos para os marcadores de EPC's. Estas células podem ser pré-selecionadas a partir dos vasos sanguíneos do SP, através da técnica imuno-magnética, a qual utiliza micro esferas revestidas com anticorpos contra diferentes marcadores de superfície, principalmente o CD34 e o CD133; este protocolo é realizado em células mononucleares (MNC's) do gradiente de centrifugação da densidade de células através de ficoll.

Outro método de avaliação da EPC's ocorre em ex vivo (Miller-Kasprzak e Jagodzinski 2007), no cultivo de MNC's pré-selecionadas; as células CD34+ de fibronectina ou são revestidas com gelatina na presença de um meio específico em "pratos". Essas EPC's cultivadas aparecem como um tipo de adepto de unidades formadoras de colônias (CFU's), que são obtidas a partir de uma cultura de cinco a sete dias, sendo nomeadas de EPC CFU's iniciais e, a uma cultura de quatro semanas que dá origem a CFU final. Essa colônia é definida, por investigadores, como sendo um grupo de "células redondas" que são acompanhadas por células finas brotando do núcleo do fenótipo endotelial.

A avaliação das propriedades angiogênicas das EPC's, apresentada em outros estudos por Miller-Kasprzak e Jagodzinski (2007), inclui um ensaio de migração e de matriz para a formação de um tubo. O ensaio baseia-se na migração da capacidade quimiotática das EPC's, ou seja, essas células são colhidas, contadas e, novamente suspensas em meio fresco. Depois são transferidas para uma modificação na câmara de Boyden e colocadas na placa de cultura com VEGF recombinante. Assim, durante a incubação, as células migraram para o lado de baixo do filtro, o qual foi lavado e, após a coloração dos núcleos, as células foram contadas.

No ensaio de gel matriz, Miller-Kasprzak e Jagodzinski (2007), as EPC's obtidas após a cultura são colocadas sobre um gel de matriz da membrana basal. Em estudos com esse método, observou-se que após três a sete dias de cultura sobre o gel matriz o número de redes de células endoteliais, designado como tubos, foram detectados e contados, utilizando um microscópio de fluorescência.

As EPC's podem ser isoladas a partir de medula óssea ou sangue periférico. Os dois métodos principais são explorados para purificar e determinar a contagem de EPC's em células mononucleares (MNC's), obtidas a partir da medula óssea e do sangue periférico (figura 12).

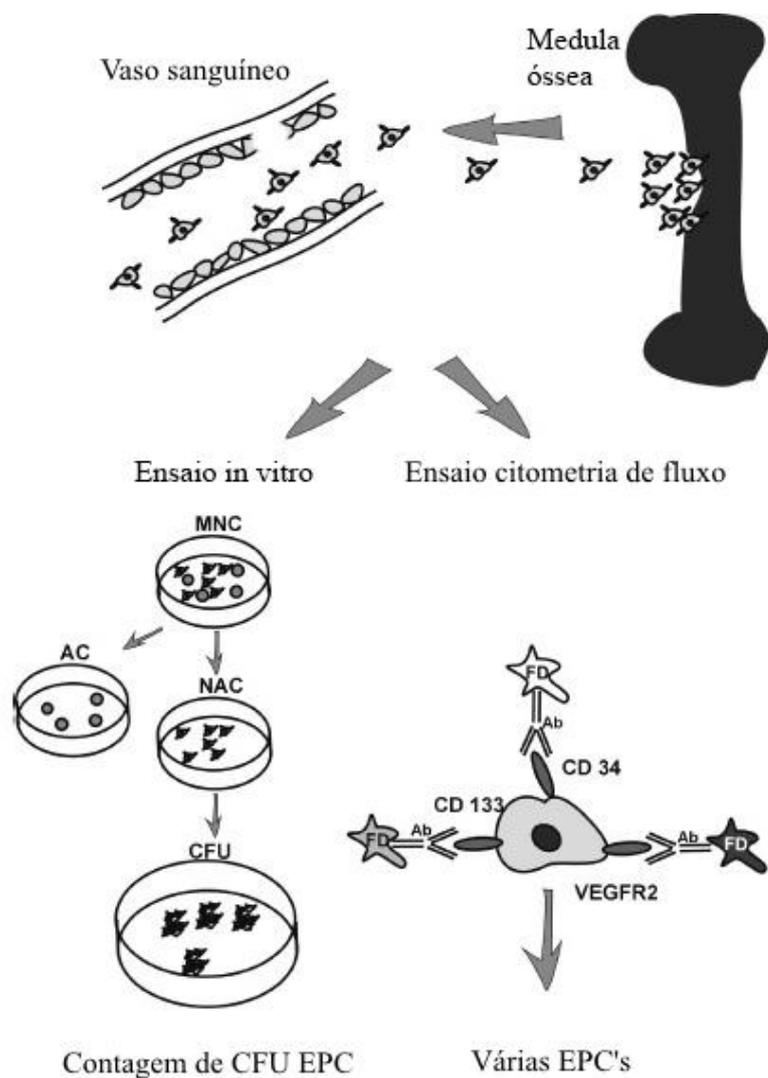


Figura 12: Esquema de isolamento das células da medula óssea nos vasos periféricos. A primeira técnica de avaliação EPC é em ex vivo, cultivo das MNC's ou células CD34+ em fibronectina ou pratos revestidos com gelatina na presença de meio específico. Depois de 2-3 dias de cultura, as células aderentes (ACs) que contêm os monócitos, macrófagos e células endoteliais maduras, são descartadas. As células não-aderentes (NACs), contendo EPC's são colhidas e transferidas para meio fresco. As EPC's cultivadas, aparecem como um tipo de adepto de unidades formadoras de colônia (CFU's) e são contadas usando um microscópio de luz. As EPC's CFU's são geralmente obtidas após 5-7 dias de cultura e designadas como EPC's CFU's iniciais, ao passo que aqueles CFU's formados após 1-4 semanas de cultura são designados como tardia. O segundo método de avaliação EPC's no SP é citometria de fluxo com uma matriz de anticorpos (Ab) dirigidos contra os marcadores de EPC's e conjugados com corantes fluorescentes (FD). Adaptado de Miller-Kasprzak e Jagodzinski (2007).

Ainda não há um consenso sobre as técnicas e os marcadores, apesar de alguns já serem vistos como específicos no processo de diferenciação das EPC's. Isso ocorre,

por não estarem definidas todas as funções desempenhadas por estas células, as quais foram referenciadas no capítulo anterior.

As EPC's podem ser aplicadas a diversas situações, trazendo benefícios aos vasos sanguíneos, ao coração e a órgãos, também são responsáveis por importantes funções no endotélio, porém, algumas situações podem influenciar de forma positiva ou negativa o seu desempenho.

2.4 Aplicações e influências das EPC's

Estudos com EPC's estão sendo cada vez mais investigados, pois, estas células têm uma grande importância na terapia de doenças vasculares, (Miller-Kasprzak e Jagodzinski, 2007), o que se torna importante para regeneração dos vasos no tratamento de doenças e lesões que envolvem o endotélio.

Com o avanço das pesquisas com EPC's, foram observadas as capacidades de expandir estas células sob cultura *in vitro*, assim, com essas condições se tem a perspectiva de EPC's para o uso terapêutico, sendo que, estas células, quando geneticamente modificadas, expandem os progenitores *ex-vivos* (Miller-Kasprzak e Jagodzinski, 2007). Portanto, as EPC's podem tornar-se novos agentes promissores que serão capazes para retornar adequadamente a neovascularização prejudicada em processos sob condições patológicas.

O número de EPC's, assim como sua proliferação, pode mudar sob condições patológicas, além disso, investigadores acreditam que a disfunção do endotélio está associada com o percurso de algumas doenças. Estudos sugerem que estas doenças podem ser: cardiovasculares, diabetes mellitus, artrite reumatóide e transplante vascular. Além disso, indivíduos que tem por hábito fumar (tabaco), apresentam baixos níveis de EPC's (Miller-Kasprzak e Jagodzinski, 2007).

Há hipóteses de que vários fatores estão envolvidos na regulação da quantidade e da funcionalidade das EPC's em circulação. Desses, o mais citado em estudos, é o VEGF, pois, regula a proliferação e diferenciação das EPC's. Um aumento do nível plasmático do VEGF foi observado em várias condições patológicas, incluindo a hipóxia, diabetes e na vascularização de tumores (Miller-Kasprzak e Jagodzinski, 2007). Portanto, alguns fatores podem influenciar a biologia das EPC's, como o exercício físico, o estrogênio, a EPO, as estatinas, a leptina e a proteína C-reativa (figura 13).

Além disso, as EPC's circulantes também podem ser influenciadas, (Obi *et al.*, 2014), pelo inibidor de enzima de conversão da angiotensina, hidroximetil-glutaril-CoA-reductase, proliferação de peroxissomas, insulina, fator de estimulação de colônias de granulócitos (G-CSF), entre outros. Estes fatores podem afetar a mobilização, a adesão, a proliferação e migração da vasculogênese (Obi *et al.*, 2014).

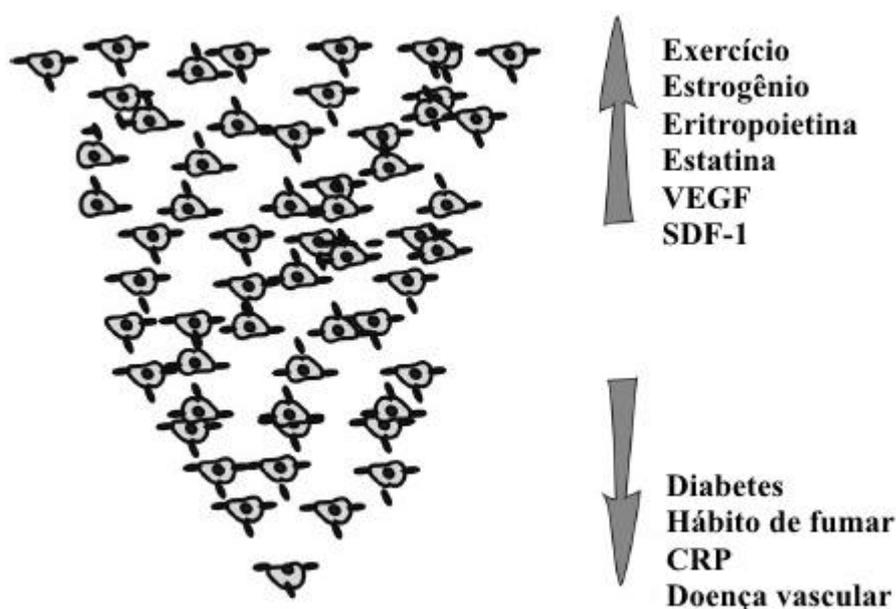


Figura 13: Fatores que influenciam a proliferação das EPC's. As contagens das EPC's no sangue periférico e o seu potencial proliferativo podem mudar sob várias condições: estágios patológicos, incluindo o diabetes, o tabagismo, a CRP, a regulação alta de alguns fatores e, doenças vasculares reduzem a contagem das EPC's e a sua capacidade reparadora. No entanto, os fatores, incluindo o exercício físico, o estrogênio, a EPO, as estatinas, o VEGF e SDF-1, aumentam a quantidade de EPC's e potencializa sua função. Adaptado de Miller-Kasprzak e Jagodzinski (2007).

