



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Efeito do ibuprofeno associado ao exercício físico nas células progenitoras do endotélio

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Paula Tavares (FCDEF-Universidade de Coimbra) e do Professor Paulo Santos (FCT-Universidade de Coimbra)

Ivo Jorge da Costa

2014

“Do not take life too seriously. You will never get out of it alive!”

Elbert Hubbard

Este projecto foi realizado com o apoio e financiamento parcial das seguintes Instituições:

Departamento de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Instituto Biomédico de Investigação e Luz e Imagem (IBILI) e FCT, Strategic Project (Ref: PEst-C/SAU/UI3282/2011), and COMPETE.

A todos os que duvidaram de
mim.

Agradecimentos:

À Professora Doutora Paula Cristina Vaz Bernardo Tavares, orientadora deste projecto, os meus sentidos agradecimentos pela oportunidade de participar num excelente trabalho de elevado apreço pessoal, bem como todo o apoio que me deu ao longo destes dois anos.

Ao Professor Doutor Carlos Alberto Fontes Ribeiro o nosso profundo e sincero agradecimento pela orientação científica do projecto, dedicação e conhecimentos transmitidos. A nossa gratidão por disponibilizar as condições laboratoriais fundamentais à boa execução do projecto.

Ao Professor Doutor Artur Paiva e a toda a sua equipa o nosso maior agradecimento pela disponibilidade e apoio nas análises por citometria de fluxo, sem as quais não seria possível este trabalho.

À Professora Doutora Lina Carvalho manifestamos o nosso agradecimento pela disponibilidade e ajuda nas análises histológicas fundamentais à elaboração do projecto.

Aos meus companheiros do grupo de trabalho da Professora Doutora Paula Tavares e em especial ao Denis Moretto, cuja falta ainda se sente, agradeço o apoio, a óptima recepção e os grandes momentos de tranquilidade que me proporcionaram, bem como toda a ajuda neste trabalho.

Aos meus colegas do IBILI, em particular à Rita Pereira, um muito obrigado, pela maravilhosa demonstração da técnica de imunofluorescência, apesar de esta não ter sido necessária.

Aos meus amigos, em particular, ao Rui, ao Guilherme, à Manuela, à Raquel, à Ruiva, à Catarina, à Eliana, à Nádia, ao Tomás e ao António, que apesar de distante, está sempre connosco a toda a hora, um sentido abraço e meigo obrigado, pelos sorrisos, pelo apoio, pelos bons, mas também pelos maus momentos, que passámos sempre juntos e que me permitiram chegar a este ponto.

Ao Naruto e, em particular, ao Luffy, que me tranquilizam o espírito, todas as quartas-feiras, com o seu humor e espírito de aventura, um arigato gozaimasu.

Aos meus pais, ao meu irmão, aos meus avós e tios, um agradecimento especial, pela paciência, carinho, dedicação, sorrisos trocados e lágrimas limpas, sacrifícios feitos e frutos colhidos, ao longo de todo o meu percurso académico e acima de tudo, ao longo da minha vida. Sem duvida, um muito...muito obrigado e com desejos que a nossa relação evolua para melhor e se prolongue por muitos e bons anos.

O mais especial dos agradecimentos e o abraço mais apertado, à Daniela Oliveira, por todo o apoio e ajuda que deu ao pior dos calmeirões e acima de tudo por ser o cerne do melhor que há em mim. Por estar sempre a meu lado, principalmente quando estou desamparado, aqui fica o meu muito obrigado e a retribuição, com o maior carinho e mais quente amor do mundo. De mim para ti, obrigado princesa.

A todos os que não estão discriminados anteriormente devido a esquecimentos, o meu muito obrigado por tudo e desculpem qualquer coisinha.

Resumo

Introdução: O exercício físico tende a aumentar as células endoteliais progenitoras (EPCs) na circulação sanguínea. Estas células, constituídas por varias populações, promovem o aparecimento de novos vasos, quer por angiogénese, quer por neovascularização. Assim, podemos assumir que a vascularização aumenta com a prática de exercício físico. Estudos recentes mostram que inibidores de COX-2 são capazes de inibir a actividade de EPCs e, portanto, originar uma diminuição do aparecimento e/ou ramificação de novos vasos. Este estudo pretende provar que o ibuprofeno, como inibidor da via das ciclooxigenases, consegue diminuir a vascularização no músculo solear.

Metodos: Quatro grupos de ratos Wistar foram submetidos a treino continuado, aeróbio, em passadeira rolante, ao longo de oito semanas. De seguida foram retiradas amostras de sangue e os músculos solear. As amostras de tecido foram submetidas a análises moleculares e histológicas, enquanto que as amostras de sangue foram utilizadas para estudo das células progenitoras do endotélio (EPCs) e quantificação de VEGF. As EPCs foram analisadas por citometria de fluxo, utilizando os marcadores CD34, CD133, CD146 e KDR. As concentrações plasmáticas de VEGF foram determinadas por ELISA. Amostras de tecido muscular permitiram a quantificação das fibras musculares tipo I e II, bem como o calculo da razão capilar/fibra.

Resultados: Verificámos que com exercício a massa corporal aumentou a cima de todos outros grupos, enquanto que o grupo de exercício com administração de ibuprofeno apresentou valores bastante abaixo dos outros grupos. Pode observar-se também, que, não só houve um aumento de comida ingerida pelo grupo com exercício e uma diminuição no caso do grupo exercício com administração de ibuprofeno. O teste de performance efectuado após o treino mostrou menor eficácia no grupo que consumiu ibuprofeno. As análises ao plasma sanguíneo revelaram que nos grupos de exercício existiu um aumento de VEGF e diminuição dos valores de células KDR⁺, CD146⁺ em circulação, o que se reflectiu num aumento da razão fibra/capilar. Já no grupo de exercício com administração de ibuprofeno, existiu uma diminuição de VEGF e um aumento do nível de células KDR⁺, CD146⁺, CD133⁺ e CD34⁺ em circulação, o que se correlacionou com a diminuição da razão capilar/fibra, quando comparado com o grupo de exercício.

Conclusão: Não só o exercício físico revela uma maior activação de EPCs na corrente sanguínea, como o ibuprofeno parece ter a capacidade de inibir a actividade de vascularização dessas células, impedindo que as EPCs circulantes atinjam a diferenciação em células endoteliais maduras(EC), obrigando-as a permanecer na corrente sanguínea por longos

períodos de tempo. Acresce o facto de a diminuição da vascularização se correlacionar com uma menor quantidade de fibras tipo I e uma diminuição na performance após treino.

Palavras-chave: exercício físico, EPCs, angiogénese, neovascularização, ibuprofeno

Abstract

Background: Physical Exercise tends to increase endothelial progenitor cells (EPCs) in the bloodstream. These cells, comprised of several populations, promote the development of new blood vessels, either through angiogenesis or by neovascularization. Thus, we can assume that the vasculature increases with the practice of exercise. Recent studies show that COX-2 inhibitors are able to inhibit the activity of EPC and, therefore, cause a decrease in the onset and/or branching of new vessels. This study aims to prove that ibuprofen, as an inhibitor of cyclooxygenase pathway, can decrease vascularity in the gastrocnemius and soleus muscles.

Methods: Four groups of Wistar rats were obliged to participate in continued aerobic training, on treadmill, over eight weeks. Then blood samples and soleus muscles were collected. The tissue samples were subjected to molecular and histological analysis while the blood samples were used to study of endothelial progenitor cells (EPCs) and VEGF quantification. After, they were subjected to flow cytometry using CD34, CD133, CD146 and KDR markers. VEGF concentrations were determined through ELISA technic. The tissue samples lead to the quantification of muscle fibers as well as the capillary/fibre ratio.

Results: We confirm that the exercise group was the one with the most body mass increase, above all other groups. It was also clear that the exercise group with administration of ibuprofen showed values well below the other groups. It is also to be noted that, not only there has been an increase of food eaten by the subjects with exercise and a reduction related to the exercise group with administration of ibuprofen. The performance test carried out after the training showed low efficacy in the group that consumed ibuprofen. The analyzes revealed that the blood plasma belonging to the exercise group had an increase of VEGF molecule and decreased values of KDR⁺, CD146⁺ cells in circulation, which was reflected in an increase of the fiber/capillary ratio. In the group of exercise with administration of ibuprofen, there was an inverse scenario. We saw a decrease in VEGF and increased levels of KDR⁺, CD146⁺, CD133⁺ and CD34⁺ cells in circulation, correlating to a decrease in the capillary/fiber ratio when compared to the group of only exercise bouts.

Conclusions: Not only does exercise reveals a greater activation of EPCs into the bloodstream, but also ibuprofen appears to have the ability to inhibit the activity of these vascular cells, and thus, preventing differentiation into mature endothelial cells (EC), forcing EPCs to remain in the bloodstream for extended periods of time. Moreover, there is a decrease of the vascularization that is correlated with a lesser amount of fibres type I and a decrease in performance after training

Keywords: physical exercise, EPCs, angiogenesis, neovascularization, ibuprofen

Índice

1- Introdução	2
2- Estado da Arte	3
2.1- O músculo esquelético	3
2.2- Músculo esquelético	3
2.3- As miofibras	5
3- Vasos sanguíneos	6
3.1- Células progenitoras do endotélio (EPCs)	6
Perspectiva Histórica	6
3.2-Vascularização de pré a pós natal	7
3.2.1-Vascularização pré-natal:	7
3.2.2-Vascularização pós-natal:.....	9
3.3- Relevância na medicina:	10
3.4- Caracterização:	14
3.4.1- Características fisiológicas	14
3.4.2- Marcadores	15
3.4.3- Função e local de acção.....	18
3.5-CPEs e exercício:	25
4-Ibuprofeno e Células progenitoras endoteliais	26
4.1.1-Ibuprofeno:	26
4.1.2- Anti-inflamatórios não esteróides (AINEs):.....	27
4.1.3- Prostaglandinas (PGs):	27
4.2-Ibuprofeno e exercício	28
6-Materiais e métodos	34
6-Materiais e métodos	34
6.2-Sacrifício dos animais necrópsia e isolamento muscular	36
6.3-Análise Histológica	36
7-Resultados:	40
8-Discussão:	49
10-Referências:	58

Lista de Figuras

1- Figura 1 Músculo esquelético	4
2- Figura 2 Neovascularização	8
3- Figura 3 Angiogénese	9
4- Figura 4 Destino de EPCs.....	12
5- Figura 5 Diversos tipos de EPCs.....	13
6- Figura 6 Diversos tipos de EPCs. Outra perspectiva	16
7-Figura 7 Percurso feito pelas EPCs.....	19
8-Figura 8 Mobilização, recrutamento e diferenciação de EPCs	22
9-Figura 9 Mobilização de EPCs, com prática de exercício	26
10-Figura 10 Formas e origem das prostaglandinas	28

Lista de Gráficos

1- Gráfico 1	Valores médios da massa corporal dos ratos durante o período de treino	40
2- Gráfico 2	Valores médios da ingestão de comida por 8 semanas de treino	41
3- Gráfico 3	Valores percentuais do acréscimo ou diminuição de fibras do tipo I e II.....	43
4- Gráfico 4	Valores da razão capilar/fibra	44
5- Gráfico 5	Valores plasmáticos de VEGF	45
6- Gráfico 6	Porcentagem de células marcadas com CD34 e CD133 no plasma total	46
7- Gráfico 7	Porcentagem de células marcadas com CD146 e KDR no plasma total	47

Lista de Tabelas

1- Tabela 1 Neovascularização induzida pela injeção de EPCs	11
2- Tabela 2 Teste de performance.....	42

Lista de Abreviaturas

AC133	<i>Prominin-1</i>
ADP	Adenosina Difosfato
AINEs	Anti-inflamatórios não-esteróides
Akt	<i>Protein kinase B</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
CCN1	<i>Cysteine-rich angiogenic inducer 61</i>
CECs	Células Endoteliais em Circulação
COX-2	Ciclooxigenase 2
CXCR4	<i>C-X-C chemokine receptor type 4</i>
ECs	Células Endoteliais
eNOS	Sintase de Óxido Nítrico Endotelial
EPCs	Células Progenitoras Endoteliais
EPO	Eritropoietina
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FGF2	Factor de crescimento dos fibroblastos 2
G-CSF	<i>Granulocyte colony stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte monocyte-colony stimulating factor</i>
HE	Hematoxilina-eosina
HSCs	Células Estaminais Hematopoiéticas (<i>Hematopoietic Stem Cells</i>)
mATPase	Adenosina Trifosfato Miofibrilar
MMP9	Metaloprotease 9
NO	Óxido Nítrico
Oct4	<i>Octamer-binding Transcription Factor 4</i>
PGs	Prostaglandinas

PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGF ₂	Prostaglandina F ₂
PGI ₂	Prostaciclina
PI3K	<i>Posphatidylinositol 3-kinase</i>
RGD	Tripeptideo Arg-Gly-Asp
SDF1	<i>Stromal-derived factor 1</i>
TEK	Angiopietin-1 receptor
Tie2	Receptor de tirosina cinase TIE
VEGF	Factor de crescimento endotelial vascular
VEGFR	Receptor do factor de crescimento endotelial vascular
vWF	Factor <i>von Willebrand</i>

Capítulo I – INTRODUÇÃO

1- Introdução

O músculo esquelético constitui, aproximadamente, 45% do peso corporal e é o principal local de transformação e de armazenamento de energia. O músculo esquelético possui uma incrível capacidade de deformação morfológica e uma espantosa capacidade de adaptação a diferentes esforços impostos. O exercício físico contribui para o desenvolvimento da musculatura esquelética (Cramer et al. 2004, Le Grande et al. 2007), bem como para o bem estar geral do corpo humano e ainda, para a diminuição de doenças cardiovasculares, através da activação de células da linha progenitora endotelial (EPCs) (Siddique et al. 2010), entre outros factores.