A CRP está envolvida na regulação negativa na função das EPC's no processo de reparação vascular, assim como a leptina, que pode afetar as funções das EPC's por conter a presença do seu receptor. (Miller-Kasprzak e Jagodzinski, 2007). Estudos sugerem que a mobilização de EPC's pode ser dependente da sinalização mediada pelo NO. Em relação à leptina, foi observado que não há efeito sobre a proliferação de EPC's, mas as migrações das EPC's são afetadas quando há uma concentração elevada desta substância.

Já as estatinas, que são inibidores da biossíntese do colesterol, são capazes de aumentar a contagem de EPC's, *in vitro*, e em animais (*in vivo*). Sobre a eritropoietina,

que é uma citocina produzida pelos rins e responsável pela diferenciação de eritrócitos, quando a sua produção é feita por hipóxia, essa citocina é considerado um fator que regula os níveis de EPC's (Miller-Kasprzak e Jagodzinski, 2007). Também há registros de melhoria da cicatrização óssea, através das EPC's (Henrick *et al.*, 2013).

Para além dos benefícios exercidos pelas EPC's sob condições patológicas, há um fato negativo em suas propriedades, a neovascularização de tumores (figura 11). As EPC's desempenham um papel importante em relação ao crescimento e a angiogênese de tumores em estágios iniciais e, nos estágios tardios as EPC's, (Miller-Kasprzak e Jagodzinski, 2007), concentram-se em áreas periféricas do tumor. A hipóxia do tumor conduz a regulação da expressão do VEGF que resulta na elevação da angiogênese, pois, as células tumorais são capazes de secretar o VEGF de forma parácrina para estimular a proliferação das células endoteliais; durante os processos de neovascularização no crescimento das células do tumor, também é relevante na concepção de novas drogas.

Estudos em pacientes com doenças na artéria coronariana (DAC), (Miller-Kasprzak e Jagodzinski, 2007), possui o número de EPC's e sua capacidade de migração prejudicadas, com o número de células CD34+ derivadas SP-/+VEGFR2. Avaliadas pelo ensaio de citometria de fluxo, verificou-se que a redução das EPC's chegaram a 48% em relação ao grupo controlo (sem DAC). Portanto, a redução no nível de EPC's e a capacidade migratória destas células, são inversamente correlacionadas com o número dos fatores de risco predispostos para o DAC, por exemplo. Além disso, a disfunção endotelial associada à redução da neovascularização reparadora é, também, uma característica da hiperglicemia na diabetes mellitus permanente (Miller-Kasprzak e Jagodzinski, 2007).

Testes em Indivíduos que possuem DAC, realizados por Miller-Kasprzak e Jagodzinski (2007), foram submetidos ao estresse de um único exercício, com objetivo de comparar a quantidade de EPC's no SP, antes e depois da atividade. Com isso, descobriram que a contagem de EPC's no SP aumentou significativamente nesses indivíduos, entre 24-48horas após o exercício. Nesse estudo, foi observado que o aumento dos níveis de EPC's foi acompanhado de uma elevação do plasma VEGF. Sendo o resultado positivo, sugere-se que o VEGF é um fator significativo responsável pela mobilização de EPC's da medula óssea para o SP. Observando que a incidência de doenças cardiovasculares diminui com o treinamento físico, sugere-se uma possível

contribuição das EPC's no desenvolvimento relacionado à diminuição dos distúrbios cardiovasculares (Miller-Kasprzak e Jagodzinski, 2007).

Na vasculatura, a ocorrência de lesões pode ser aumentada por dano endotelial, causando morte celular gerando infiltração de células mononucleares, como macrófagos que leva a secreção de moléculas, bem como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-1 (Wong *et al.*, 2014). A presença de macrófagos, (Wong *et al.*, 2014), causa indução significativa na transcrição de marcadores das CE's, desta forma, acredita-se que há um aumento da expressão da NO sintetase endotelial da superfície celular.

2.4.1 O papel do NO

O NO é um gás mensageiro com implicações em vários órgãos e tecidos, o qual é sintetizado por várias isoformas da síntese do NO (De Palma *et al.*, 2014; Stamler e Meissner, 2001). Além disso, o NO é um radical instável biologicamente ativo, o qual é sintetizado em CE's vasculares pela eNOS o qual depende da sua biodisponibilidade para que haja um equilíbrio entre a própria produção e inativação (Wattanapitayakul *et al.*, 2000). Por ser uma molécula de sinalização versátil no músculo esquelético, o NO é sintetizado a partir do oxigênio e do L-arginina pelo músculo esquelético (Stamler e Meissner, 2001), onde também é gerado através do NO síntese neuronal (nNOS) (De Palma *et al.*, 2014).

O NO tem função importante na regulação da atividade fisiológica no músculo esquelético, (De Palma *et al.*, 2014), como a geração de força, a auto regulação do fluxo sanguíneo e oxigênio adequado para músculos ativos durante a prática de exercício físico, a vinculação excitação-contração, a homeostase do cálcio e o metabolismo bioenergético (Percival *et al.*, 2008; Stamler e Meissner, 2001). Além disso, é o fator determinante na miogênese, o qual regula etapas fundamentais, principalmente quando há uma lesão e o reparo muscular (De Palma e Clementi, 2012; De Palma *et al.*, 2014).

Ressaltando a importância do NO e do estresse oxidativo a contagem e proliferação de EPC's, estudos de Hamed *et al.* (2011), referem que a propagação das EPC's pela glicose elevada pode ser reparada preservando a biodisponibilidade de NO. Um importante regulador para a função e mobilização das EPC's é o NO (tabela I) derivado da eNOS (Fleissner e Thum, 2011). A eNOS está presente na caracterização

das EPC's em várias fases (tabela I), assim como é expresso nestas células, *in vivo*, com importantes consequências funcionais (Fleissner e Thum, 2011; Segal *et al.*, 2006).

Tabela I: Expressão eNOS em vários subtipos de EPC's. Adaptado de Fleissner e Thum, 2011.

Tipo de EPC	Espécies	Expressão eNOS mRNA	Expressão proteína eNOS	Atividade eNOS
Nova EPC	Mouse	+	+	Não testada
CFU-EPC		Não testada	+	
Nova EPC	Canina	Não testada	+	Não testada
Nova EPC	Humana	Não testada	+	Não testada
Nova EPC (AC133- /CD14+)	Humana	Não testada	+	Não testada
Nova EPC	Mouse	Não testada	+	Não testada
EPC embrionária	Primata	Não testada	+	Não testada
Nova EPC	Humano	Não testada	—	Não testada
EPC tardia		Não testada	+	+
Nova EPC	Humano	+	+	+
Nova EPC	Rat	Não testada	+	Não testada
Nova EPC	Mouse	+	Não testada	Não testada
Nova EPC	Mouse	Não testada	+	Não testada

A eNOS gera moléculas de NO, com capacidade vaso protetora, a qual desempenha função no controlo da homeostasia vascular (Fleissner e Thum, 2011). Estudos sugerem que a eNOS está presente nas EPC's (figura 14) em condições tanto fisiológico como fisiopatológico (Fleissner e Thum, 2011; Thum e Bauersachs, 2005). Isso porque as funções das EPC's são melhoradas através de compostos que aumentam a expressão do eNOS. Gulati *et al.*, 2003, sugere que a formação de vasos através das EPC's (figura 14), em cultura, pode depender do eNOS.

O músculo esquelético é seletivo nos parâmetros que ocorrem durante a prática do exercício físico, entretanto, todo esse aporte é afetado quando há alteração do NO (De Palma *et al.*, 2014). Um exemplo observado durante alguns estudos, mostrou que os músculos que possuem ausência de nNOS tendem a ser menores em relação ao outros. Com isso, De Palma *et al.* (2014), explica que a redução da massa muscular não é apenas atribuído a diminuição dos tecidos, incluindo o adiposo, e da massa muscular, mas sugere que há uma redução específica no tamanho das próprias fibras musculares.

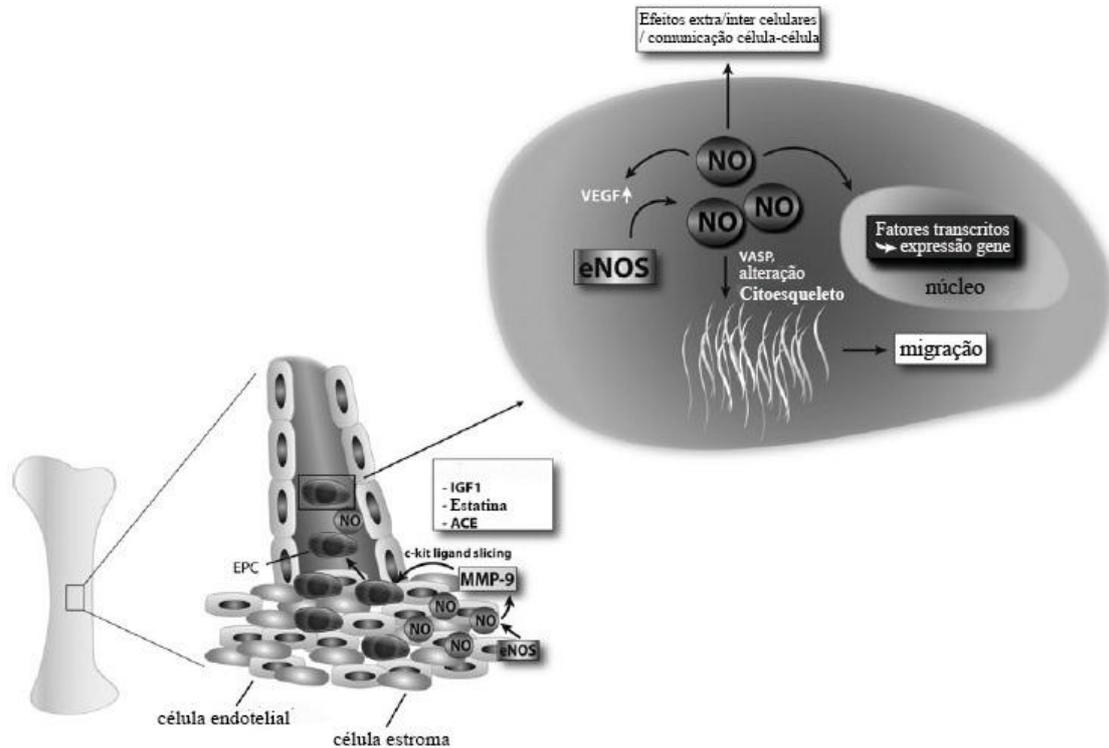


Figura 14: Mobilização de EPC's da medula óssea e a importância do NO para a biologia das EPC's. Diversas substâncias podem contribuir através de um aumento da biodisponibilidade para a melhoria do número e função das EPC's circulantes. Este aumento de NO leva a aprimorada atividade de MMP-9 e subsequente c-kit "slicing" ligando na medula óssea que resulta em aumento da liberação das EPC's. O aumento dos níveis intracelulares de NO nas EPC's, pode mudar o citoesqueleto e o gene de transcrição, levando a um aumento da capacidade migratória e melhora funcional. Adaptado de Fleissner e Thum (2011).