Foi demonstrado que o exercício físico induzia uma acentuada libertação, para a circulação sanguínea, de células progenitoras endoteliais, ou EPCs (Laufs et al. 2005). Esta população de células é responsável, não só, pela criação de vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, ou angiogénese (Dome et al. 2012, Rae et al. 2011), mas também, pela produção *de novo* de vasos sanguíneos, ou vasculogénese, que é um processo que, até então, se pensava limitado à gestação pré-natal (Eguchi et al. 2007). Ambos os processos são iniciados após a recepção de estímulos como VEGF e NO (Smadja et al. 2007, Yan et al. 2012), estando estes dois factores intimamente relacionados entre si e com exercício (Yang et al. 2007, Laufs et al. 2005). Em suma, é possível afirmar que o exercício físico é benéfico para a vascularização de todos os tecidos no corpo humano.

Em estudos recentes, foi determinado que COX-2, que é uma ciclooxygenase, responsável pela resposta a vários processos de inflamação, está também, relacionada com a actividade de EPCs e, por conseguinte, intimamente relacionada com a angiogénese (Muraki et al. 2012). Assim, de acordo com os dados anteriores, é possível imaginar que a inibição de COX-2, possa levar a uma diminuição da actividade antigénica no corpo humano. Este facto está documentado no trabalho de Muraki et al (2012).

Um dos mais comumente utilizados inibidores de ciclooxygenase é o ibuprofeno (Peterson et al. 2003). Este fármaco é usado sem prescrição clínica pelos frequentadores de ginásios de modo a diminuir as dores induzidas pelo exercício e, desta forma, aumentar o tempo de treino. O crescente uso deste fármaco levanta sérias dúvidas sobre os seus efeitos nas adaptações musculares ao exercício.

O nosso trabalho, pretende assim, reunir todos estes factores e tentar determinar de que forma o uso abusivo de ibuprofeno, por parte de usuários de ginásio, pode interferir em alguns parâmetros musculares. A resposta a será desciminada ao longo deste trabalho.

2- Estado da Arte

2.1- O músculo esquelético

O tecido muscular esquelético constitui cerca de 40 a 50% da massa corporal (Broek et al., 2010). Há três tipos de músculo, o músculo estriado cardíaco, que com as suas contracções involuntárias, é responsável por expelir o sangue do coração através do batimento cardíaco. Os miócitos cardíacos, que apresentam um só núcleo e estão unidos entre si por discos intercalares sensíveis à voltagem, para que ao mínimo estímulo possa passar de célula em célula. É um tecido não regenerável (Broek et al., 2010). O músculo liso, também chamado visceral, é também de contracção involuntária mas lenta. É composto por células fusiformes e mononucleadas. Este tecido está presente nos órgãos tais como vasos sanguíneos, bexiga, útero e no trato gastrointestinal. É um músculo com capacidade de renovação, tal como o músculo esquelético (Broek et al., 2010). O músculo esquelético, está ligado ao tecido ósseo por tecido conjuntivo denso (tendão) e é o responsável pelo deslocamento Humano. Os seus movimentos são voluntários e para além da sua capacidade de regeneração, tem também, a capacidade de aumentar a sua massa e volume após indução pelo exercício, sendo este processo designado por hipertrofia muscular (Broek et al., 2010). Este músculo é dotado de uma grande capacidade adaptativa.

2.2- Músculo esquelético

O músculo esquelético é provido de três camadas de revestimento. A primeira designada por epimísio, é a camada de tecido conjuntivo que envolve todo o músculo (Widmaier et al., 2011). Mais internamente encontra-se o perimísio, que é uma camada de tecido conjuntivo que envolve conjuntos de dez a cem fibras musculares, sendo cada conjunto denominado de fascículo. O perimísio tem como função proteger e manter as fibras musculares agrupadas para potencializar a acção muscular. Nesta camada de tecido, entre cada fascículo, estão presentes os vasos sanguíneos que irrigam todo o músculo. Por último, a camada de tecido conjuntivo mais interna, o endomísio, é a camada que envolve cada fibra muscular e é constituído por fibras reticulares juntamente com a lâmina basal (Widmaier et al., 2011).

As fibras musculares que constituem o tecido muscular são células alongadas, no máximo com trinta centímetros de comprimento e multinucleadas na região periférica, junto

ao sarcolema. Têm um retículo sarcoplasmático longo, constituído por cisternas cuja função é proporcionar a distribuição da despolarização causada pela contracção muscular, de maneira rápida e eficaz, desde a superfície celular até ao interior do citoplasma, alcançando todas as miofibrilas (Widmaier et al., 2011). A despolarização que chega a cada miofibrila, despoleta na membrana do retículo sarcoplasmático a abertura de canais de cálcio sensíveis á voltagem e, portanto, a libertação de cálcio para o sarcoplasma (Widmaier et al., 2011).

As miofibrilhas estão presentes em todas as miofibras. Ocupam grande parte do sarcoplasma e são constituídas por sarcómeros, que por sua vez, são constituídos por filamentos grossos de miosina e filamentos finos de actina, troponina e tropomiosina (Widmaier et al., 2011).

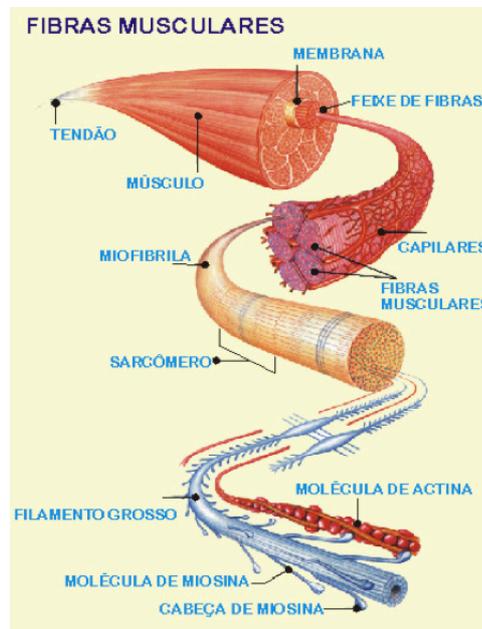


Figura 1. O músculo esquelético. Figura representativa de músculo estriado esquelético com os seus principais constituintes.

Estes são responsáveis pela contracção do músculo após o estímulo. Dá-se a captação do cálcio existente no meio pela troponina que muda de conformação, facilitando a formação de pontes entre a actina e miosina. A cabeça de miosina, com capacidade ATPásica, converte ATP, produzido pelas inúmeras mitocôndrias existentes na fibra, em ADP, utilizando a energia libertada para o deslizamento e sobreposição dos filamentos de actina sobre os de miosina, causando a contracção muscular, como pode ser observado na figura 1 (Widmaier et al., 2011).

2.3- As miofibras

O músculo esquelético é constituído, genericamente, por fibras de contracção rápida, ou de tipo II e fibras de contracção lenta, ou de tipo I. As diferenças entre estas fibras baseiam-se na actividade de ATPase da miosina e na actividade do retículo sarcoplasmático. As fibras rápidas possuem grande actividade do retículo sarcoplasmático e grande actividade ATPásica, o inverso se passa nas fibras lentas (Roels, 2008). Estas fibras também podem ser diferenciadas pela cor, posto que as fibras de tipo I possuem uma cor vermelho-escuro (sendo por isso denominadas fibras vermelhas) devido ao facto de serem ricas em mioglobina e terem um sistema de vasos mais extenso de maneira a proporcionarem uma quantidade superior de oxigénio (Roels, 2008). Têm um diâmetro relativamente pequeno, um maior número de mitocôndrias e um maior número de mionúcleos por comprimento, quando comparadas às fibras de tipo II. Estão assim adaptadas á fadiga e, por conseguinte, adaptadas a actividades de longa duração como por exemplo maratonas, de entre outras actividades musculares que dependem de mecanismos energéticos aeróbios (Roels, 2008).

As fibras de tipo II são de cor vermelho-claro e normalmente designadas de fibras brancas. Têm um diâmetro mais reduzido, menor número de mionúcleos e mitocôndrias, pois utilizam mecanismos anaeróbios como fonte de energia principal. Não têm um sistema de vasos sanguíneos tão amplo e têm um extenso retículo sarcoplasmático, ao inverso do que ocorre nas fibras de tipo I (Roels, 2008).

A percentagem de fibras dos diferentes tipos pode variar de pessoa para pessoa, qualificando-a mais para desportos de longa duração, ou de velocidade, dependendo da quantidade superior de fibras tipo I ou II respectivamente e também, com a função fisiológica de cada músculo. Contudo, o treino aeróbio parece induzir uma diminuição das fibras rápidas e um aparecimento de fibras lentas (Roels, 2008).

3- Vasos sanguíneos

Os vasos sanguíneos fazem parte do sistema circulatório, cujo objectivo é o transporte de sangue por todo o corpo humano. Há, essencialmente, três tipos de vasos sanguíneos, as artérias, que transportam o sangue do coração para as zonas periféricas, os capilares, que permitem a troca de água e compostos essenciais às células e as veias, que transportam sangue dos capilares até ao coração, reiniciando o ciclo sanguíneo. Os vasos sanguíneos são revestidos por tecido endotelial, cuja formação tem origem em células progenitoras endoteliais (EPCs), quer da corrente sanguínea periférica, quer da medula óssea (Urbich et al. 2003, Kalka et al. 2000).

3.1- Células progenitoras do endotélio (EPCs)

Perspectiva Histórica

Na sua maioria as células progenitoras endoteliais (EPCs) localizam-se num microambiente óptimo, na medula óssea, conjuntamente com as células estaminais hematopoiéticas e o estroma da medula óssea (Ribatti 2007).

Grupos mais restritos de EPCs podem ser encontrados na corrente sanguínea, tendo, possivelmente, originado da população da medula óssea e não estando, ainda, incorporados na parede dos vasos sanguíneos (Ribatti 2007).

Este tipo de células tem a capacidade de proliferar, migrar e diferenciar em células endoteliais mas, não adquiriram ainda as capacidades e características de uma célula endotelial adulta (Ribatti 2007).

Há indícios de angioblastos na literatura científica desde 1932, sugerindo que células circulantes dão origem a células endoteliais (EC) (Ribatti 2007). Nesta mesma data, Hueper e Russel encontrar formações parecidas com capilares, em culturas de leucócitos (Hueper e Russel 1932). Um ano depois, Parker observou a formação de vasos organizados em culturas de vasos sanguíneos (Parker 1932). E ainda, em 1950, foi descrita a formação de vasos sanguíneos a partir de culturas de medula óssea (White e Parshley 1950).

Apesar de já por esta altura se poder por a hipótese de que as células progenitoras de vasos sanguíneos pudessem ter origem na medula óssea, foi apenas na década de 80 que através de dois estudos, se pode comprovar que vários tipos de células mesenquimais e

endoteliais não derivavam de células dos vasos sanguíneos em si, mas sim da medula óssea (Feigl 1985; Leu 1987).

No entanto, o primeiro isolamento e caracterização de EPCs só ocorreu em 1997 por Asahara et al.. Neste estudo, foram isoladas EPCs a partir de sangue periférico humano, contendo na superfície celular CD34 entre outros marcadores endoteliais (Asahara et al. 1997). Os dados sugeriam que HSC (células progenitoras hematopoiéticas), um comum precursor de células endoteliais e células hematopoiéticas estava, possivelmente, presente no sangue (Asahara et al. 1997). Estas células pareciam diferenciar-se em células endoteliais *in vitro* e incorporar-se em locais de elevada angiogénese.

Os primeiros marcadores específicos destas células começaram a aparecer em 1997, na experiência descrita anteriormente, onde Asahara et al. relatou que células com os marcadores VEGFR-2 e CD34 incorporam na vasculatura de uma maneira semelhante a células endoteliais, em comparação com células VEGFR-2⁺ e CD34⁺.

Outro marcador de extrema importância é o CD133, que é uma glicoproteína transmembranar e está presente em CPEs e células progenitoras hematopoiéticas, mas não em EC e células hematopoiéticas diferenciadas (Yin et al. 1997 e Miraglia et al. 1997). Já em 2000, Gehling et al. demonstra que células CD133⁺ em contacto com o factor de crescimento VEGF, diferenciam-se em células endoteliais, exprimindo marcadores como VEGFR-2, Tie-2 e o factor von Willebrand (vWF).

Mais recentemente, foi demonstrado que células positivas para apenas o marcador CD34 expressam também Nanog e Oct-4, que são marcadores celulares embrionários, podem proliferar em resposta a factores de crescimento de células estaminais e que são capazes de se diferenciar em células endoteliais, osteoblastos e células neuronais (Romagnani et al. 2005).

Mas os estudos destas células continuam e neste trabalho tentamos abordar uma perspectiva ainda pouco estudada no âmbito da relação entre células progenitoras endoteliais e o músculo esquelético.