A nNOS é também expressa no músculo esquelético (Pedersen e Febbraio, 2008), além disso, estudos sugerem que o NO, também presente no músculo esquelético, possui um aumento significativo durante a contração muscular, (Grange *et al.*, 2001), sendo regulador de alguns eventos, como a IL-6 durante o exercício físico (Pedersen e Febbraio, 2008).

2.4.2 A interleucina 6 (IL-6)

O músculo esquelético é o maior órgão do corpo humano. Quando contraído, o músculo esquelético segrega várias substâncias, por isso, vem sendo reconhecido como um órgão que produz e libera citosinas (miocinas), (Pedersen e Febbraio, 2008), com isso, pode influenciar no metabolismo de outros órgãos e tecidos. Por essa questão, alguns estudos sugerem que o músculo esquelético é um órgão endócrino.

No ano de 2000, segundo Pedersen e Febbraio (2008), foi observado que a contração do músculo esquelético humano, liberta quantidades significativas de interleucina (IL-6), durante exercício físico (Pedersen e Febbraio, 2011; Steensber *et al.*, 2000). Desta forma, foi sugerido que o IL-6 pode apresentar funções metabólicas, pois, estudos demonstram que há aumento, de até 100 vezes da sua concentração plasmática durante o treino muscular (Fischer, 2006; Pedersen e Febbraio, 2008). Entretanto, esse aumento de IL-6 no plasma não é constante durante o treino (Fischer *et al.*, 2004). Estudos observaram que esse aumento é mais notável no final ou após o término do exercício físico (Fischer *et al.*, 2004).

A IL-6 é uma citosina inflamatória, por isso, havia a hipótese de que sua resposta estava relacionada com lesão muscular (Pedersen e Febbraio, 2008). Porém, estudos demonstraram que o fator determinante para o aumento do IL-6 no plasma (figura 15), é a combinação intensidade, modo e duração do exercício físico (Pedersen e Febbraio, 2008). Estudos sugerem que o maior aumento do IL-6 é promovido pelo exercício concêntrico e, não excêntrico, o qual pode apresentar resultado inverso, ou seja, a diminuição desta citosina no plasma (Pedersen e Febbraio, 2008).

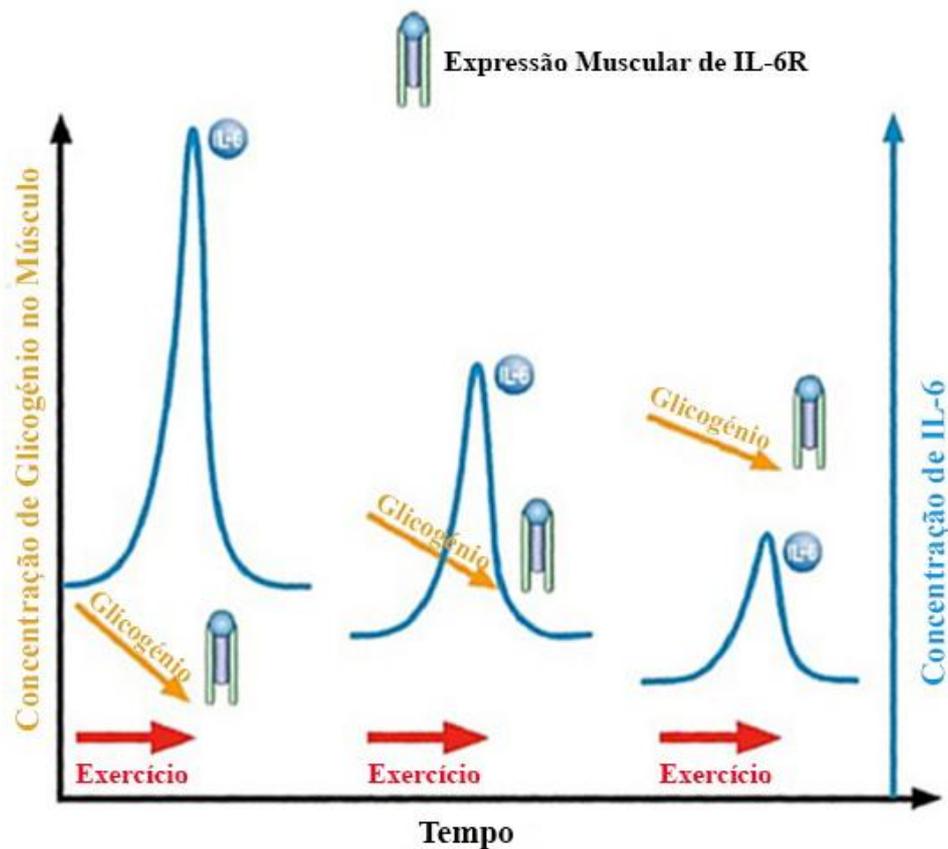


Figura 15: Modelo de como IL-6 é regulado em resposta a adaptação ao treinamento. O exercício regular leva a uma melhoria da síntese de glicogênio e, de um músculo treinado que irá, consequentemente, armazenar mais glicogênio muscular. Durante o exercício agudo, o músculo não treinado é altamente dependente de glicogênio como substrato, enquanto que conduz a formação do aumento de enzimas de oxidante e uma capacidade reforçada para oxidar a gordura e, portanto, a utilização de gordura como substrato durante o exercício. Este significa que o músculo treinado utiliza menos glicogênio durante o trabalho. A ativação de IL-6 no músculo é dependente de glicogênio. Em condições de baixo glicogênio muscular, a taxa de transcrição de IL-6 é mais rápida e, relativamente mais IL-6 é produzido ao mesmo trabalho referente em comparação com as condições de um glicogênio muscular elevado. Assim, a resposta aguda do IL-6 no plasma é menor em treinados versus um sujeito inexperiente. Os mecanismos em que o plasma basal de IL-6 é diminuída por formação e através do qual a expressão muscular dos receptores IL-6 (IL-6R) é reforçada, não são totalmente entendido. No entanto, afigura-se que um músculo treinado pode ser mais sensível ao IL-6. Adaptado de Pedersen e Febbraio, 2008.

A IL-6 também pode ser influenciada pelos inibidores da enzima cicloxigenase (COX), que reduzem a produção de prostaglandina E2 (PGE2) (Trappe *et al.*, 2011). Um aumento agudo de IL-6 está associado à redução da massa muscular, (Hall *et al.*, 2008), e pode causar atrofia muscular (Gonzalo-Calvo *et al.*, 2012; Trappe e Liu, 2013).

2.4.3 A relação COX e Ibuprofeno

A atividade da COX e das prostaglandinas (PG) estão envolvidas no músculo esquelético nos mecanismos de proliferação, diferenciação e síntese de mioblastos, (Shen *et al.*, 2005), bem como na regeneração muscular (Shen *et al.*, 2005). As PGs produzidas pela COX regulam diversos processos, (Simmons *et al.*, 2004), como o metabolismo de proteínas musculares (Trappe *et al.*, 2011). Com isso, as PGs regulam as adaptações musculares ao exercício, mas quando a COX é inibida por fármacos, podem alterar de forma aguda, a resposta do exercício físico (Trappe e Liu, 2013).

Quando há inibição do COX, a atividade muscular e a hipertrofia realizada por sobrecarga são dificultadas (Soltow *et al.*, 2006). Os inibidores da COX são os fármacos, acetaminofeno, Ibuprofeno e aspirina, os quais são bastante consumidos pelos indivíduos, em diferentes idades (Trappe e Liu, 2013). Estes não são inibidores específicos, ou seja, podem bloquear tanto COX-1 como COX-2 (Trappe e Liu, 2013). Isso porque a COX possui duas isoformas, a COX-1 e COX-2 (Simmons *et al.*, 2004), tendo sido posteriormente identificada uma terceira, a COX-3 (Trappe e Liu, 2013).

Estudos, em humanos, com o uso do Ibuprofeno, demonstraram a necessidade da COX-2 e PGE2 para estimular a síntese de proteínas na musculatura após o exercício físico (Trappe *et al.*, 2001). A expressão de COX-2 é regulada pelo NO, em diferentes tipos de células (Soltow *et al.*, 2006).

A COX-2 expressa transcrição em uma variedade de células, como fibroblastos, macrófagos e células vasculares (Soltow *et al.*, 2006). Em outros estudos, a COX-2 é sugerida como sendo uma mediadora da angiogênese no músculo esquelético, isso porque, segundo (Shen *et al.*, 2005), a proliferação e diferenciação celular, dependem da fusão em COX-2.

Estudos observaram que a PG pode ser produzida através da contração muscular durante o exercício físico. As investigações sugerem que ainda são limitadas as informações sobre a síntese de proteínas musculares, bem como o metabolismo da PG em repouso ou após o exercício físico, como resposta do consumo oral de inibidores da COX (Trappe *et al.*, 2011).

A relação da COX com exercício físico e o músculo esquelético, ainda não estão bem definidas. Os estudos mostram divergências em seus resultados comparados a outros realizados com o mesmo objetivo. Isso pode ocorrer por diversos fatores que podem influenciar na toma de um fármaco e como ele irá agir em diferentes

“patologias”. Pois, como explicado anteriormente, falta esclarecimento da ação da COX-1 e COX-2 em relação a esse evento.

2.5 A relação exercício físico aeróbio e EPC's

A eficiência do exercício físico é provada, em diversos estudos e observações, desde 1953, como referem Schuler *et al.* (2013), em seu estudo. O exercício físico induz o aumento da concentração de NO. Além disso, é capaz de mobilizar as EPC's da medula óssea, elevando-as temporariamente na circulação periférica, onde essas células secretam fatores pró-angiogênicos, como o VEGF, que estimula paracrinamente, os processos de vasculogênese e angiogênese (Asahara *et al.*, 1997). O VEGF é um fator significativo responsável pela mobilização de EPC's da medula óssea para o SP. Esse fator parece ser dependente da ativação do eNOS para ativar o mecanismo de mobilização (Schuler *et al.*, 2013).

O NO é responsável pela vasodilatação, assim, resulta na diminuição da resistência periférica e aumento da perfusão (Schuler *et al.*, 2013). Com isso, a principal fonte do NO, o eNOS, é regulada por um aumento na tensão de cisalhamento mediada pelo fluxo associada pelo exercício físico, isso ocorre devido a regulação intracelular (Schuler *et al.*, 2013). Vários estudos sugeridos por Schuler *et al.* (2013), em cultura de célula, animais ou humanos, demonstram que o exercício físico é um dos fatores que regula a atividade do eNOS.

O exercício físico melhora a função e a regeneração do sistema cardiovascular e do músculo esquelético, ativando e mobilizando as células-tronco ou através do recrutamento de células estaminais do sangue circulante, (Wahl *et al.*, 2008), ou seja, das células progenitoras. Pois, esse tipo de células são ativadas para induzir a regeneração ou o crescimento, do vaso ou tecido, a depender do órgão ou do tecido. Isso ocorre, por que o exercício físico provoca estímulos mecânicos, metabólicos e hipóxia, além de induzir a liberação de vários fatores de crescimento, citosinas e hormônios (Adams *et al.*, 2004; Miller-Kasprzak e Jagodzinski, 2007; Wahl *et al.*, 2008).