3.2-Vascularização de pré a pós natal

3.2.1-Vascularização pré-natal:

A vasculogénese é um processo que pode ser separado em dois passos. O primeiro, consiste na selecção das células progenitoras endoteliais que posteriormente iram dar origem aos vasos sanguíneos localizadas na mesoderme enquanto que o segundo centra-se na

diferenciação dessas células para a criação *de novo* de vascularização sanguínea (figura 1). A posterior expansão da rede de vasos sanguíneos primários denomina-se angiogénese, o que implica formação de novos capilares sanguíneos a partir da remodelação de vasos já existentes (Carmeliet, 2000; Patan, 2000). A angiogénese pode ser dividida em dois processos, “sprouting” angiogénese, que se baseia no crescimento endotelial de ramificações, através da migração e proliferação de células endoteliais e organização tridimensional dos vasos formados (figura 2, ponta da seta), ou ainda, “Non-sprouting” angiogénese, que se trata da formação de novos vasos, através da intersecção e divisão de outros vasos sanguíneos já criados, por parte de tecido intersticial (figura 2, seta).

No período pré-natal, a circulação do saco embrionário é gerada por vasculogénese, seguida pela formação do coração primitivo e ramificações primitivas no embrião. Posteriormente, seguem-se os órgãos originários da mesoderme e endoderme, como por exemplo fígado e baço, sendo também estes vascularizados por vasculogénese (Demello et al., 1997; Robert et al., 1998; Gebb and Shannon, 2000). A angiogénese vai ser responsável pela colonização do cérebro e da medula (Baldwin, 1996; Kurz and Christ, 2001). É ainda possível verificar que a angiogénese consegue ocorrer em simultâneo com a vasculogénese em certos órgãos como por exemplo, rins e pulmões (Baldwin, 1996).

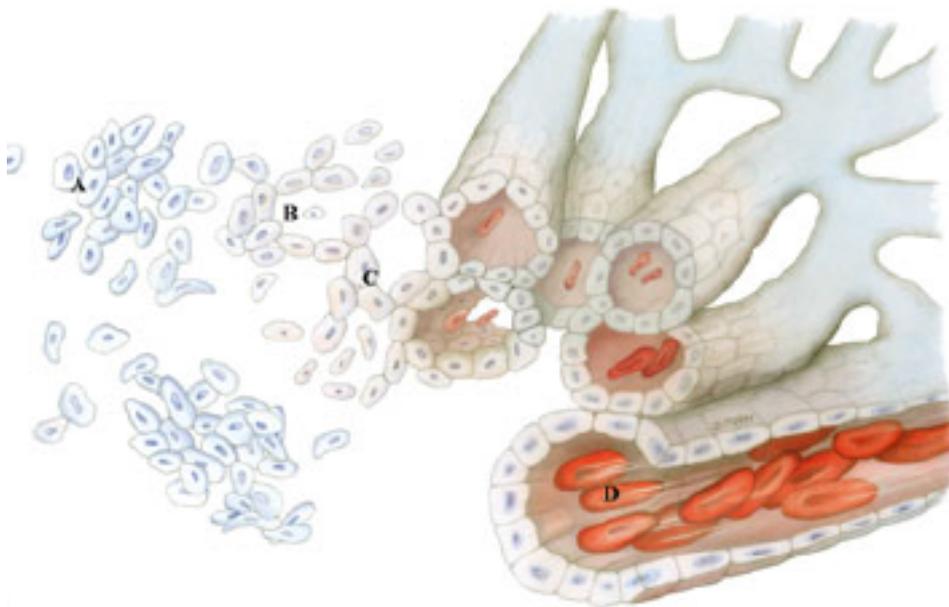


Figura 2. Neovascularização. Evolução da criação de novos vasos sanguíneos desde hemangioblastos (A), passando pela sua especialização (percurso pela corrente sanguínea de CPEs até à diferenciação em endotélio maturo (B-C)), terminando por constituir um vaso sanguíneo funcional (D) (Kässmeyer et al. 2009)

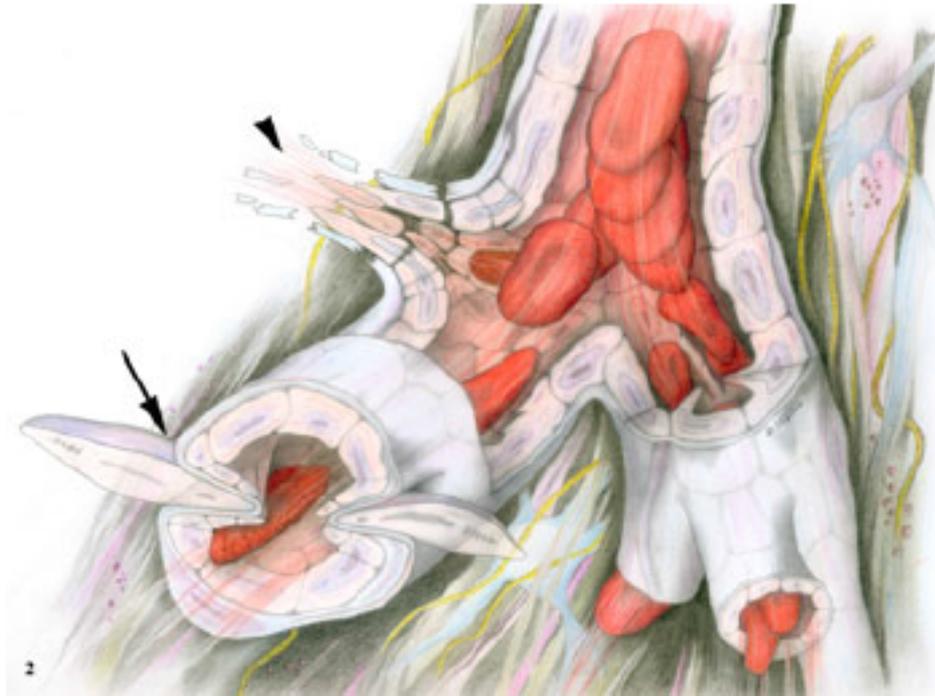


Figura 3. Angiogénese. Dois processos de angiogénese, onde se criam novas ramificações em vasos sanguíneos, através da adição de novas células endoteliais (“*Sprouting*” angiogénese) (**ponta da seta**). Ou, formação de novas ramificações, pela intercepção de vasos já existentes (“*Non-sprouting*” angiogénese) (**seta**) (Kässmeyer et al. 2009).

Pensava-se, então, que a formação de novos vasos sanguíneos pós-natal fosse apenas conseguida através de angiogénese (Kässmeyer et al. 2008). Mas a descoberta do conceito de vasculogénese a partir de células progenitoras endoteliais e outras células estaminais, veio mudar completamente essa visão retrógrada (Drake, 2003; Schatteman and Awad, 2004; Eguchi et al., 2007). Aceitou-se então que para o aparecimento de novos vasos pós-natal, era necessária a contribuição de ambos os processos.

3.2.2-Vascularização pós-natal:

Em 1994, Shi et al. escreveu o fenómeno de endotelização “fallout”. Onde transplantes vasculares artificiais foram “reendotelizados” através de dois mecanismos. Num mecanismo, os vasos vizinhos ressurgiram vascularizando os enxerto, por outro lado, foram criada ilhas endoteliais no centro do transplante surgindo, aparentemente, do sangue circundante.

Em 1997, Asahara et al. isolou células mononucleares humanas do sangue periférico, que demonstraram características parecidas a angioblastos embrionários. Após transfusão dessas células, marcadas, para um rato com isquemia, foi demonstrado que estas células contribuíram para 25% da vascularização no tecido lesado.

Em 1998, Shi et al. num estudo parecido ao seu, feito em 1994, documentou que a endotelização de um transplante foi iniciada por células com os mesmos marcadores das células estudadas por Asahara et al. em 1997. Como estas células continham antigénios característicos de angioblastos embrionários, foram denominadas de células progenitoras do endotélio adulto (Asahara e Kawamoto, 2004).

Numa investigação em ratos transgénicos publicada por Asahara et al. 1999, ficou demonstrado que as células progenitoras do endotélio, da medula óssea, estão envolvidas na neovascularização fisiológica de placenta e *corpus luteum* por exemplo, patológica como no crescimento tumoral e ainda na vascularização patofisiológica como na cura de feridas e regeneração de isquemia em tecidos.

No início do novo milénio, foi aceite que, efectivamente, as células precursoras do endotélio estão presentes no organismo adulto.

3.3- Relevância na medicina:

O melhoramento da neovascularização é uma opção terapêutica para o salvamento de tecido com isquemia (Isner e Asahara 1999). A descoberta de que as células derivadas da medula óssea poderiam ser transplantadas para locais de isquemia e assumir marcadores endoteliais potenciou o uso de células progenitoras endoteliais (EPCs) no melhoramento da vasculogénese.

A infusão de distintos tipos de células, tanto isoladas *in vivo* como cultivadas laboratorialmente, demonstraram aumentar a densidade capilar e neovascularização de tecido com isquemia, como demonstrado quer pela Tabela 1 como pela Figura 4.

Tabela 1. Neovascularização induzida pela injeção de células progenitoras. (Urbich e Dimmeler 2004).

Cell Type	Characteristics	Application	Results
Freshly isolated cells	CD34 ⁺ cells	Incorporation ¹	13.4 ± 5.7% (mouse) or 9.7 ± 4.5% (rabbit) Dil-Ac-LDL-EPC in CD31 ⁺ capillaries ³
	Tie-2 ⁺ , Dil-Ac-LDL ⁺ 29	Hind limb ischemia ²⁹	Frequently detected (not quantified) ²⁹
	CD117 ^{high} /GATA-2/VEGFR2/Tie-2/AC133 24	Myocardial infarction ²⁴	20–25% of total myocardial capillary vasculature ²⁴
Sca-1 ⁺ BM-MNCs	Sca-1 ⁺ 30	Hind limb ischemia ³⁰	Detected (not quantified)
PBMCs	T and B lymphocytes and monocytes-depleted MNCs ³⁰	Hind limb ischemia ³⁰	
Ex vivo expanded cells	Ex vivo expanded EPC	Hind limb ischemia ^{15,31} Myocardial infarction ²³	2.1 ± 0.4 EPCs into vessels in a ×10 field ¹⁵ 241 ± 25 cells/mm ² (day 3) 355 ± 30 cells/mm ² (day 7) ³¹
	Dil-Ac-LDL ⁺ /lectin ⁺ VEGFR2 ⁺ , VE-cadherin ⁺ , CD31 ⁺ , CD14 ⁺ , CD34 ⁺ 15,23	Hind limb ischemia ²⁵	Frequently detected (not quantified) ²⁵
	Dil-Ac-LDL ⁺ , NO ⁺ , VEGFR2 ⁺ , VE-cadherin ⁺ , CD31 ⁺ , vWF ⁺ , CD45 ⁻ 25	Vascular graft survival, Neovessel remodeling ³³	80% of graft lumen at day 15 ³³
	CD31 ⁺ , vWF ⁺ , Dil-Ac-LDL ⁺ , VEGFR2 ⁺ , Tie-2 ⁺ 33	Hind limb ischemia ⁹	19.8 ± 8% CD146 ⁺ /HLA-DR ⁺ cell containing vessels ⁹
	Dil-Ac-LDL ⁺ /lectin ⁺ VEGFR2 ⁺ , CD105 ⁺ , vWF ⁺ , CD45 ⁺ 9	Matrigel capillaries ¹⁶ Outgrowing ECs: exhibited a greater capacity for capillary morphogenesis in vitro and in vivo matrigel models	ND
	Early EPC: Dil-Ac-LDL ⁺ /lectin ⁺ VEGFR2 ⁺ , CD31 ⁺ , Tie-2 ⁺ , VE-cadherin ⁺ , eNOS ⁺ , CD14 ⁺ 16 Outgrowing ECs: VEGFR2 ⁺ , CD31 ⁺ , Tie-2 ⁺ , VE-cadherin ⁺ , eNOS ⁺ , CD14 ⁺ 16	In vitro: late EPC showed better incorporation and tube formation. Early EPC: higher release of growth factors. In vivo: comparable vasculogenic potential of early and late EPC (limb perfusion, capillary density)	Detected (not quantified) ³³
	Early EPC: weak VEGFR1, eNOS, vWF, VE-cadherin, VEGFR2, spindle shape ³³ Late EPC: strong VE-cadherin, VEGFR1, VEGFR2, eNOS, vWF, cobblestone morphology ³³	tumor growth/angiogenesis ²⁰	MAPC-derived ECs ²⁰ 35% tumor angiogenesis, 30–45% wound healing angiogenesis, undifferentiated MAPCs: 12%
MAPC-derived ECs	Co-purified MAPC: CD34 ⁻ , VE-cadherin ⁻ , AC133 ⁺ , Fik-1 ⁺ 20 Angioblast: CD34 ⁺ , VE-cadherin ⁺ , AC133 ⁻ , Fik-1 ⁻ 20		
Clinical studies	BMC and monocytes (TACT-trial)	Intramuscular injection in patients with peripheral ischemic disease; improved blood flow ²⁶	ND
	CPC and BMC (TOPCARE-AMI)	Intracoronary infusion in patients with AMI; increase in coronary flow reserve ²⁷	ND

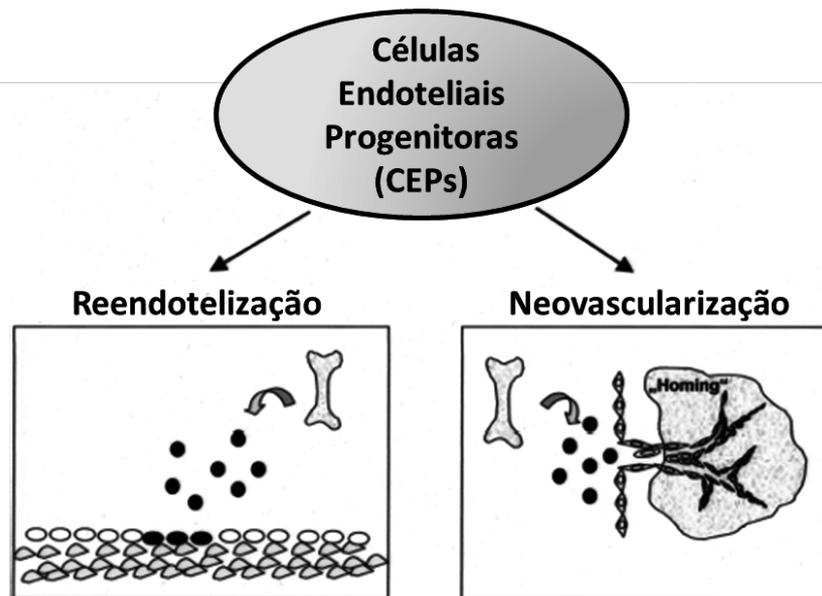


Figura 4. Destino de EPCs. Ao se libertarem da medula óssea, as diferentes populações de células progenitoras endoteliais entram em circulação até captarem um estímulo que inicie a sua diferenciação. A formação de novos vasos sanguíneos ou, simplesmente, novas ramificações é o destino deste tipo celular (Adaptado de Urbich e Dimmeler 2004).

Em modelos animais de enfarte do miocárdio, a injeção de EPCs *ex vivo* melhorou significativamente, não só, o fluxo sanguíneo e a performance cardíaca, mas também melhorou a renovação do tecido no ventrículo esquerdo (Kawamoto et al. 2001, Kocher et al. 2001).

De maneira similar, a infusão de EPCs do sangue periférico em ratinhos (“naked” e “wild”, aumentou a neovascularização em tecido com isquemia (Urbich et al. 2003, Kalka et al. 2000).

A potencialidade angiogénica de EPCs foi também testada em modelos animais de angiogénese tumoral, levando à descoberta de que a supressão do factor de crescimento endotelial vascular (VEGF) origina um bloqueio na formação de vasos na zona tumoral e por conseguinte, a redução do tumor (Lynden et al.2001). Este facto mostra, desde já, a importância do VEGF na formação endotelial.

No entanto, em todos estes estudos existe uma enorme variação de numero, modelo e populações de células utilizadas, o que limita a comparação da eficiência entre estudos, no entanto, um ponto parece comum, tanto uma população extraída da medula (CD133+; KDR+; CD34+), como uma população da corrente sanguínea (positiva para marcadores endoteliais; CD133+), tem resultados comparáveis em termos de regeneração vascular (Figura 5), o que pode indicar que a actividade funcional das células para aumentar a neovascularização é

independente do tipo de célula progenitora endotelial usada (Schatteman et al. 2000, Grant et al. 2002, Hur et al. 2004).

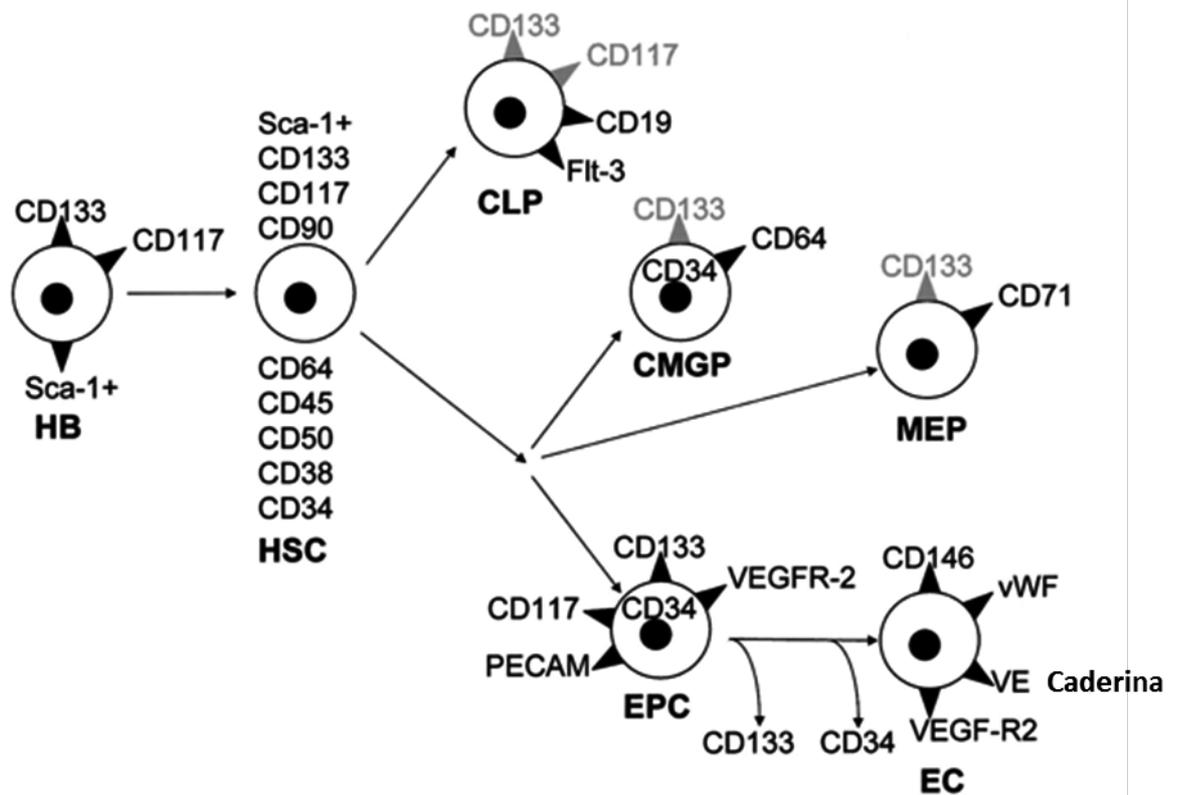


Figura 5. Diversos tipos de células precursoras endoteliais. Cada população celular possui diferentes marcadores que a caracterizam, os descobertos até agora, estão representados na figura, desde hemangioblastos (HB), passando pelas várias populações de EPCs, até as células endoteliais maduras (EC) (Adaptado de Segal et al. 2002).

Para além da utilização de EPCs na restauração da vascularização no miocárdio, em caso de enfarte ou em caso de isquemia, estas células podem ainda ser aplicadas em outros fins como, a optimização da vida de pacientes com diabetes, visto que estes possuem um número inferior de EPCs em circulação, quando comparados a indivíduos saudáveis, principalmente devido à hiperglicemia (Chang et al. 2010, Steinmetz et al. 2010, Palombo et al. 2011).

Ou ainda, uma possível cura para casos de depressão, posto que estes pacientes apresentam níveis de EPCs, CD34+, CD133+, KDR+ inferiores aos pacientes saudáveis. No entanto a relação causa efeito ainda não é determinável (Yang et al. 2011). As EPCs podem também ser utilizadas para, significativamente, regenerar osso partido após injeção local destas células (Atesok et al. 2009).

Para além destas aplicações pode ainda ser criada uma relação entre o exercício físico e a actividade de EPCs. Com o avanço da idade, há uma progressiva diminuição da reparação do endotélio. O exercício físico pode levar ao atenuar dessa diminuição, aumentando a via de sinalização activada por CXCR4 em EPCs (Xia et al.2012).

O aumento da capacidade de criação de endotélio por parte das EPCs, foi intimamente relacionado com o aumento da cascata de sinal activada pelo receptor CXR4 que capta SDF-1. Foi provado que o sinal iniciado por CXR4 é o principal responsável pela recepção e retenção das EPCs nos locais de artérias lesadas, sugerindo, assim, que um aumento nesse sinal, possa facilitar a capacidade de reparação pelas EPCs (Hristov et al., 2007a; Sainz & Sata, 2007; Chen et al., 2010). A prática de exercício físico leva a um aumento no sinal de CXR4, como demonstrado pelo estudo de Xia et al. 2012, resultando assim numa acção contrária à do envelhecimento.

3.4-Characterização:

3.4.1-Characterísticas fisiológicas

Existe uma controvérsia, generalizada sobre a identificação e origem das células progenitoras endoteliais (Urbich e Dimmeler, 2004). A primeira alusão para esse facto, apareceu com o estudo de Lyn et al. 2000, onde mostram a possibilidade de cultura de diferentes populações, a nível morfológico e funcional, de EPCs a partir de células mononucleadas do sangue periférico. Neste estudo essas células progenitoras endoteliais foram estratificadas, consoante as características de crescimento e forma alongada e fusiforme a que chamaram “spindle-like cells”.

Posteriormente, pode estipular-se diferentes, possíveis, origens para células endoteliais, conseguidas a partir de sangue periférico, como: a linha hematopoiética estaminal; a linha mieloide, que sobre pressão selectiva, em cultura, pode originar células endoteliais; outras populações de células progenitoras em circulação, como por exemplo as “side population”; e ainda células maduras, endoteliais em circulação, que se desprendem das paredes de vasos sanguíneos (Mutin et al. 1999).

Na tentativa de restringir a localização foram feitos vários estudos utilizando transplantes de medula, para simplificar a localização das células seleccionadas (Hoetzer et al.

2007). Posteriormente, caracterizando as colónias de células isoladas do receptor de medula óssea, comprovou-se que após 9 dias em cultura, as células continham o fenótipo do receptor, mas não do dador, sugerindo assim, que estas células pudessem ser células endoteliais em circulação ou CECs do seu endotélio vascular. Em contrapartida, as células que surgiram tardiamente em cultura, tinham o fenótipo do dador, sugerindo que estas tenham origem na medula óssea (Hoetzer et al. 2007). Estas últimas possuíam uma capacidade de proliferação muito a cima das inicialmente encontradas, multiplicando o seu número por 1000 vezes em 27 dias, enquanto que no mesmo espaço de tempo as células de fenótipo do receptor, apenas se multiplicaram 20 vezes. Com estes resultados, apesar da discórdia, associada essencialmente a marcadores celulares, pode concluir-se que podem ser localizados dois grandes grupos de células progenitoras endoteliais; um na medula óssea, com uma capacidade de proliferação e diferenciação mais ampla e outro grupo na corrente sanguínea periférica, com uma proliferação e diferenciação mais restrita.

3.4.2-Marcadores

Como estipulado anteriormente, a controvérsia na localização das células progenitoras endoteliais deve-se maioritariamente aos tipos diferentes de marcadores encontrados em distintas populações deste tipo de células (Yoder et al. 2009).

Muitos estudos recentes suportam a existência de um precursor endotelial derivado da medula óssea, denominado hemangioblasto. No entanto a natureza exacta deste tipo celular permanece incerta (Garmy-susini e Varner, 2005). A primeira população de EPCs isolada foi descrita como célula mononuclear CD34+, que adquiriu marcadores endoteliais na sua superfície (VEGF-R2+), em cultura (Asahara et al. 1997). Estudos posteriores mostraram que, existe uma subpopulação na circulação periférica com CD34+, CD133+ e VEGF-R2+, que podem formar colónias endoteliais *in vitro* (Peichev et al. 2000, Gill et al. 2001). Mais recentemente, existe ainda, outros estudos, que mostram a existência de células mononucleares CD11b+ e CD14+ com capacidade de dar origem a colónias de células endoteliais *in vitro* ou *in vivo* (Fujiyama et al. 2003, Gulati et al. 2003, Rehman et al. 2003, Yang et al. 2004, Chavakis et al. 2005, Urbich et al. 2005). Estas células e os seus receptores estão representados na figura 6.

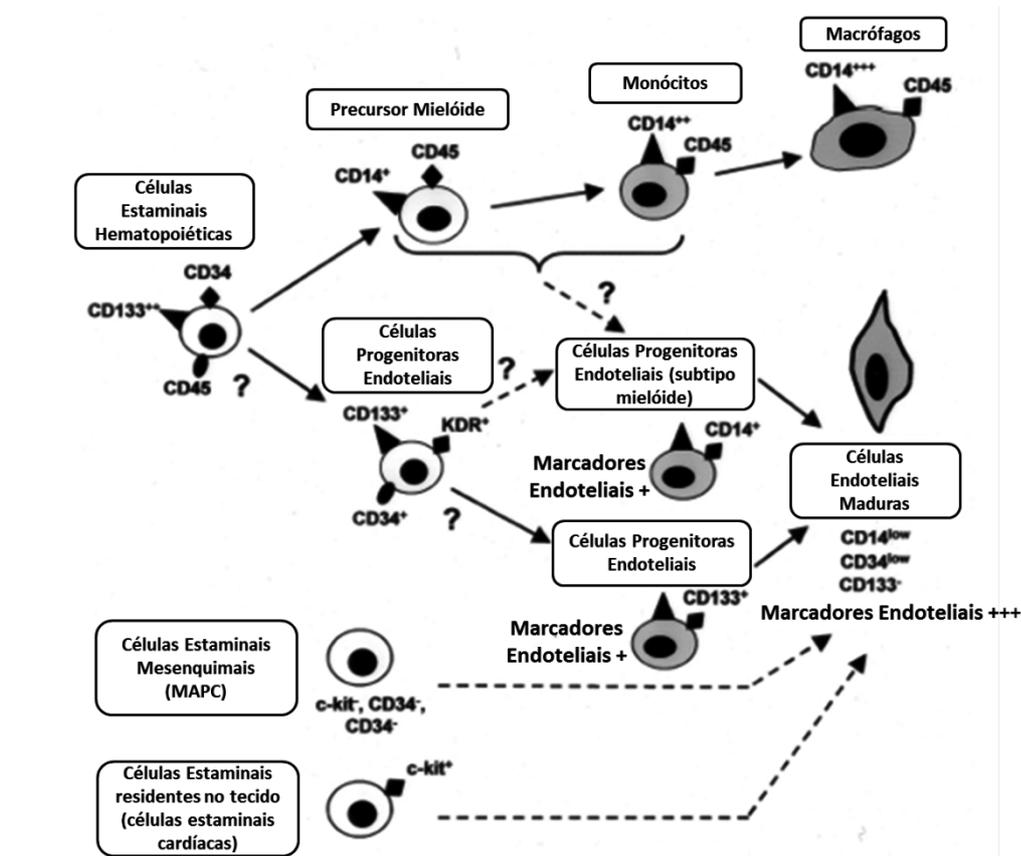


Figura 6. Diversos tipos de células precursoras endoteliais. Outra perspectiva, a mais detalhada, das diferentes populações de EPCs e dos marcadores que as caracterizam. (Adaptado de Urbich e Dimmeler, 2004).