O exercício físico aeróbio induz como resultado, adaptações moleculares que melhoram o desempenho físico, tanto em condições de transporte de energia como situações de prevenção ou reabilitação. Deste modo, implica-se que os processos de crescimento devem ocorrer no músculo cardíaco e no músculo esquelético, os quais dependem da formação de novos vasos sanguíneos para reparação ou substituição das

células que sofreram apoptose celular, o que ainda está a ser estudado. Há mecanismos que quando induzidos pelo exercício físico aeróbio, melhoram o suporte de células-tronco e reparam o músculo cardíaco, vascular e esquelético (WAHL *et al.*, 2008). Desta forma, novos vasos sanguíneos são formados, irrigando o músculo esquelético, além de melhorar na vascularização.

Entretanto, estudos apontam que a resposta das EPC's ao exercício físico aeróbio, depende da intensidade em que são realizados. A partir de protocolos, Silva *et al.* (2012), classificaram os exercícios em três categorias: exercício de longa/ultralonga duração, como meia-maratona, maratona e ultramaratona; exercício de intensidade máxima, como teste ergométrico convencional; e, exercício de intensidade submáxima, que utiliza o limiar anaeróbico como objetivo. Nesse estudo, Silva *et al.* (2012), mostrou que o exercício físico mobiliza as EPC's em todas as intensidades, sendo que, no exercício de longa/ultralonga duração, houve um aumento mais acentuado das EPC's, enquanto nos exercícios máximo e submáximo, o aumento destas células foi notado durante, apenas, primeira hora de duração.

Apesar do avanço nas pesquisas com as EPC's, o conhecimento atual sobre a biologia destas células ainda não está claro, isso porque há indicativos de que as EPC's representam uma população heterogênea e ainda indefinida (Miller-Kasprzak e Jagodzinski, 2007). A contagem e funcionalidade das EPC's podem ser afetadas por condições patológicas ou fisiológicas; sendo que estas fases estão associadas com as mudanças na produção e ação de vários fatores, incluindo hormônios e os fatores de crescimento, os quais determinam a biologia das EPC's, apesar disso, já há fármacos que possuem a capacidade de regular a função destas células, o que sugere o uso das EPC's na terapia de vasos sanguíneos e no tratamento do câncer (Miller-Kasprzak e Jagodzinski, 2007).

2.6 Exercício físico aeróbio, EPC's e Ibuprofeno

Em estudos anteriores do nosso grupo de trabalho estudamos o efeito do Ibuprofeno nas EPC's do sangue periférico induzidas pelo treino aeróbio. O estudo foi realizado em ratos Wistar machos que realizaram um treino aeróbio em tapete rolante durante oito semanas com e sem administração de Ibuprofeno. Após este tempo foi colhido sangue e quantificadas as EPC's no sangue periférico utilizando marcadores de

células indiferenciadas (CD34 e CD133) e com características de células endoteliais (CD146 e KDR). Os resultados (que podem ser vistos nos gráficos 1 e 2 seguintes) mostraram que a administração de Ibuprofeno aumentava o número de células indiferenciadas CD133+ bem como das KDR+ ao contrario do que se verificava com os restantes grupos. Estes resultados foram reforçados pelo número de capilares musculares em que o efeito do Ibuprofeno foi uma vez mais no sentido da diminuição enquanto apenas o exercício aumentava de forma acentuada a relação capilar/fibra. Também os valores de VEGF se encontravam diminuídos no grupo de animais que foi treinado com concomitante administração de Ibuprofeno.

Estes resultados mostram uma acção de “travão” do Ibuprofeno na vascularização muscular esquelética promovida pelo treino aeróbio (Dissertação de mestrado de Ivo Costa; Costa, 2014).

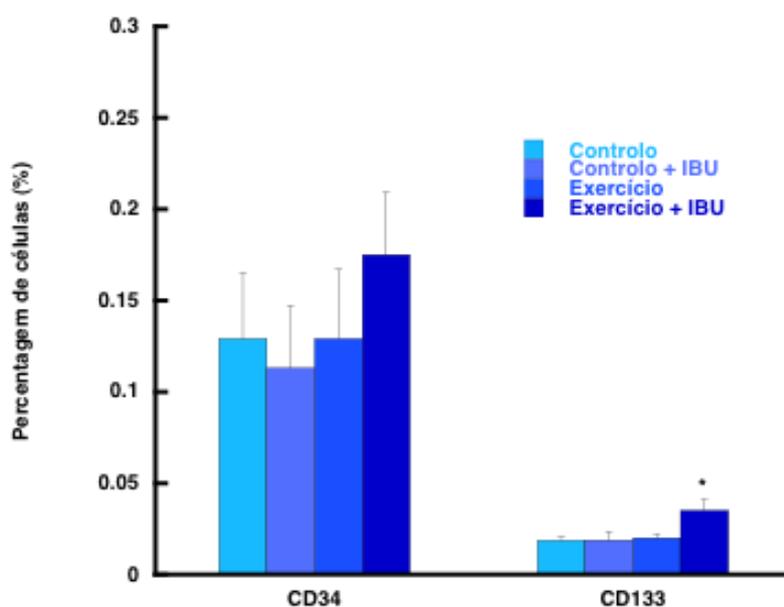


Gráfico 1: Percentagem de células marcadas com CD34 e CD133 em sangue total de ratos controlo (n=8); Controlo com administração de Ibuprofeno (controlo +Ibuprofeno; n=6); ratos treinados (exercício; n=10) e Exercício com administração de Ibuprofeno (Exercício + Ibuprofeno; n=10). O Ibuprofeno foi administrado por via oral, diariamente na dose de 40 mg.Kg⁻¹. As barras representam médias e as linhas verticais o erro da média. *p<0.05 relativo aos restantes grupos com a mesma marcação (Costa, 2014).

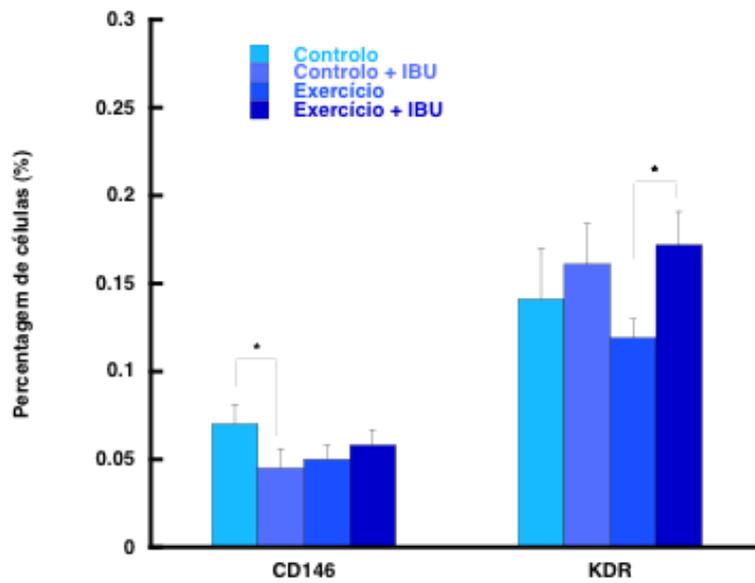


Gráfico 2: Percentagem de células marcadas com CD146 e KDR (Flk1) em sangue total de ratos controlo (n=8); Controlo com administração de Ibuprofeno (controlo +Ibuprofeno; n=6); ratos treinados (exercício; n=10) e Exercício com administração de Ibuprofeno (Exercício + Ibuprofeno; n=10). O Ibuprofeno foi administrado por via oral, diariamente na dose de 40 mg.Kg⁻¹. As barras representam médias e as linhas verticais o erro da média. *p<0.05 entre os grupos assinalados (controlo vs Controlo + Ibuprofeno; para CD146 e Exercício vs exercício + Ibuprofeno para o KDR (Costa, 2014).

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Tal como referimos na introdução, em trabalhos anteriores, verificamos que há evidências de que o exercício físico aumenta o número de células progenitoras derivadas da medula óssea na circulação contribuindo para um aumento da vascularização do músculo. Porém, o Ibuprofeno parece ter um efeito de travão nestes benefícios do exercício aeróbio.

O Ibuprofeno é um dos anti-inflamatórios não esteroides mais usado em academias de modo a diminuir a dor e aumentar o tempo de exercício. Por esta razão, é pertinente estudar os seus efeitos.

Objetivo Geral:

Tendo em consideração o exposto, pretendemos neste trabalho verificar o mecanismo envolvido no efeito de frenagem do Ibuprofeno no processo de vascularização do músculo esquelético promovido pelo exercício físico.

Objetivos Específicos:

- Avaliar os níveis de NO (circulantes e musculares) e a sua relação com os níveis plasmáticos de VEGF;
- Avaliar os níveis de IL-6 circulantes e musculares.
- Encontrar uma possível explicação para os efeitos do Ibuprofeno nas EPC's através do mecanismo NO/VEGF/IL-6.

CAPÍTULO III
METODOLOGIA

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho do estudo

Este estudo está integrado num projeto mais alargado havendo uma contribuição de vários investigadores para o trabalho comum, sem o qual, nenhuma das dissertações e teses poderiam ser executadas. Assim, a metodologia será apresentada como: metodologia comum e uma metodologia específica deste trabalho.

4.2 Caracterização dos animais em estudo

Neste trabalho foi utilizada, como referido, uma metodologia de base e de colaboração comum entre vários investigadores. Foram utilizados ratos Wistar adultos, machos com massa corporal compreendida entre 200 - 250g, sendo mantidos quatro a cinco por gaiola em uma sala com temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), luz/escuro (12horas) e humidade ($50 \pm 10\%$), controlada; com água e comida *ad libitum*; sendo monitorada a quantidade de alimentos ingerida diariamente.

Com o intuito de minimizar o stress do ambiente, todo cuidado, foi adotado com os animais utilizados nos experimentos. Estes foram realizados de acordo a Convenção Europeia sobre a proteção dos animais.

Os animais foram divididos em quatro grupos. Um grupo controlo ao qual foi administrado apenas solvente; Um segundo grupo controlo com administração oral de ibuprofeno (40mg/Kg); um grupo com exercício físico e outro com exercício físico mais ibuprofeno (40mg/kg). O exercício físico baseou-se num treino aeróbio durante oito semanas. Durante esses período, foram administradas doses de ibuprofeno diariamente por via oral, 15 minutos antes do exercício físico. Foram administrados sempre os mesmos volumes de solvente ou fármaco. A formulação comercial do ibuprofeno utilizado foi “Brufene®”, dissolvido em suco de laranja, como recomendado para tratamento humano. Todos os animais em estudo foram pesados semanalmente.

4.3 Protocolo de treino dos animais

Os animais, grupo com exercício e exercício mais ibuprofeno, foram submetidos ao treino aeróbio, em uma esteira, durante oito semanas, de acordo com o

método proposto por Fontes Ribeiro et al. (2011). Os grupos controles realizaram exercício físico, em esteira, durante o mesmo período do protocolo, porém, apenas 10 minutos por semana, de modo a manter a coordenação motora e para evitar interferências do sistema nervoso central. O treinamento dos animais iniciou em baixa velocidade durante 10 minutos; sendo aumentado o tempo, a velocidade. A partir da sexta semana foi introduzida inclinação no protocolo.

2.5 Obtenção dos músculos para estudo

Após a realização do protocolo de exercício, oito semanas, os animais foram sacrificados por sobre dosagem de pentobarbital sódico. Os músculos da pata traseira, nomeadamente o gastrocnêmios, foram removidos cuidadosamente por corte das zonas tendinosas de inserção. Removido o tecido adjacente, as amostras foram armazenadas a -80°C .