Um estudo recente mostra, ainda, que há células do cordão umbilical (CD34+, CD11+) que podem originar colônias endoteliais (Hildbrand et al, 2004). Fazendo assim, com que, as células precursoras endoteliais possam exprimir ambos os marcadores de progenitoras como CD34 e CD113, marcadores de monócitos CD14 e/ou CD11b e marcadores endoteliais VEGFR2, também visível na figura 4. No entanto, análise á expressão genética, aproxima mais os precursores endoteliais das células endoteliais tumorais do que de células endoteliais em cultura (Bagley et al. 2003).

Shaked et al. (2005) demonstrou, recentemente, que diferentes estirpes de ratos, exibiam diferentes níveis de EPCs em circulação. Estes resultados mostram que muita da contribuição das EPCs para a angiogénese, pode se justificada com pressões intrínsecas ou capacidades de recrutamento dos tecidos.

Muitos dos estudos com células com capacidade angiogénica, derivadas da medula óssea, tem sido executados em ratos com medula óssea Tie2LacZ (Asahara et al. 1997, 1999; Lyden et al. 2001). Tie2 é um conhecido marcador endotelial, mas no entanto, pode ser

expresso por monócitos que possam contribuir para a angiogénese, segregando factores de crescimento. Inclusive, existem estudos que comprovam que muitas das células que expressam Tie2, em tecido angiogénico, não são precursores endoteliais mas sim monócitos F4/80, CD11b+ (de Palma et al. 2003).

Fundamentalmente, muitas das variabilidades na caracterização de EPCs, surge devido a diferentes métodos de purificação. Originalmente, estas células eram isoladas marcando células CD34+ e colocando-as em meio de cultura próprio para crescimento endotelial (Asahara et al. 1997). Posteriormente, as células CD34+ passaram a ser isoladas através de cromatografia de imunoafinidade, mostrando que estas, possuíam uma capacidade de diferenciação em células endoteliais *in vitro*. No entanto, existem estudos, que simplesmente isolam células mononucleares da medula óssea, em cultura, possuindo igual longevidade e capacidade de diferenciação (Garmy-susini e Varner, 2005).

Resultados nos números de EPCs no sangue periférico são variáveis, abrangendo desde 70-210 células/ml de sangue (Peichev et al.2000) até 3,000-5,000 células/ml e sangue (Kalka et al. 2000), mais uma vez, dependendo do processo de isolamento utilizado. Muitas vezes, esses métodos podem trazer outras células acopladas às EPCs, que são, muitas vezes, também chamadas de EPCs de forma errada, o que altera a contagem e pureza da amostra recolhida (Dome et al. 2008). A contínua busca pela identificação de EPCs e pelas suas linhas de diferenciação, trará nova luz sobre as controvérsias relacionadas com este tema (Garmy-susini e Varner, 2005).

Estudos mais recentes mostram que as EPCs podem exprimir, o receptor de factor de crescimento de fibroblastos, CD38, c-kit, CD31, CD146, CXR4, factor de vonWillebrand (vWF), caderina endotelial vascular, Tie-2/TEK (receptor da angioproteína 1 ou túnica intima EC cinase) e CD133 (Hristov et al. 2003, Burger et al. 2002, Massa et al. 2005, Lenz et al. 2005). Podemos, assim, dizer que o termo “EPC” pode incorporar toda uma panóplia de células, com uma vasta variedade de estadios, compreendidos desde hemangioblastos primitivos a células endoteliais completamente diferenciadas (Dome et al. 2008). No entanto, o exacto precursor permanece desconhecido, como já referido anteriormente.

Presentemente, é aceitável considerar que as EPCs primárias, localizadas na medula óssea ou imediatamente no início de circulação, possuem os marcadores CD133, CD34 e VEGFR2, enquanto EPCs em circulação, apresentam os marcadores CD34 e VEGFR2, perdendo o CD133 e iniciando a expressão típica de marcadores de células endoteliais maduras (Hristov et al. 2003). O CD133, considerado um bom marcador de EPCs, deixa de ser expresso em células na iniciação da diferenciação, o que o torna um marcador mais específico para células completamente indiferenciadas (Rafii et al. 2002). Coloca-se ainda a hipótese de que a linha

celular CD133+, CD34+, VEGFR2+, seja apenas hematopoiética e não uma linha celular progenitora de endotélio, pois uma vez exposta a estímulos de crescimento endoteliais e hematopoiéticos, em meios de cultura diferentes, esta linha celular apenas reagiu produzindo células progenitoras hematopoiéticas mas não endoteliais (Case et al. 2007). Mas com apenas um estudo nesta linha, não existem dados suficientes para suportar esta teoria.

3.4.3- Função e local de acção

Como já referido anteriormente, estas populações de células localizam-se na medula óssea e posteriormente, na corrente sanguínea. Mas o destino destas células é a criação de novos vasos sanguíneos (vasculogénese), ou a ramificação de vasos pré-existentes (angiogénese). Quer em casos de isquémia, onde a mobilização de EPCs transplantadas leva a uma melhor circulação sanguínea e aumento da densidade de capilares no tecido lesado (Asahara et al. 1997, Kalka et al. 2000). Ou para o tratamento de doenças da artéria coronária, onde as EPCs podem ser utilizadas para estimular a angiogénese, vasculogénese no coração e performance cardíaca (Siddiqe et al. 2010). Ou ainda, em casos de neovascularização em resposta a citocinas, em adultos (Iwami et al. 2004), ou simplesmente à melhoria da vascularização imposta pela idade avançada, pois ficou provado, que pela troca de medula óssea de ratos jovens, pela medula de ratos em idade avançada, a irrigação dos tecidos diminuía, devido a uma perda de vascularização (Iwami et al. 2004). Em todos esses casos, podemos definir que a actividade das células progenitoras endoteliais requer múltiplos passos, proliferação, mobilização, adesão a células já existentes dos vasos sanguíneos, invasão de tecidos e diferenciação, como podemos observar na figura 7 (Urbich e Dimmeler, 2004).

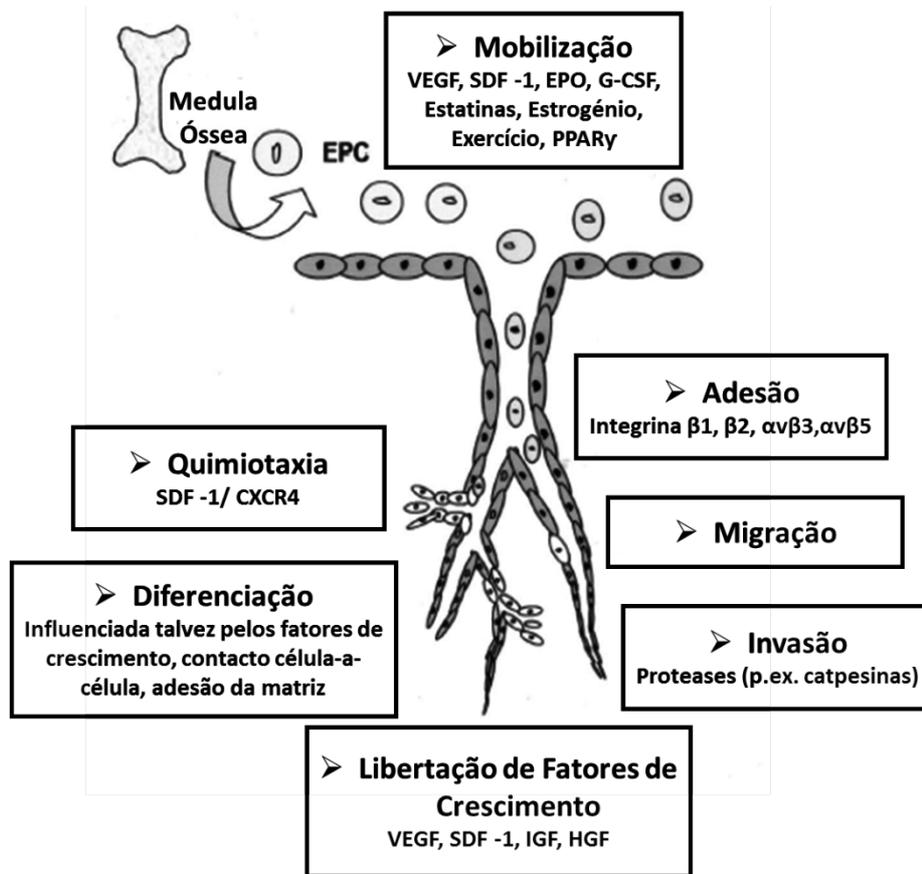


Figura 7. Percurso feito pelas células progenitoras do endotélio. Esta figura representa as várias etapas que as EPCs, tem de passar desde a sua activação, passando pelo reconhecimento do sinal, migração até ao local de acção e por último, á sua integração no endotélio (Adaptado de Urbich e Dimmeler, 2004).

3.4.3.1-Proliferação:

Pouco é conhecido sobre o estímulo biológico que inicia a proliferação e manutenção das populações de EPCs (Jin He et al. 2010). Podemos, contudo, abrir um caminho de modo a elucidar o assunto. CCN1 é uma proteína encontrada na matriz, que pertence ao grupo da família das proteínas CCN que também inclui CCN2/CTGF, CCN3/Nov, CCN4/ WISP-1, CCN5/WISP-2 e CCN6/WISP-3 (Brigstock et al.2003). A CCN1 é expressa por todos os tipos de células vasculares e está implicada em processos celulares como, adesão, migração, proliferação e sobrevivência (Perbal 2001, Grzeszkiewicz et al. 2002). Esta proteína, pode ser rapidamente induzida por VEGF para promover a proliferação, entre outros processos, *in vitro* (Abe e Sato, 2001). No entanto a sua função, exacta, é desconhecida.

Outro elemento importante na proliferação é a ligação SDF-1 aos receptores CXCR 4 e 7 (Chao et al. 2008). Foi confirmado que SDF-1 é responsável pela retenção das EPCs e da sua migração, mas agora também é possível associar essa proteína à proliferação. Durante muitos anos, acreditou-se que apenas o CXCR4 era o único receptor a actuar sobre influência de SDF-1 (Ratajczak et al. 2006), no entanto, estudos recentes provam que há ligação entre SDF-1 e CXCR7, que é vivamente expresso no coração, células vasculares do endotélio, rins, osso, entre outros (Balabanian et al. 2005). Alguns estudos, provam que este receptor, tal como o CXCR4, está envolvidos na proliferação, adesão e quimiotaxia das EPCs (Burns et al. 2006, Siervo et al. 2007).

Foi também relatada a existência de Toll-like receptors em células progenitoras endoteliais (Jin He et al. 2010). Estes receptores reagem a patógenos, normalmente em macrófagos entre outras células e activa a proliferação celular, aumentando a expressão de CD133 e CD34 e diminuindo a expressão de eNOS, sugerindo que tenta manter a célula num estágio estaminal, não permitindo a sua diferenciação (Jin He et al. 2010).

É especulado que VEGF possa também influenciar positivamente a proliferação, mas não é visível que o aumento de VEGF esteja relacionado com o aumento da proliferação (Smadja et al. 2007). Mais estudos terão de ser realizados, antes de ser conhecida toda a capacidade proliferativa das EPCs.

3.4.3.2-Mobilização:

A maioria das EPCs está localizada no “nicho de células estaminais”, na medula óssea, em estado de quiescência (Lapidot e Petit, 2002), conectadas às células do estroma através de integrinas, como representado na figura 6 (Lapidot et al. 2002). Esse nicho, consiste basicamente em fibroblastos, osteoblastos e células endoteliais (Urbich e Dimmner, 2004). A mobilização de citocinas é responsável pela libertação das EPCs, pois provocam danos na ligação entre as células do estroma na medula e possibilita a posterior libertação das células estaminais via migração transendotelial (Urbich e Dimmner, 2004). É também proposto que, células estaminais hematopoiéticas (HEC), se possam dirigir ao nicho para proliferar e diferenciar. Nesta movimentação, os sinais de citocinas também são relevantes, pois fornecem estímulos que capacitam as células progenitoras hematopoiéticas a atravessar a barreira da medula óssea (Lapidot et al. 2002). Para a libertação das células estaminais, são, ainda,

utilizadas elastases, catepsina G e metaloproteases da matriz, para terminar a clivagem da ligação às células do estroma (Urbich e Dimmner, 2004).

Fisiologicamente, a isquémia é o sinal predominante de mobilização de EPCs da medula óssea. Assim, acredita-se que a isquémia leva ao aumento de VEGF e/ou SDF-1 (Lee et al. 2000, Pillarisetti et al. 2001), na circulação e induzem a mobilização das células progenitoras da medula óssea (Takahashi et al. 1999). As citocinas G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) e GM-CSF (granulocyte monocyte-colony stimulating factor), que são utilizadas para causar a mobilização de células CD34+ em pacientes, também levam ao aumento de células progenitoras endoteliais em circulação (Urbich e Dimmner, 2004; Takahashi et al. 1999).

A eritropoietina (EPO), que estimula a proliferação e maturação de precursores de eritrócitos, também leva ao aumento do número de EPCs na corrente sanguínea (Heeschen et al. 2003, Bahlmann et al. 2004). A correlação entre EPO e o aumento do número de células CD34+ ou CD133+ na medula óssea, em pacientes com isquémia na artéria coronária, suporta ainda mais a importância dos níveis de EPO endógena, como mobilizador de EPCs (Heeschen et al. 2003).

Outros factores que podem levar a uma maior presença de EPCs no sangue podem ser, os níveis de estrogénio e exercício, apesar dos mecanismos de acção não estarem ainda descritos (Laufs et al. 2004, Hattori et al. 2001). Ainda é possível verificar que a activação da via PI3K/Akt, que foi inicialmente demonstrada como estando activa em células endoteliais maduras, pode apresentar um papel importante no aumento de EPCs, através da indução por estatinas (Dimmeler et al. 2001, Assmus et al. 2003). Relacionando os factores anteriormente descritos, VEGF, EPO, estrogénio e exercício, promovem o aumento da via PI3K/Akt, propondo assim, uma via comum a todos estes factores. Tendo em conta que dados recentes mostram um papel fundamental de eNOS na mobilização de células progenitoras da medula óssea (Aicher et al. 2003), podemos especular que estes estímulos aumentem a activação da via PI3K/Akt, previamente mencionada, através da actividade de NO sintase, dentro das células do estroma da medula óssea. E de facto, está comprovado que tanto o estímulo de VEGF como a presença de exercício, levaram á atenuação da mobilidade de EPCs em ratos eNOS^{-/-} (Aicher et al. 2003, Laufs et al. 2004).

O processo de activação e migração das células progenitoras de endotélio, pode ser ilustrado através do esquema da figura 8.

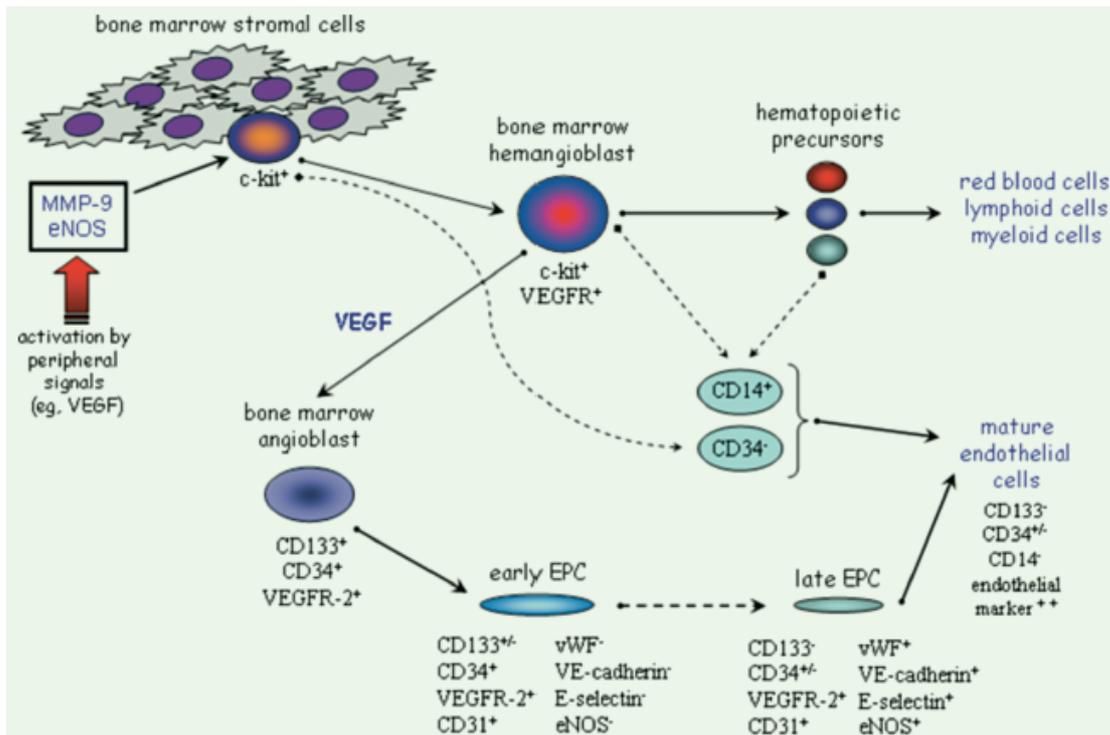


Figura 8. Mobilização, recrutamento e diferenciação de EPCs em humanos. O processo inicial de recrutamento de células estaminais do endotélio requer activação da metaloprotease-9 (MMP-9), que por sua vez, promove a activação do ligando c-kit, que leva á libertação das células c-kit⁺ para a corrente sanguínea. VEGF e/ou FDS-1, mobilizam as EPCs para os locais de acção, iniciando o processo de diferenciação, mesmo antes de chegar ao local alvo (perda de CD133). Dá-se posteriormente, a reendotelização e por fim a diferenciação das EPCs em células endoteliais maduras, criando nova vascularização (Hristov e Weber, 2004).

Quimiotaxia:

Quimiocinas são citocinas que possuem propriedades de quimioatração, facilitando a mobilização de células. Existem quatro famílias baseadas na posição e arranjo dos resíduos de cisteína existentes no N-terminal. Estas moléculas, quando ligadas aos receptor acoplados a proteína G, produzem uma resposta em questão de minutos, em contraste com citocinas, como G-CSF, anteriormente referida, que demora 5 a 7 dias a atingir um valor máximo de células mobilizadas.

A quimiocina mais importante relacionada com a mobilização de EPCs é a stromal-derived factor 1 (SDF1) (Tilling et al. 2009).

A SDF1 (ou CXCL 12) é expressa pelas células do estroma da medula óssea, pulmões e pele, interagindo com as HEC redireccionando-as para estes órgãos (Ponomaryov et al. 2000). Utilizando um vector adenoviral, foi possível comprovar que SDF1 conseguiu promover a mobilização de células progenitoras endoteliais da medula óssea para a circulação, isto indica

que existe um processo capaz de negar a quimiotaxia exercida pela SDF-1 proveniente do estroma na medula (Dar et al. 2006). Existe uma correlação entre a concentração desta molécula no plasma e o grau de mobilização celular, implicando uma resposta a um gradiente proteico (Hattori et al. 2001). Entre os tecidos com capacidade de produção de SDF-1 encontram-se, células endoteliais maduras, tecido danificado ou a sofrer de neoplasia e placas arterioscleróticas, o que aumenta a velocidade de acção das EPCs (Petit et al.2007). Para além disso, é, também, possível encontrar a produção de SDF1 por parte das plaquetas, em tecido embrionário (Langer et al. 2006), bem como as próprias EPCs possuem a capacidade de produzir SDF1, captando-o de forma parácrina (Urbich et al. 2005).

A isquemia tem a capacidade de levar a libertação de SDF1, em proporção ao grau de hipóxia imposto, privilegiando a potenciação da actividade das EPCs através duma acção parácrina (Ceradini et al.2004).

Sinais induzidos pelo stress (irradiação e inflamação por exemplo) levam a uma elevada taxa de SDF em circulação e, por tanto, mobilização de EPCs. Fármacos como fucoidan (que rapidamente faz surgir SDF1, tanto no endotélio como na matriz extracelular da medula óssea) resulta num êxodo de células EPCs CD34+ (Kollett et al. 2003). A medula óssea e as células do estroma, tem a capacidade de interiorizar SDF1 através da via receptores CXCR4 e de o segregar, de novo, numa forma completamente funcional. Após entrar no microambiente da medula óssea, a SDF1 activa a metaloprotease 9 (MMP9) na matriz, que é uma protéase extra celular expressa pela medula óssea e células do estroma. A MMP9 é dependente de óxido nítrico (NO) (como demonstrado por ratos com défice da síntase de óxido nítrico endotelial (eNOS), sendo incapazes de activar MMP9 (Aicher et al. 2003)). O óxido nítrico é um potente mediador da vasodilatação e que potencializa a mobilização, permitindo a libertação das células progenitoras endoteliais para circulação, através da barreira da medula óssea (Petit et al. 2007).

3.4.3.3-Adesão:

A adesão de células progenitoras endoteliais a células endoteliais é uma das fases fisiológicas, críticas, para a regeneração de vasos sanguíneos (Li et al. 2011). Muitas adesões iniciam-se através de conexões entre selectinas e os carboidratos, seus ligandos, o que permite às células deslizar lentamente, ao longo, da parede dos vasos sanguíneos (Li et al. 2011). Quando uma destas células conecta um dos seus receptores membranares a uma molécula quimioattractiva, inicia-se uma cascata de sinal, que despoleta o aumento da

funcionalidade das integrinas (Li et al. 2011). Estas integrinas, então, ligam-se aos seus receptores complementares no endotélio, para uma firme captação da célula circulante. Assim, inicia-se a reparação de artérias lesadas (Ross, 1990).

As integrinas mais conhecidas como tendo a capacidade de interacção célula-a-célula são as integrinas $\beta 2$ e a integrina $\alpha 4\beta 1$ (Urbich e Dimmeler, 2004). As integrinas $\beta 1$ são expressas por vários tipos celulares incluindo células endoteliais e células hematopoiéticas, enquanto as $\beta 2$ são encontradas essencialmente em células hematopoiéticas (Soligo et al. 1990).

Devido aos eventos de adesão ao endotélio e transmigração estarem envolvidos na ligação de células estaminais a tecidos com angiogénese activa, integrinas como a $\beta 2$ e a integrina $\alpha 4\beta 1$, podem estar envolvidas na adesão de células progenitoras endoteliais em tecido com isquemia (Vajkoczy et al. 2003). As integrinas $\beta 2$ (CD18/CD11) são expressas em EPCs derivadas do sangue periférico e são necessárias para a adesão das células progenitoras endoteliais e sua transmigração, *in vitro* (Urbich e Dimmeler, 2004).

Mas a adesão pode, ainda, depender do local fisiológico, pois já foi constatado que a deleção da integrina $\alpha 4$, inibe selectivamente a ligação de células estaminais hematopoiéticas à medula óssea, mas não no baço, o que sugere uma adaptação dos ligandos aos diferentes tecidos (Scott et al. 2003).

Tendo as EPCs como cerne, estudos comprovaram que, a adesão destas células aos vasos sanguíneos parece ser mediada por receptores de vitronectina (integrinas $\alpha v\beta 3$ e $\alpha v\beta 5$). Como tal, a inibição das integrinas $\alpha v\beta 3$ e $\alpha v\beta 5$ com RGD cíclico, existiu o bloqueio da reendotelização nas artérias carótidas *in vivo*, sugerindo que estas integrinas têm um papel vital na adesão das EPCs às células endoteliais da artéria carótida (Walter et al. 2002). No entanto, nada exclui um papel relevante das integrinas $\beta 1$ na reendotelização em outras artérias (Fujiyama et al. 2003)

3.4.3.4- Diferenciação:

Por último, a função das EPCs, culmina com a sua maturação, numa célula endotelial funcional. Os processos que regulam a diferenciação em adultos é desconhecida. No entanto, vários estudos determinaram a diferenciação de um precursor endotelial, a célula estaminal hematopoiética (HSC), durante a evolução embrionária. Claramente, a VEGF e os seus receptores, desempenham uma função vital para a diferenciação endotelial no embrião (Ferrara et al. 1996, Fong et al. 1995, Shalaby et al. 1995). Tal como no embrião, também em

ex vivo, VEGF induz a diferenciação endotelial de células progenitoras endoteliais CD34+, CD 133+ e de células do sangue periférico (Kalka et al. 2000, Dimmeler et al. 2001). Posteriormente, foi ainda possível comprovar que, a regulação dos genes homeobox (Hox), pode representar um papel importante na diferenciação endotelial, embrionária. Principalmente o gene Hex, que é indispensável na diferenciação de HSC nos progenitores endoteliais definitivos e posteriormente na sua diferenciação endotelial (Guo et al. 2003). Adicionalmente, a cinase Pim-1 (serina/tirosina cinase) pode, também, ser essencial na diferenciação de EPCs, pois foi recentemente descoberto que o gene que a codifica é transcrito após activação de uma cascata iniciada por VEGF (Zippo et al. 2004).