4.5 Obtenção das amostras de plasma

Com os animais sob anestesia, foi colhido sangue venoso da veia jugular. O sangue total foi centrifugado, o plasma separado e guardado a -80°C até ao momento da sua análise.

4.6 Metodologia específica deste trabalho

4.6.1 Doseamento de Nitritos/Nitratos em músculo e plasma

O músculo gastrocnêmio medial foi descongelado e da parte medial de cada gastrocnêmio foi usado apenas um pequeno fragmento de tecido.

Para amostra com o músculo gastrocnêmio, foi utilizado 10 mg do músculo mais 110 μl de soro fisiológico, misturou-se no vortex por 30 segundos, formando um sobrenadante que foi colhido e reservado. Com o plasma, foi utilizado 100 μl de plasma mais 100 μl de diluente, também misturado no vortex. Esses processos foram realizados para todas as amostras. Ambas as amostras, soro e plasma, foram diluídas mais uma vez com adição de 100 μl de diluente de reação em cada.

O NO é gasoso e possui uma vida curta, in vivo, de apenas alguns segundos. Sendo assim, para obter a concentração do NO em sobrenadantes de tecidos ou plasmas,

é quantificado, não o NO, mas o nitrito (NO₂⁻) e o nitrato (NO₃⁻) que são as espécies químicas estáveis em que este se converte. Para isto, foi utilizado o *kit* comercial “*Total NO/Nitrite/Nitrate*” método espectrofotométrico (*R & D Systems*).

4.6.2 Preparação dos reagentes

Todos os reagentes foram preparados e expostos à temperatura ambiente (21°C), antes de iniciar os procedimentos. Para o diluente de reação, foi adicionado 30 ml de diluente reação concentrado em 270 ml de água ultrapura, para preparar 300ml de diluente de reação que foi reservado com fecho de papel de parafina, aguardando a utilização.

Para o doseamento de nitrato, foi preparado o reagente nitrato redutase diluído em quantidades resultantes de fórmulas indicadas pelo próprio *kit*, de acordo ao número de poços a ser utilizado nas placas. Com isso, foi 1560µl de diluente de reação mais nitrato redutase, transferido para um tubo de ensaio e, passado pelo vortex. Este foi armazenado em gelo para uso após o período de 15minutos. O nitrato redutase constitui de 1,0ml do diluente armazenado, passando rigorosamente pelo vortex e deixado repousar por 15minutos à temperatura ambiente. Depois, vortex novamente e repousar por mais 15minutos à temperatura ambiente. Após esse período, é passado mais uma vez no vortex e utilizado imediatamente. Para formar o reagente NADH, constitui de 5,0ml de água ultrapura, deixando agir por três minutos com agitação suave. Foi armazenado no gelo para utilização.

Para preparação da curva de padrões de nitrito, foram utilizados sete tubos, 900µl de diluente reação e 2000µmol/L da solução padrão de nitrito/nitrato. No primeiro tubo foi pipetado 900µl de diluente reação mais 100µL de solução padrão, a partir desse, foram transferidos 500µl da mistura para os restantes seis tubos, como mostra na figura abaixo. Cada tubo foi bem misturado para produzir uma série de diluições, do mais concentrado para o menos concentrado (figura 16).

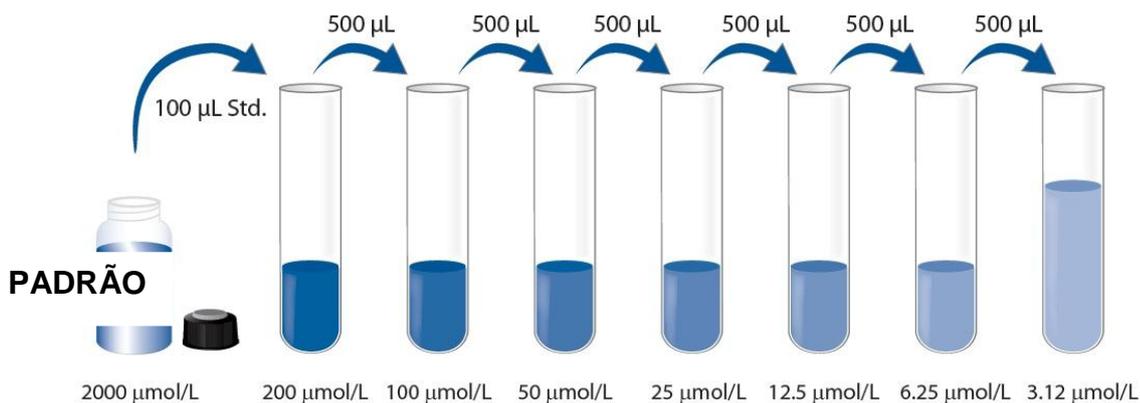


Figura 16: Diluição dos reagentes.

Para medir a concentração de nitrito presente na amostra, separamos os reagentes e amostras a serem utilizadas expondo-as à temperatura ambiente (21°C). Lembrando que todas as amostras (músculo e plasma) foram triplicados na placa.

Nos poços brancos, foi adicionado 50µL de diluente de reação. Em seguida, acrescentou-se 50µL de solução padrão ao restante dos poços. Em todos os poços, foi adicionado 50µL de diluente de reação mais 50µL de reagente de *Griess* I mais 50µL de reagente de *Griess* II. Depois de misturado suavemente, a placa foi incubada à temperatura ambiente durante 10 minutos. Lembrando que o reagente de *Griess* é um produto químico que detecta a presença de compostos orgânicos do nitrito. Após a incubação, a placa foi colocada na máquina de leitura de microplacas em 540nm, para determinar a densidade óptica de cada poço.

Com todos os reagentes preparados, em uma segunda placa, foi adicionado 50µL de diluente reação em todos os poços brancos. Nos restantes dos poços, acrescentou-se 50µL de reagente padrão e, 25µL do reagente NADH em todos os poços, bem como nitrato redutase diluído. Misturou-se e cobrimos com uma fita adesiva, acompanhante do kit, apropriada para o objetivo.

A placa foi incubada à 37°C por 30minutos. Após esse período, adicionou 50µL de reagente Greiss I e 50µL de reagente Greiss II, ambas em todos os poços e misturando bem. A placa foi incubada em temperatura ambiente (21°C) por 10minutos e, em seguida, levada para análise em um leitor de microplacas à 540nm. Ressaltando, que todas as amostras (músculo e plasma), foram duplicadas para avaliação.

4.6.3 - Análise muscular e plasmática da IL-6

Após descongelamento das amostras plasmáticas em temperatura ambiente de (22 ± 1 °C) e procedeu-se à preparação das amostras de tecido, muscular gastrocnêmio, o qual foi homogeneizado 10mg de tecido em 200µl de soro fisiológico. As amostras passaram por uma micro-centrifugadora (Biofuge Pico, Heraeus) a 1300 rpm durante cinco minutos, a fim de se obter como resultado final um sobrenadante para efetuar as análises.

O doseamento de IL-6 foi realizado por um kit comercial “Rat IL-6 Immunoassay” (R&D® Systems), que se baseia no método de ELISA “Enzyme Linked Immunosorbent Assay). A quantificação é feita por imunoabsorvância, através da ligação de IL-6 contida no plasma dos ratos com o anticorpo presente na microplaca.

O processo de preparação do kit foi feito de acordo com as recomendações do fabricante, mantendo as amostras e os reagentes sob temperatura ambiente de (22 ± 1 °C). As amostras e os padrões foram analisados em triplicado. A média final foi calculada pela média dos resultados triplicados.

Após preparação de todos os reagentes padrão, adicionou-se 50µl do diluente (RD1-54) em cada poço, em seguida foi adicionado mais 50µl das amostras a cada poço. A microplaca foi vedada e incubada em temperatura ambiente, protegida da luz, durante 2 horas. Causando assim a ligação da IL-6 presente nas amostras com o anticorpo fixado na microplaca.

Após duas horas, cada poço da microplaca foi lavado e aspirado de forma automatizada com tampão de lavagem, passando por um total de cinco lavagens, a modo de remover quaisquer substâncias que não tenham sido ligadas ao anticorpo presente na microplaca. Em seguida foi adicionada a cada poço 100µl da solução (Rat IL-6 Conjugate) e, novamente após cobrir a microplaca com um novo adesivo, esta foi incubada sob temperatura ambiente e proteção de luz por um período de 2 horas. Ao término deste tempo, foi novamente repetido o número de lavagens e processo de aspiração, como descrito anteriormente.

Adicionou-se em seguida 100µl da solução substrato a cada poço, deixando incubado sob proteção da luz por mais 30 minutos. Ao final deste processo, foi adicionado a cada poço 100µl de solução STOP (solução diluída de ácido clorídrico), a fim de cessar a reação causada pela solução substrato, efetuando leve agitação para assegurar que ocorra uma completa mistura. A determinação da densidade ótica foi feita

com recurso de um leitor de placas com absorvância a 450 nm, com correção do comprimento de onda para 540 nm.

4.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney para comparação entre duas variáveis relacionadas. Este teste é sugerido por ser condizente no número das amostras e ser indicado para verificar dois grupos em um só momento. Foi utilizado o intervalo de confiança de 95%.

CAPÍTULO IV
RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tal como referido no capítulo anterior, este estudo é um ramo de um projeto mais alargado. Por esta razão há resultados que são comuns a vários trabalhos por serem à base do raciocínio geral. Assim, a caracterização da amostra é parte integrante e obrigatória de todos os trabalhos derivados do projeto central.

Como anteriormente indicado na metodologia, todos os animais foram pesados semanalmente antes do início do treino. Os valores da massa corporal dos animais em estudo podem ser analisados através do gráfico seguinte (gráfico 3).

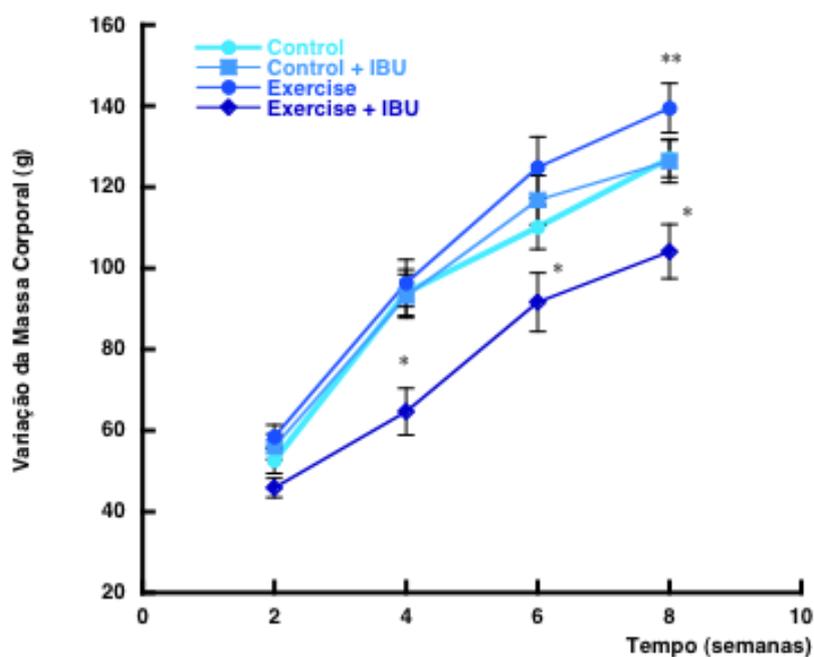


Gráfico 3 – Valores médios da massa corporal dos ratos durante o período de treino. Controlo (n=8); Controlo com administração de Ibuprofeno (controlo +IBU; n=6); ratos treinados (exercício; n=10) e Exercício com administração de Ibuprofeno (Exercício + IBU; n=10). O Ibuprofeno foi administrado por via oral, diariamente na dose de 40 mg.Kg⁻¹. Os pontos representam a média dos valores e as linhas verticais o erro da média. *p<0.05 relativo aos outros grupos; **p<0.05 relativo aos grupos controlo e controlo+IBU (Costa, 2014).