3.5-CPEs e exercício:

Como descrito anteriormente, a integridade endotelial é essencial para a manutenção da saúde cardiovascular e de todo o corpo. Para isso, as células progenitoras endoteliais desempenham uma importante função.

Como, por exemplo para casos de indivíduos com risco de doenças cardiovasculares, é importante manter um elevado nível de EPCs (Schmidt-Lucke et al. 2005), o exercício físico, pode ser o melhor método não evasivo para esse fim (Daniel et al. 2004). Estudos recentes tem demonstrado que em pacientes com doenças cardiovasculares e também, em indivíduos saudáveis, o exercício físico aumenta o numero de EPCs em circulação, que levam a uma melhoria das funções endoteliais (Sabine et al. 2005, Ulrich et al. 2004, Croce et al. 2006, Sandri et al. 2005, Laufs et al. 2005).

Estudos anteriores, demonstram que, em pacientes com doenças cardiovasculares, exercício regular, aumenta o numero de EPCs em circulação aumentando a produção de óxido nítrico (Sabine et al. 2005, Ulrich et al. 2004). A prática de exercício regular, requer um aumento do fluxo sanguíneo para as células musculares, para isso o coração tem de bombear fluxos maiores de sangue, o que aumenta a pressão nos vasos sanguíneos. Essa pressão constante, leva a uma maior libertação de óxido nítrico para a corrente sanguínea, o que posteriormente, leva a um maior recrutamento de EPCs da medula para os vasos (por processos descritos anteriormente) (Sabine et al. 2005, Ulrich et al. 2004). O exercício físico agudo, em indivíduos com isquémia, leva a uma maior libertação de VEGF (Volker et al. 2004,

Sandri et al. 2005), o que também promove um maior fluxo de EPCs na corrente sanguínea. Mais concretamente, no estudo de Yang et al. 2007, podemos observar que os níveis de exercício agudo, promovem uma vasta libertação de ON para a corrente sanguínea, o que se reflecte, através de uma análise por FACS, num aumento do número de células progenitoras endoteliais, no sangue periférico (Figura 9).

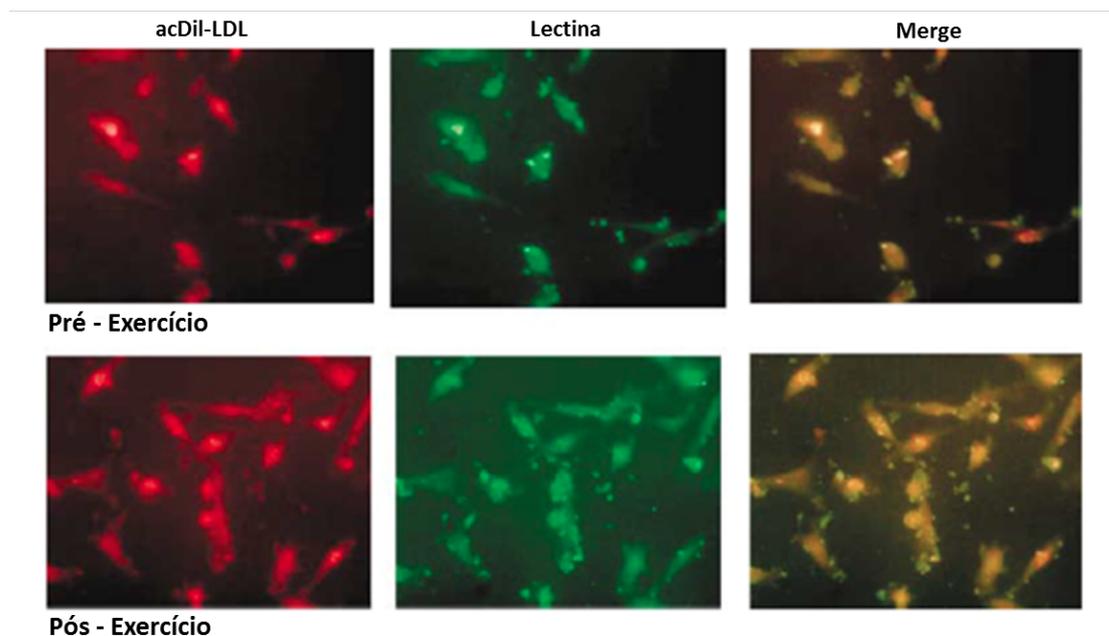


Figura 9. Mobilização de células progenitoras endoteliais, com prática de exercício. Análise por FACS, levada a cabo por Yang et al. (2007), onde demonstra a activação e mobilização de EPCs após exercício físico (Adaptado de Yang et al. 2007)

4-Ibuprofeno e Células progenitoras endoteliais

4.1.1-Ibuprofeno:

O ibuprofeno é um fármaco do grupo dos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) sendo também um analgésico e antipirético, sendo por isso utilizado para aliviar dores e para o tratamento de um vasto numero de inflamações. O seu nome deriva das iniciais do ácido **isobutil-propanóico-fenólico**.

É um produto preferencialmente consumido, devido ao facto de não ser necessária prescrição médica para ser adquirido. Servindo-se desta última característica, o ibuprofeno, bem como o acetaminofeno, são utilizados para evitar a fadiga ou dores musculares

provocados pela prática de exercício, com fim de aumentar a performance (Jennifer et al.,2003, Mikkelsen et al.,2009, McAnulty et al.,2007). Esta prática tem vindo a ser cada vez mais comum, principalmente, em frequentadores de ginásio (Mikkelsen et al.,2009, Carrol et al.,2011).

4.1.2- Anti-inflamatórios não esteroídes (AINEs):

Estes fármacos actuam essencialmente através do bloqueio de enzimas ciclooxigenases que são responsáveis pela produção de prostaglandinas (Cashman,1996). No entanto, os AINEs também exercem as suas funções através de inibições periféricas, nomeadamente ao nível de inibições da via das lipogenases e mecanismos centrais, como a interferência na formação de prostaglandinas no sistema nervoso central (Cashman,1996). Foi também colocada a hipótese destes fármacos poderem inibir aminoácidos excitatórios (Cashman,1996).

4.1.3- Prostaglandinas (PGs):

A produção de prostaglândinas é controlada a dois níveis, primeiro através do controlo da actividade de várias lípases, que promovem a libertação do ácido araquidónico, da membrana fosfolipídica, que é o precursor das prostaglândinas. Segundo, através do controlo da actividade de ciclooxigenases, sendo estas enzimas as responsáveis pela conversão do ácido araquidónico em prostaglândinas (Trappe et al.,2001). Neste último caso, essa actividade enzimática pode ser controlada com a toma de AINEs, como Ibuprofeno, acetaminofeno e aspirina (Trappe et al.,2001), entre outros.

Existem quatro tipos de prostaglândinas bioactivas *in vivo*: Prostaglândina E2 (PGE2), prostaciclina (PGI2), prostaglândina D2 (PGD2) e prostaglândina F2 (PGF2), como pode ser observado na figura 10. São produzidos por ubiquitinação e actuam como mediadores lipídicos, de maneira autócrina e parácrina, para manter a homeostasia no corpo (Ricciotti e FitzGerald, 2011).

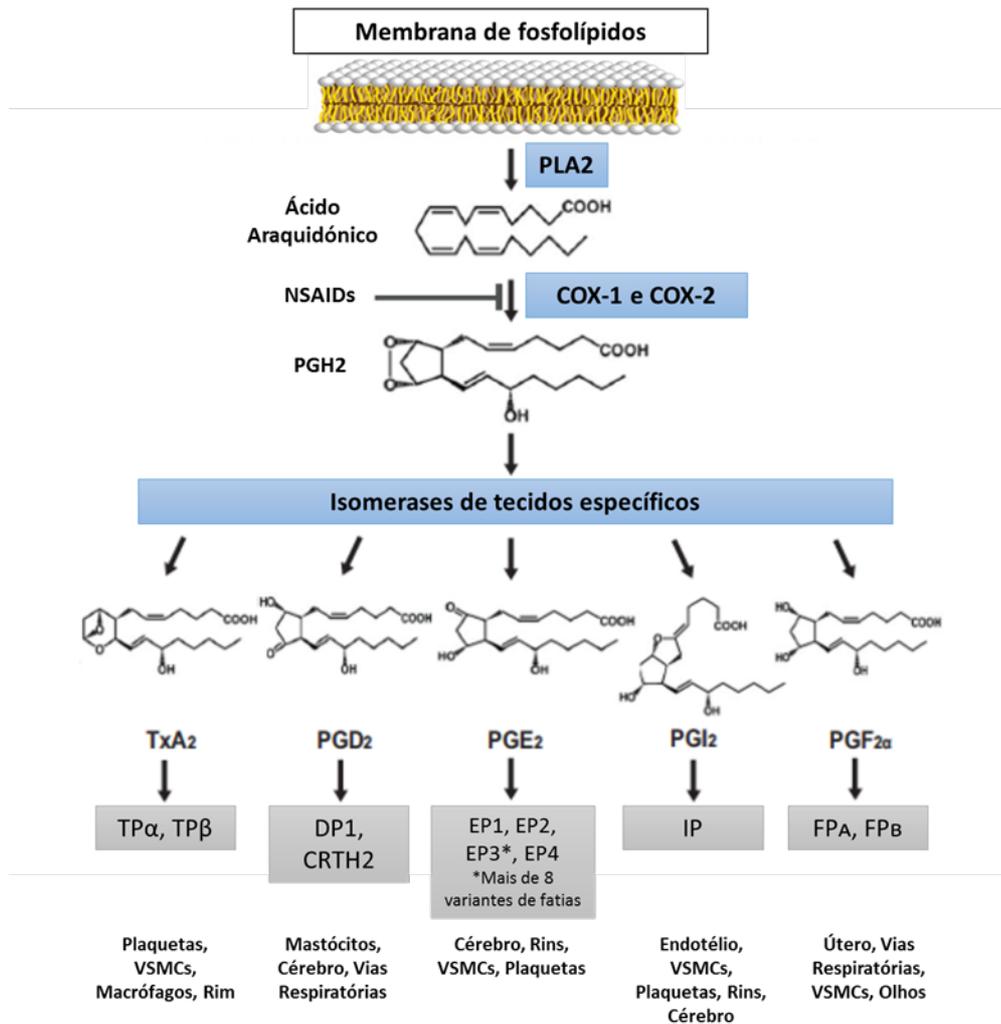


Figura 10. Formas e origem das prostaglandinas (Adaptado de Ricciotti e FitzGerald, 2011).

Durante a resposta inflamatória, ambos os níveis e perfis de produção de PGs mudam dramaticamente (Ricciotti e FitzGerald, 2011). A produção de PGs é, normalmente, baixa em tecidos não inflamados e aumenta imediatamente após inflamação aguda, mesmo antes do recrutamento de leucócitos e células imunitárias para o local inflamado (Ricciotti e FitzGerald, 2011).

4.2-Ibuprofeno e exercício

As PGs são sintetizados na musculatura esquelética e tem sido provado que têm um efeito profundo na movimentação de proteínas (Vandenburgh et al,2005, Rodemann e Goldberg, 1982). Especialmente, PGF₂ e PGE₂ responsáveis pelo aumento de síntese e

degradação, respectivamente, de proteínas da musculatura esquelética (Vandenburg et al,2005, Rodemann e Goldberg, 1982).

As PGs são também conhecidas como modeladores de inflamações e dor (Ferreira,1972, Raja et al. 1988) PGE2 ficou provado como um componente algéscas, bem como estimulador de propriedades algéscas de outros estímulos (Ferreira,1972, Raja et al. 1988).

EPCs e ibuprofeno:

Como descrito anteriormente, o ibuprofeno é um AINE e como tal, inibe a actividade de ciclooxigenases, principalmente a COX-2. Num estudo recente, Muraki et al. (2011) relacionou inibidores de COX-2 com angiogénese em tumores de células endoteliais. No microambiente tumoral, as células endoteliais (CEs) estão expostas a constantes condições de hipoxia, que induzem o factor induzível da hipoxia-1a, que aumenta a actividade da ciclooxigenase-2 em muitos cancros. COX-2 é uma enzima chave na produção de prostaglandinas, sendo conhecida por aumentar a sua actividade em caso de inflamações e em tecidos tumorais (Kaidi et al.2006).

Os fármacos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) inibem a actividade de COX-2, diminuindo a produção de prostaglandinas, inclusive, a dosagem crónica de AINEs, é conhecida como responsável pela diminuição do risco de desenvolvimento de cancro no cólon (Thunn et al. 1991). Em adição, COX-2 estimula a angiogénese, induzindo a expressão de VEGF em células do estroma e células tumorais (acção do VEGF descrito anteriormente) (Williams et al.2000).

Em outros estudos, foi possível constatar que, células tumorais do endotélio do cordão umbilical, super-exprimindo COX-2 aumentaram a elevados níveis os factores da angiogénese, induzindo inclusive, a formação de vasos (Tsuji et al. 1998). Adicionando a estas observações, vários estudos sugerem que bloqueios de COX-2 tem vantagens terapêuticas em vários modelos de cancro (Chan et al. 2004, Csiki et al. 2005). Estudos recentes mostram que as células endoteliais dos tumores variam de células normais do mesmo tecido, tanto em marcadores, como em fenótipo (St Croix et al. 2000, Amin et al. 2006, Pasqualini et al. 2000). Assim também poderia ocorrer o mesmo processo com a sensibilidade a inibidores de ciclooxigenases.