Neste gráfico, como referimos comum a vários trabalhos do projeto “mãe”, mostra que apenas os animais treinados e com administração de Ibuprofeno mostram diferenças na sua massa corporal sendo significativamente mais baixa que os restantes grupos. Também em nível do desempenho físico dos animais o grupo que tomou Ibuprofeno mostrou um menor desempenho num teste de resistência/velocidade realizado pós-treino. No conjunto, estes resultados mostram que o fármaco parece

interferir tanto em nível de composição corporal como ao nível do efeito do exercício, mostrando um desempenho físico mais baixo.

De lembrar que em trabalhos anteriores do nosso grupo, e como indicado na introdução, foi demonstrado que o treino em animais tratados com Ibuprofeno apresentavam alterações a nível vascular. Nomeadamente, verificou-se que o número de capilares no músculo gastrocnêmio era menor do que no grupo que apenas foi treinado, sem fármaco. Estes resultados foram reforçados pela diminuição dos valores de VEGF e também com o número de EPC's. Nestas células verificou-se que o Ibuprofeno parecia frenar os efeitos do exercício físico, aumentando o número de células indiferenciadas (CD133+) e também com características endoteliais (KDR+). Estes resultados apontam para uma menor mobilização das EPC's no grupo treinado e tratado com Ibuprofeno.

Como sabemos, as EPC's são controladas na sua produção, mobilização e diferenciação por vários fatores entre os quais, o VEGF, NO e IL-6. Deste modo, e considerando o objetivo deste trabalho fomos analisar o efeito do Ibuprofeno nos níveis de NO e IL-6. No gráfico 4 podemos ver os valores correspondentes aos níveis de NO (sobe a forma de nitritos/nitratos) no plasma, e no gráfico 5 os valores correspondentes no músculo gastrocnêmio.

Relativamente aos valores de NO, traduzidos pelos níveis de nitritos, verificamos que no plasma há um aumento induzido pelo treino mais inferior no grupo ao qual foi simultaneamente, ao treino, administrado Ibuprofeno. Já no músculo gastrocnêmio é evidente a diminuição no grupo de exercício + Ibuprofeno quando comparado com os outros grupos estudados.

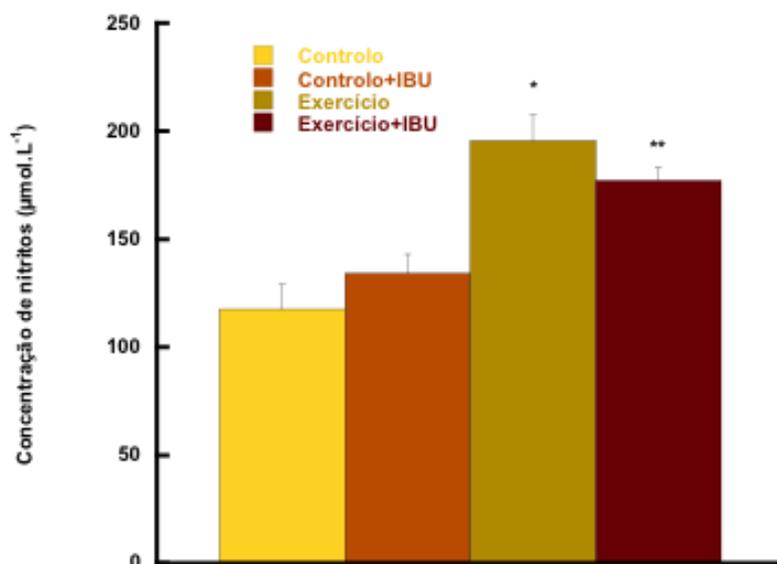


Gráfico 4: Concentração de nitritos no plasma. Controlo (n=8); Controlo com administração de Ibuprofeno (controlo + IBU; n=6); ratos treinados (exercício; n=10) e Exercício com administração de Ibuprofeno (Exercício + IBU; n=10). O Ibuprofeno foi administrado por via oral, diariamente na dose de 40 mg.Kg⁻¹. As barras representam a média dos valores e as linhas verticais o erro padrão da média. *p<0.05 relativo ao controlo; **p<0.05 relativo aos grupos controlo com Ibuprofeno.

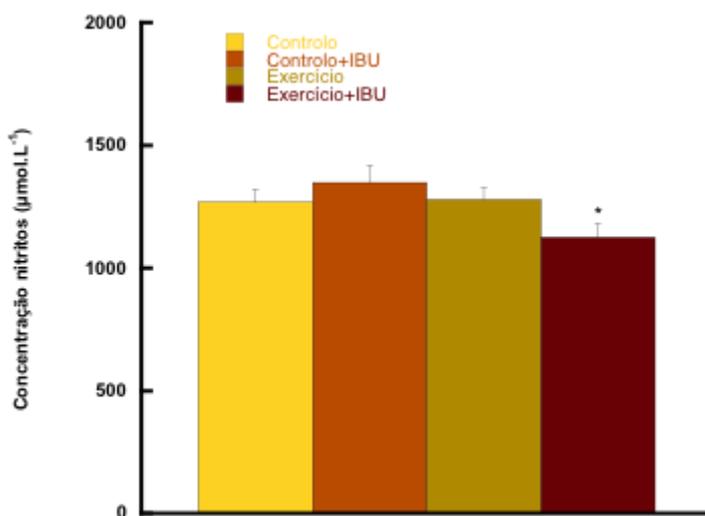


Gráfico 5: Concentração de nitritos no músculo gastrocnêmio. Controlo (n=8); Controlo com administração de Ibuprofeno (controlo + IBU; n=6); ratos treinados (exercício; n=10) e Exercício com administração de Ibuprofeno (Exercício + IBU; n=10). O Ibuprofeno foi administrado por via oral, diariamente na dose de 40 mg.Kg⁻¹. As barras representam a média dos valores e as linhas verticais o erro padrão da média. *p<0.05 relativo ao controlo com Ibuprofeno.

Estes resultados estão em concordância com os obtidos para o VEGF em que se verificou no plasma, exatamente a mesma tendência que agora se observa para o NO. Os resultados também estão de acordo estudos de outros autores que referem uma relação entre os níveis de NO e VEGF, sendo que o NO será necessário para a estimulação do VEGF que, por sua vez é fundamental para a estimulação das EPC's.

Os mecanismos de reparo vascular podem ser afetados pela diminuição da mobilização de EPC's, causada pela redução da biodisponibilidade do NO (Aicher *et al.*, 2003; Radenkovic *et al.*, 2013). O aumento do NO, (Dimmeler *et al.*, 2001), pode ser estimulado por vários fatores, como as estatinas, o exercício físico, entre outros; desta forma, a mobilização de EPC's é aumentada.

Nesse contexto, a eNOS gera NO nos vasos sanguíneos, influenciando a capacidade migratória de EPC's, *in vitro* (Aicher *et al.*, 2003). Desta forma, a eNOS reflete uma melhoria da mobilização de EPC's ocasionada pela estimulação das estatinas ou do VEGF (Dimmeler *et al.*, 2001; Mheid *et al.*, 2014). Porém, Gao *et al.* (2014), sugere que o eNOS não contribui como regulador fisiológico da mobilização e função das EPC's. Não podemos deixar de verificar que o Ibuprofeno interfere diretamente neste mecanismo. Sendo um inibidor não seletivo da COX parece haver aqui uma relação íntima entre a COX e a produção de NO e VEGF.

Com a prática do exercício físico aeróbio há aumento das EPC's, bem como de outros fatores que estão ligados na migração e proliferação destas células, como o NO, o VEGF, a IL-6 e a COX. O NO é essencial na proliferação das EPC's, pois, regula etapas fundamentais no reparo muscular, bem como a COX-2 que pode aumentar a ocorrência de EPC's no processo de angiogênese (Dimmeler *et al.*, 2001; Fleissner e Thum, 2011; Mheid *et al.*, 2014; Pedersen e Febbraio, 2008; Soltow *et al.*, 2006).

O NO também regula a IL-6 durante o exercício físico, além de ter relação direta com o VEGF, que é responsável pela mobilização das EPC's. O ibuprofeno altera o COX fazendo com que as respostas promovidas pelo exercício físico sejam modificadas, desta forma pode influenciar a função do NO e, conseqüentemente, do VEGF, IL-6 e COX-2 (Dimmeler *et al.*, 2001; Fleissner e Thum, 2011; Mheid *et al.*, 2014; Pedersen e Febbraio, 2008; Soltow *et al.*, 2006).

Estudos em humanos com intervenção de Ibuprofeno, Soltow *et al.* (2006), demonstraram a necessidade da COX-2 para estimular a produção da síntese de proteína no músculo esquelético após o exercício físico. Pois, o Ibuprofeno, ao inibir a COX,

pode interferir em outros processos, como a ação do NO e do VEGF, além de impedir o crescimento muscular (Soltow et al., 2006).

O NO regula a expressão da COX-2, bem como a liberação dos mediadores, as PGs (Soltow et al., 2006). Além disso, o NO tem sido identificado como um sinal para ativação de células no músculo esquelético, como sugere Soltow et al. (2006), a COX-2 expressa no músculo pode vir a ser controlada pelo NO. Também a IL-6 tem um papel fundamental na ativação da COX parece estar relacionada com a produção de NO e VEGF. Ao analisar os resultados dos valores plasmáticos e tecidulares de IL-6 (gráfico 6) verificamos que apenas no plasma do grupo treinado há uma diminuição dos valores desta citocina.

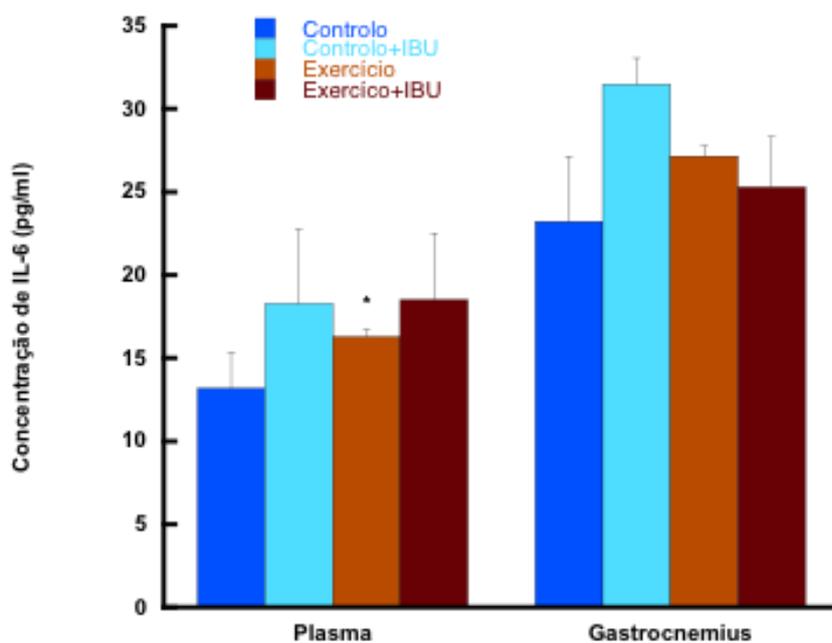


Gráfico 6: Concentração de IL-6 no plasma e no músculo gastrocnêmio. Controlo (n=8); Controlo com administração de Ibuprofeno (controlo + IBU; n=6); ratos treinados (exercício; n=10) e Exercício com administração de Ibuprofeno (Exercício + IBU; n=10). O Ibuprofeno foi administrado por via oral, diariamente na dose de 40 mg.Kg⁻¹. As barras representam a média dos valores e as linhas verticais o erro padrão da média. *p<0.05 do grupo treinado relativamente ao controlo.

Em termos musculares há uma tendência para um aumento da IL-6 no grupo treinado e uma tendência de diminuição no grupo treinado e com Ibuprofeno, relativamente aos respectivos controlos. Sabemos que o NO também regula a produção de IL-6 e que a COX interfere na produção de ambos.

O NO aumenta com o exercício físico e está envolvido em diversos mecanismos potenciais, no músculo esquelético, Pedersen e Febbraio (2008), dentre eles o IL-6. Estudos recentes demonstram que a produção no músculo esquelético de NO, é um importante regulador de sinalização que conduz a IL-6 para o músculo (Pedersen e Febbraio, 2008).

Esse aumento do NO durante o exercício físico, como sugere Pedersen e Febbraio (2008), atenua os níveis de IL-6 no músculo esquelético de humanos. Além disso, o aumento do NO tem ligação com o aumento do VEGF e, conseqüentemente do IL-6, por ser regulado pelo NO durante o exercício físico bem como regula a COX (Dimmeler *et al.*, 2001; Fleissner e Thum, 2011; Mheidet *et al.*, 2014; Pedersen e Febbraio, 2008; Soltow *et al.*, 2006).

Com o uso do Ibuprofeno, havendo inibição da COX, todas as respostas geradas com o exercício físico podem ser alteradas, ou seja, não há aumento do NO e, conseqüentemente, o VEGF, a IL-6 e a COX-2 são também alteradas (Dimmeler *et al.*, 2001; Fleissner e Thum, 2011; Mheidet *et al.*, 2014; Pedersen e Febbraio, 2008; Soltow *et al.*, 2006).

CAPÍTULO V
CONCLUSÕES

CONCLUSÃO

A prática de exercício físico tem vantagens incontestáveis para a saúde sendo cada vez maior o número de praticantes em todo o mundo. Porém, muitos ainda encaram o exercício como uma ferramenta estética pelo que muitas vezes ultrapassam os seus próprios limites fisiológicos. Por esta razão muitas são as substâncias procuradas que aumentem a resistência e diminuam a fadiga ou dor a ela associada. O ibuprofeno é um dos fármacos que mais é utilizado pelos frequentadores de academias com este objetivo. Sendo um anti-inflamatório não esteroide, tem alguns efeitos conhecidos, mas a sua ação no desempenho físico e nas adaptações fisiológicas e moleculares ao exercício não está bem esclarecido.

Este trabalho é a continuação de uma hipótese de trabalho que tinha como objetivo saber qual a influência do ibuprofeno a nível da vascularização muscular esquelética. Para tal, começamos por estudar a influência do ibuprofeno ao treino aeróbio crônico nas células progenitoras do endotélio (EPC's) do sangue periférico. Estudos anteriores mostraram que o exercício aumenta o número de células circulantes na fase indiferenciada e diminui as células já com características endoteliais. Neste contexto, verificamos que o ibuprofeno funcionava como uma espécie de freio que diminuía a capacidade de diferenciação das EPC's induzida pelo exercício. A reforçar este fato verificamos que o ibuprofeno não permite um aumento dos capilares musculares, como com exercício apenas, e não permite também o aumento do VEGF.

Neste trabalho foi nosso objetivo estudar o efeito do ibuprofeno nas substâncias reguladoras da mobilização e diferenciação das EPC's, como sendo o NO e a IL-6. Estes três fatores (VEGF, NO e IL-6), sabemos que interagem em conjunto no sentido de promover a formação das EPC's circulantes em células endoteliais maduras que, supostamente, promovem vasculogênese no músculo treinado.

Assim, os nossos resultados mostraram que na presença de ibuprofeno o treino aeróbio diminui os níveis de NO muscular (com aumento dos níveis plasmáticos), e diminui os níveis tecidulares de IL-6. Assim, os nossos resultados sugerem que a diminuição de mobilização e diferenciação das EPC's em ratos treinados, mas com administração simultânea de ibuprofeno parece dever-se a uma ação direta no mecanismo de controlo das EPC's. Isto é, ao inibir a COX há inibição das NOS que produzem menos NO. Esta baixa de NO estimula menos a produção de VEGF. Acresce que a IL-6 agrava a diminuição de NO criando um ciclo de decréscimo de estimulação

das EPC's. Concluindo, a junção de ibuprofeno com o exercício aeróbio tende a diminuir a capacidade de vasculogênese promovida pelo exercício diminuindo assim os seus benefícios no músculo esquelético.

BIBLIOGRAFIA

- Adams V., Lenk K., Linke A., Lenz D. (2004). *Increase Of Circulating Endothelial Progenitor Cells In Patients With Coronary Artery Disease After Exercise-Induced Ischemia*. *ArteriosclerThrombVascBiol*; 24:684–90.
- Aicher A., Heeschen C., Mildner-Rihm C., Urbich C., Ihling C., Technau-Ihling K., Zeiher A.M., Dimmeler S. (2003). *Essential Role of Endothelial Nitric Oxide Synthase for Mobilization of Stem and Progenitor Cells*. *Nat Med*9:1370–1376.
- Asahara T., Kawamoto A., Masuda H. (2011). *Concise Review: Circulating Endothelial Progenitor Cells for Vascular Medicine*. *STEM CELL*; 29:1650–1655. doi: 10.1002/stem.745.
- Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M., van der Zee R., Li T., *et al.* (1997). *Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis*. *Science*. 275(5302):964-7.
- Attar A., Maharloo M. K., Khoshkhou1 S., Hosseini A., Jaberipour M., Dehghan A. and Monabati A. (2013). *Colony Forming Unit Endothelial Cells Do not Exhibit Telomerase Alternative Splicing Variants and Activity*. *Iranian Biomedical Journal* 17 (3): 146-151 (July 2013). doi: 10.6091/ibj.1100.2013.
- Beltrami A. P., Barlucchi L., Torella D. B. M., Limana F., Chimenti S., *et al.* (2003). *Adult Cardiac Stem Cells Are Multipotent And Support Myocardial Regeneration*. 114(6): 763 76.
- Botham, C., Bennett M., William L., Cooke J. P. (2013). *Clinical Trials of Adult Stem Cell Therapy for Peripheral Artery Disease*. *MDCVJ | IX* (4).

- Castillo-Melendez M., Yawno T., Graham J. and Miller S. L. (2013). *Stem Cell Therapy to Protect and Repair the Developing Brain: are View of Mechanisms of Action of Cord Blood and Amnion Epithelial Derived Cells*. *Frontiers in Neuroscience*; October 2013, Volume7, Article 194.
- Chen Q., Jin M., Yang F., Zhu J., Xiao Q., and Zhang L. (2013). *Matrix Metalloproteinases: Inflammatory Regulators of Cell Behaviors in Vascular Formation and Remodeling*. Hindawi Publishing Corporation. *Mediators of Inflammation*. Volume 2013, Article ID 928315, 14 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/928315>.
- Cochain C., Channon K. M. and Silvestre J. S. (2013). *Angiogenesis in the Infarcted Myocardium*. *Antioxidants & Redox Signaling*. Volume 18, Number 9. DOI: 10.1089/ars.2012.4849
- Costa, JI. (2014). Efeito do Ibuprofeno Associado ao Exercício Físico nas Células Progenitoras do Endotélio. Dissertação de mestrado apresentada à FCT da Universidade de Coimbra.
- De Palma C., Clementi E. (2012). *Nitric Oxide in Myogenesis and Therapeutic Muscle Repair*. *Mol Neurobiol*, 46:682–692.
- De Palma C., Morisi F., Pambianco S., Assi E., Touvier T., Russo S., Perrota C., Romanello V., Carnio S., Capello V., Pellegrino P., Moscheni C., Bassi M. T., Dandr M., Cervia D., and Clementi E. (2014). *Deficient Nitric Oxide Signalling Impairs Skeletal Muscle Growth and Performance: Involvement of Mitochondrial Dysregulation*. De Palma et al. *Skeletal Muscle*, 4:22.
- Dimmeler S., Aicher A., Vasa M., Mildner-Rihm C., Adler K., Tiemann M., Rutten H., Fichtlscherer S., Martin H., Zeiher A. M. (2001). *Hmg-CoaReductase Inhibitors (Statins) Increase Endothelial Progenitor Cells Via the Pi 3-Kinase/Akt Pathway*. *J Clin Invest*; 108:391 397.

- Fischer CP. (2006). *Interleukin-6 in Acute Exercise and Training: What is the Biological Relevance?* Exercise Immunol Rev 12: 6–33.
- Fischer CP, Hiscock N, Basu S, Vessby B, Kallner A, Sjöberg LB, Febbraio MA, Pedersen BK. (2004). *Supplementation With Vitamins C and E Inhibits the Release of Interleukin-6 from Contracting Human Skeletal Muscle.* J Physiol 558: 633–645.
- Fleissner F. and Thum T. (2011). *Critical Role of the Nitric Oxide/Reactive Oxygen Species Balance in Endothelial Progenitor Dysfunction.* Antioxidants & Redox Signaling; volume 15, Number 4. doi: 10.1089=ars.2010.3502
- Folkman J., Shing Y. (1992). *Angiogenesis.* J BiolChem; 267:10931–10934.
- Fontes-Ribeiro C. A., Marques E., Pereira F. C., Silva A. P., Macedo T. R. A. (2011). *May exercise prevent addiction?* Current Neuropharmacology 9 (1): 45 – 48.
- Gao L., Li P., Zhang J., Hagiwara M., Shen B., Bledsoe G., Chang E., Chao L., Chao J. (2014). *Novel Role of Kallistatin in Vascular Repair by Promoting Mobility, Viability, and Function of Endothelial Progenitor Cells.* J Am Heart Assoc. 2014;3:e001194doi: 10.1161/JAHA.114.001194.
- George J., Matucci-Cerinic M., Bar I., Shimoni S. (2014). *Circulating Autoantibodies to Endothelial Progenitor Cells: Binding Characteristics and Association with Risk Factors for Atherosclerosis.* Plos One 9(6): e97836. doi:10.1371/journal.pone.0097836.
- Gonzalo-Calvo D, de Luxan-Delgado B, Rodriguez-Gonzalez S, Garcia-Macia M, Suarez FM, Solano JJ, Rodriguez-Colunga MJ, Coto-Montes A. (2012). *Interleukin 6, Soluble Tumor Necrosis Factor Receptor I and Red Blood Cell Distribution Width as Biological Markers of Functional Dependence in an Elderly Population: A Translational Approach.* Cytokine 58: 193–198.

- Grange RW, Isotani EIJI, Lau KS, Kamm KE, Huang PL, Stull JT. (2001). *Nitric Oxide Contributes to Vascular Smooth Muscle Relaxation in Contracting Fast-Twitch Muscles*. *Physiol Genomics* 5: 35–44, 2001.
- Gulati R, Jevremovic D, Peterson TE, Chatterjee S, Shah V, Vile RG, and Simari RD. (2003). *Diverse Origin and Function of Cells With Endothelial Phenotype Obtained from Adult Human Blood*. *Circ Res* 93: 1023–1025.
- Hall G, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Moller K, Moseley P, Pedersen BK. (2008). *Interleukin-6 Markedly Decreases Skeletal Muscle Protein Turnover and Increases Nonmuscle Amino Acid Utilization in Healthy Individuals*. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 2851–2858.
- Hamed S., Brenner B., and Roguin A. (2011). *Nitric Oxide: aKey Factor Behind the Dysfunctionality of Endothelial Progenitor Cells in Diabetes Mellitus Type-2*. *Cardiovascular Research* 91, 9–15. doi:10.1093/cvr/cvq412
- Henrich D., Wilhelm K., Warzecha J., Frank J., Barker J., Marzi I., and Seebach C. (2013). *Human Endothelial-Like Differentiated Precursor Cells Maintain Their Endothelial Characteristics When Cocultured with Mesenchymal Stem Cell and Seeded onto Human Cancellous Bone*. Hindawi Publishing Corporation *Mediators of Inflammation*. Volume 2013, Article ID 364591, 12 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/364591>
- Jung, Seok Y., Choi, Sung H., Yoo, So Y., Baek, Sang H. and Kwon, Sang M. (2013). *Modulation of Human Cardiac Progenitors via Hypoxia-ERK Circuit Improves their Functional Bioactivities*. *Biomol Ther* 21(3), 196-203.
- Lui K. O., Zangi L., Silva E. A., Bu L., Sahara M., Li R. A., Mooney D. J., Chien K. R. (2013). *Driving vascular endothelial cell fate of human multipotent Isl1+ heart proAnversa*. 2008. *The Human Heart: A Self-Renewing Organ*, *Clin. Transl. Sci.* 1, 80–86.

- Kawamoto A., Losordo D. W. (2008). Endothelial progenitor cells for cardiovascular regeneration. *Trends Cardiovasc Med* 18(1): 33–7.
- Kones R. (2013). *Molecular Sources of Residual Cardiovascular Risk, Clinical Signals, and Innovative Solutions: Relationship with Subclinical Disease, Undertreatment, and Poor Adherence: Implications of New Evidence Upon Optimizing Cardiovascular Patient Outcomes*. *Vascular Health and Risk Management*:9 617–670.
- Miller K., E. and J., Pawet P. (2007). *Endothelial Progenitor Cells as a New Agent Contributing to Vascular Repair*. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2007, 55, 247–259. PL ISSN 0004-069X. DOI 10.1007/s00005-007-0027-5
- MheidIbhar A., Corrigan F., Shirazi F., Veledar E., Li Q., Alexander W. R., Taylor W. R., Waller E. K., Quyyumi A. A. (2014). *Circadian Variation in Vascular Function and Regenerative Capacity in Healthy Humans*. *J Am Heart Assoc.* 3:e000845 doi: 10.1161/JAHA.114.000845)
- Mishra K. P., Givvimani S., Chavali V., Tyagi S. C. (2013). *Cardiac Matrix: A Clue for Future Therapy*. *BiochimicaetBiophysicaActa* 1832, 2271–2276. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.09.004>
- Nakano, H. et al. (2013). *Haemogenic Endocardium Contributes To The Transient Definitive Hematopoiesis*. *Nat the Commun.* 4, p. 1564.
- Obi S., Masuda H., Akimaru H., Shizuno T., Yamamoto K., Ando J. e Asahara T. (2014). *Dextran Induces Differentiation of Circulating Endothelial Progenitor Cells*. *Physiol Rep*, 2 (3), e00261. doi: 10.1002/phy2.261
- Pedersen B. K. and Febbraio M. A. (2008). *Muscle as an Endocrine Organ: Focus on Muscle-Derived Interleukin-6*. *Physiol Rev* 88: 1379–1406. doi:10.1152/physrev.90100.2007

- Percival J. M., Anderson K. N. E., Gregorevic P., Chamberlain J. S., Froehner S. C. (2008). *Functional Deficits in nNOSm-Deficient Skeletal Muscle: Myopathy in nNOS Knockout Mice*. PLoS ONE 3(10): e3387. doi:10.1371/journal.pone.0003387
- Red-Horse K., Crawford Y., Shojaei F. and Ferrara N. (2007). *Endothelium-Microenvironment Interaction in the Developing Embryo and in the Adult*. Dev. Cell 12, 181–194.
- Rehman J., Li J., Orschel C. M., and March K. L. (2003). *Peripheral Blood “Endothelial Progenitor Cells” are Derived from Monocyte/Macrophages and Secrete Angiogenic Growth Factors*. Circulation, vol. 107, no. 8, pp. 1164–1169.
- Ritz U., Spies V., Mehling I., Gruszka D., Rommens P. M., Hofmann A. (2014). *Mobilization of CD34+-Progenitor Cells in Patients with Severe Trauma*. Plos one.Mayo, Volume 9, 5 - e97369.
- Schuler G., Adams V., and Goto S. (2013). *Role of Exercise in the Prevention of Cardiovascular Disease: Results, Mechanisms, and New Perspectives*. European Heart Journal 34, 1790–1799. doi:10.1093/eurheartj/eh111
- Segal MS, Shah R, Afzal A, Perrault CM, Chang K, Schuler A, Beem E, Shaw LC, Li Calzi S, Harrison JK, Tran-Son-Tay R, and Grant MB. (2006). *Nitric Oxide Cytoskeletal-Induced Alterations Reverse the Endothelial Progenitor Cell Migratory Defect Associated With Diabetes*. Diabetes 55: 102–109.
- Shen, W., L. Yong, Y. Tang, J. Cummins, and J. Huard. (2005). *Ns-398, a Cyclooxygenase-2-Specific Inhibitor, Delays Skeletal Muscle Healing by Decreasing Regeneration and Promoting Fibrosis*. Am. J. Pathol. 167:1105–1117.
- Shi Q., Rafii S., Wu M. H., Wijelath E. S., Yu C., Ishida A., et al. (1998). *Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells*. Blood Jul;92(2):362-7.

- Sieveking D. P. and K. C. Ng M. (2009). Cell Therapies for Therapeutic Angiogenesis: Back to the Bench. *Vascular Medicine*; 14: 153–166.
- Silva J. F. R., Rocha N. G., Nóbrega A. C. L. (2012). *Mobilization of Endothelial Progenitor Cells with Exercise in Healthy Individuals: a Systematic Review*. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*; 98(2): 182 – 191.
- Simmons DL, Botting RM, Hla T. (2004). *Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition*. *Pharmacol Rev* 56: 387–437.
- Soltow Q. A., Betters J. L., Sellman J. E., Lira V. A., Long J. H. D., and Criswell D. S. (2006). Ibuprofen Inhibits Skeletal Muscle Hypertrophy in Rats. *Med. Sci. Sports Exerc.*, Vol. 38, No. 5, pp. 840–846.
- Stamler J. S., Meissner G. (2001). *Physiology of Nitric Oxide in Skeletal Muscle*. *Physiol Rev*, 81:209–237.
- Steensberg A, van Hall G, Osada T, Sacchetti M, Saltin B, Klarlund PB. (2000). *Production of Interleukin-6 in Contracting Human Skeletal Muscles can Account for the Exercise-Induced Increase in Plasma Interleukin-6*. *J Physiol* 529: 237–242.
- Swiers G., Rode C., Azzoni E., Bruijn. (2013). *A Short History of Hemogenic Endothelium*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmed.2013.09.005>
- Thum T and Bauersachs J. (2005). *Endothelial Progenitor Cells as Potential Drug Targets*. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 5: 277–286.
- Timmermans F., Plum J., Yoder M. C., Ingram D. A., Vandekerckhove B., Case J. (2009). *Endothelial Progenitor Cells: Identity Defined?* *J. Cell. Mol. Med.* Vol 13, No 1, pp. 87-102 . doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00598.x

- Traish, Abdulmageed M., Galoosian, Artin. (2013). *Androgens Modulate Endothelial Function and Endothelial Progenitor Cells in Erectile Physiology*. Korean Journal of Urology; Korean J Urol; 54:721-731; (<http://dx.doi.org/10.4111/kju.2013.54.11.721>).
- Trappe T. A. and Liu S. Z. (2013). *Effects of Prostaglandins and COX-Inhibiting Drugs on Skeletal Muscle Adaptations to Exercise*. J Appl Physiol 115: 909–919. doi:10.1152/jappphysiol.00061.2013
- Trappe TA, Fluckey JD, White F, Lambert CP, Evans WJ. (2001). *Skeletal Muscle PGF2 and PGE2 in Response to Eccentric Resistance Exercise: Influence of Ibuprofen and Acetaminophen*. J Clin Endocrinol Metab 86: 5067–5070.
- Trappe, T. A., F. White, C. P. Lambert, D. Cesar, M. Hellerstein, and W. J. Evans. (2002). *Effect of Ibuprofen and Acetaminophen on Postexercise Muscle Protein Synthesis*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 282:E551–556.
- Zampetaki A., Kirton J.P., and Xu Q. (2008). *Vascular Repair by Endothelial Progenitor Cells*. Cardiovasc. Res. 78, 413–421. doi: 10.1093/cvr/cvn081
- Wahl P., Brixius K. and Bloch W. (2008). *Exercise-Induced Stem Cell Activation and its Implication for Cardiovascular and Skeletal Muscle Regeneration*. Minimally Invasive Therapy. 17:2; 91–99.
- Wang Q., Wu Q., Feng J., Sun J. (2013). *Obstructive Sleep Apnea And Endothelial Progenitor Cells*. Patient Preference and Adherence 2013:7 1077–1090; <http://dx.doi.org/10.2147/PPA.S51562>
- Wattanapitayakul S. K., Weinstein D. M., Holycross B. J., Bauer J. A. (2000). *Endothelial Dysfunction and Peroxynitrite Formation are Early Events in Angiotensin-Induced Cardiovascular Disorders*. FASEB J 2000;14:271–278.

Werling N. J., Thorpe R. and Zhao Y. (2013). *A Systematic Approach to the Establishment and Characterization of Endothelial Progenitor Cells for Gene Therapy*. *Human Gene Therapy Methods* 24:171–184. doi: 10.1089/hgtb.2012.146

Wong M. M., Chen Y., Margariti A., Winkler B., Campagnolo P., Potter C., Hu Y., Xu Q. (2014). *Macrophages Control Vascular Stem/Progenitor Cell Plasticity Through Tumor Necrosis Factor- α -Mediated Nuclear Factor- κ B Activation*. *American Heart Association, Inc.* doi: 10.1161/ATVBAHA.113.302568