Também seria importante bloquear a mobilização e actividade de EPCs, posto que estas desempenham um papel fundamental na angiogénese tumoral. Assim, é necessária a comprovação de que os inibidores da COX-2, apenas afectam células tumorais e EPCs e não a linha celular endotelial normal. Com o trabalho da sua equipa, Muraki (2011) conseguiu comprovar que, não só as células endoteliais do tumor são mais sensíveis a inibidores de COX-2 que as células endoteliais normais, mas também que é possível reduzir a actividade

angiogénica das EPCs inibindo a actividade de COX-2, propondo assim que se possa utilizar como *alvo* as células endoteliais dos tumores e as EPCs, sem influenciar a actividade das células normais do endotélio, caso se use níveis moderados de inibidores de COX-2 (Muraki et al. 2011).

Com estes resultados, podemos especular que, como inibidor das ciclooxigenases, o ibuprofeno, quando utilizado diariamente, em caso de dores agudas em resposta a exercício físico intenso, que é um caso comum em utilizadores de ginásios, pode levar a uma diminuição da angiogénese de todos os tecidos, promovendo uma diminuição nos componentes essenciais para a sobrevivência das células que circulam no sangue. Deixando assim, o corpo incapacitado de responder eficazmente a estímulos de exercício agudo. Resultados mais aprofundados sobre este assunto, serão discutidos posteriormente, no nosso trabalho.

Capítulo II – Objetivos

5-Objectivos:

É sabido que o exercício físico induz alterações musculares que, inicialmente são agressões fisiológicas, mas que rapidamente passam a um estado adaptativo.

Um músculo activo necessita de um suprimento de oxigénio maior pelo que é natural que a rede vascular do músculo sofra alterações concomitantemente às alterações no tipo de fibras. Neste sentido, é importante analisar as alterações vasculares (ou precursoras) induzidas pelo exercício.

Como anteriormente referimos, a toma sem prescrição clínica de anti-inflamatórios não esteroídes (AINE's) tem tido um aumento exponencial entre os frequentadores de ginásios. De entre estes fármacos destacamos o ibuprofeno como sendo o fármaco mais utilizado.

Deste modo, é objectivo deste trabalho estudar o efeito do ibuprofeno nas alterações da vascularização induzidas pelo exercício aeróbio.

Objectivos específicos

Neste trabalho pretendemos estudar o efeito do ibuprofeno combinado com o treino aeróbio:

1. Na relação capilar/fibra muscular após treino aeróbio de oito semanas, de modo a verificar as alterações na vascularização do músculo.
2. Um dos possíveis mecanismos para a alteração do número de capilares é o aumento da produção e/ou libertação das células progenitoras do endotélio (EPC's). Assim, pretende-se estudar o número de EPC's em sangue total com vários marcadores de superfície de modo a verificar o seu estado de diferenciação.
3. A diferenciação das células endoteliais depende da presença de um factor de crescimento, pelo que estudaremos também a quantidade plasmática de VEGF.
4. Todos estes parâmetros serão estudados no músculo solear de ratos Wistar, tal como será explicado na metodologia.

Capítulo III – MATERIAIS E MÉTODOS

6-Materiais e métodos

6-Materiais e métodos

Plano Geral de Trabalhos

O trabalho foi dividido em várias etapas que incluíram o treino dos animais, a verificação da eficácia do treino (através de um teste de velocidade/resistência), colheitas de sangue para extracção de plasma (para doseamento de VEGF) e sangue total para quantificação/identificação de EPC's. Após a eutanásia dos animais foi removido o músculo gastrocnemius para análise histológica.

A cada semana os animais foram pesados anteriormente ao treino.

A porção de ração consumida foi também quantificada.

Manutenção e selecção dos animais

Ratos Wistar, machos (Com 200-250g no início do estudo) foram adquiridos aos laboratórios Charles-River (Barcelona-Espanha). Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas com dois animais em cada, no biotério de manutenção do Instituto de Imagem Biomédica e Ciências da Vida (IBILI) da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, com ciclos de 12 h (claro/escuro) num ambiente com controlo de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e humidade ($50 \pm 10\%$) e com comida e água *ad libitum*.

Os animais foram manuseados com o máximo de cautela de maneira a minimizar o efeito do stress ambiental. O protocolo experimental foi executado de acordo com European Convention on Animal Care, tendo ainda, todo o projecto, no qual estão incluídos estes estudos, recebido a aprovação da Fundação Portuguesa de Ciências e tecnologias.

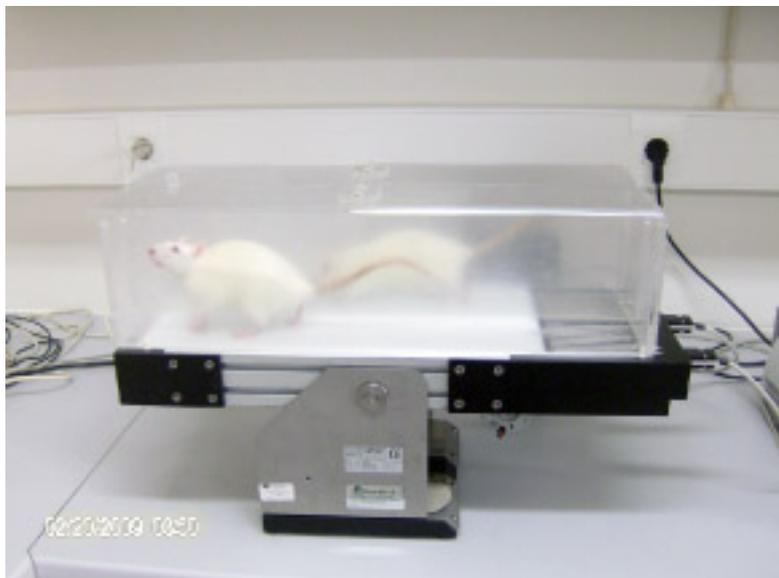
Os animais foram arbitrariamente seleccionados em quatro grupos: Controlo com solvente (I); Controlo mais Ibuprofeno 40 mg.Kg^{-1} (II); Exercício e solvente (III), e exercício mais Ibuprofeno 40 mg.Kg^{-1} (IV). Os ratos foram tratados diariamente com ibuprofeno durante 8 semanas através de administração oral, 15 min antes do exercício. O ibuprofeno administrado foi a formula comercial (Brufene®) dissolvido em sumo de laranja, como indicado para o uso em Humanos. Ambos os grupos receberam o mesmo volume do fármaco ou solvente.

6.1-Treino animal

Os animais tiveram um período de adaptação ao biotério de uma semana após o que foram pesados e iniciaram uma fase de adaptação ao treino em tapete rolante.

O Treino aeróbio consistiu num programa de corrida em passadeira rolante (Panlab/Letica LE8706, Barcelona, Spain) com duração de 8 semanas, com aumento do tempo total de sessão (de 15 minutos iniciais para 50 min na última semana) e de intensidade (aumento da velocidade máxima de 12 cm/s a 54 cm/s e com inclinação de 5% incluída a partir da 6ª semana). Os grupos de controlo (I e II) tiveram acesso à passadeira 10 minutos, uma vez por semana, para evitar interferência do sistema nervoso central, mantendo, assim, as suas capacidades motoras.

Para finalizar o treino os animais foram submetidos a um teste de performance (velocidade/resistência) para aferir a eficácia do treino. Este teste foi efectuado de acordo com o método descrito por Eliakim 35 tal. (1997). O protocolo conta com uma inclinação da passadeira de 5%. Neste teste, são cedidos 4 minutos de aclimatização á passadeira, sucedendo-se um aumento de velocidade para os 25 cm/s durante 4 minutos. Posteriormente, introduz-se um aumento da velocidade de 10 cm/s a cada 4 minutos até à exaustão física dos ratos. São contabilizados: o tempo de teste, a velocidade máxima atingida e a distancia máxima percorrida por cada animal.



6.1.1-Avaliação da massa Corporal dos animais

A massa corporal dos animais foi determinada à chegada, no início do estudo (semana zero) e no início de cada semana de treino. A massa corporal dos animais no final do estudo foi

também determinada. Para tal, foi utilizada uma balança Kerin CB 6K1 com precisão de 1 g e a capacidade máxima de 6 Kg.

6.1.2-Avaliação do consumo de comida

O consumo de comida foi avaliado diariamente sendo pesada a comida adicionada e a restante do dia anterior. As medições da quantidade de comida foram também efectuadas usando uma balança Kerin CB 6K1 com precisão de 1g e a capacidade máxima de 6 Kg.

Os animais foram alimentados com uma comida standard (SAFE-A03).

6.2-Sacrifício dos animais necrópsia e isolamento muscular

Após 8 semanas de treino e tratamento os animais foram sacrificados por overdose de sódio pentobarbital. Foram, então, recolhidos os músculos solear. Os músculos do membro direito, foram utilizados para análise histológica enquanto que os do membro esquerdo foram utilizados para análises moleculares. Estas amostras de músculo foram imediatamente colocadas em azoto líquido e armazenadas a -80°C para posterior análise.

Tendo em conta o facto do ibuprofeno, à semelhança de outros fármacos do mesmo grupo, serem agressivos para a mucosa gástrica, foi feita a necrópsia dos animais. O esófago/estômago/primeira porção do duodeno (D1), fígado, rins e pulmão foram enviados para análise anatomopatológica.

6.3-Análise Histológica

Após o isolamento muscular, foram efectuados estudos histológicos. Nos quais estão incluídos a coloração por hematoxilina-eosina (a fim de verificar a integridade muscular e/ou variações induzidas pelo exercício) e a coloração por ATPase, com a finalidade de contar e medir os diferentes tipos de fibras. Os capilares musculares foram analisados por marcação de fosfatase alcalina em secções congeladas usando o método previamente descrito em Takeshita et al. (1994). Estes resultados foram expressos na razão entre capilaridade e número de fibras musculares, contados em campos de 200 fibras por imagem.

Secções transversais de músculo (5 µm) foram cortados num Criótomo, modelo Leica CM 1850 UV, a -25°C e colectadas em lâminas de vidro, 24° - 32 mm. A actividade da adenosina trifosfato miofibrilar (mATPase (E.C.2.1.3.5.7.9.1) foi determinada após pré-incubação em condições de pH ácido e base, de acordo com a literatura clássica.

Foi feita a marcação por hematoxilina-eosina (HE) para cada músculo, a fim de verificar a integridade das fibras musculares.

6.3.1-Colheitas de Sangue

Em cada série de ratos foram efectuadas duas colheitas de sangue. Uma no tempo Zero (antes do início do treino) e outra no final do treino (48h após o último exercício).

Para proceder à colheita de sangue, os animais foram anestesiados com cetamina (Imalgene 1000 –Merial) por via intraperitoneal numa dose de 40 mg.Kg-1. O sangue, num volume de 2 ml foi colhido da veia jugular através de punção com agulhas 29G x ½” – 0,33 mm x 12 mm (Terumo; Bélgica). As seringas foram previamente preparadas com anticoagulante (EDTA a 6%).

6.3.2-Preparação do plasma

Após a colheita do sangue, este foi dividido em dois tubos de polipropileno: um para separação do plasma e outra para marcação das células progenitoras do endotélio para análise por citometria de fluxo.

Para separar o plasma as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm (Heraeus Labofuge 400r), a uma temperatura de 4°C durante 20 minutos.

Após centrifugação, foi separado o plasma e armazenado em aliquotas a -80°C até doseamento das amostras.

6.3.3-Doseamento de VEGF plasmático

A quantidade de VEGF plasmático foi analisada em amostras de plasma (obtidas como descrito acima) pelo método de ELISA recorrendo à utilização de um kit comercial (R&D Systems).

6.3.4-Obtenção, quantificação e identificação das EPC's

Como referimos anteriormente, as amostras de sangue periférico foram divididas em dois tubos. Do tubo contendo sangue total foram retirados 500 µl.

As amostras foram incubadas com os anticorpos, conjugados com fluorocromos, durante 15 minutos à temperatura ambiente e protegidos da luz. Todos os anticorpos (anti-Flk-1 PE (BD Bioscience), anti-CD133 FICT (Millipore), anti-CD34 FICT (antibodies-online.com)) foram adicionados na quantidade de 2 µl.

Após a incubação com os anticorpos, foram adicionados 4,5 ml de tampão de lise para eritrócitos (1:10) Facslysing, BD Biosciences). As amostras foram incubadas durante 15 minutos, à temperatura ambiente, protegidas da luz e sob suave agitação.

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 1500 rpm (Kubota 5910). Após este procedimento as amostras foram decantadas e ao sedimento foram

adicionados 2 ml de PBS (1:10) (GIBCO 10x, pH 7,4). Após a agitação em vortex as amostras foram centrifugadas (5 minutos, 1500 rpm) e o processo repetido uma vez mais. Após a última lavagem foram adicionados 250 µl de PBS e as amostras analisadas no citómetro de fluxo.

A aquisição e análise das amostras foram realizadas no citómetro de fluxo FACS-Canto II (com três lasers e oitos cores de configuração e com o software FACS-diva 6.1.2 (BD Biosciences). A compensação de fluorescência é feita automaticamente e verificada de forma periódica através do uso de “CompBeads” (BD Biosciences). Para cada amostra foram analisados 1 000 000 de eventos.

Os ajustes de amplificação para FSC e SSC foram usados de modo linear, para os canais de fluorescência foi usado de modo logaritmico e posteriormente pela análise do software Infinicity 1.5 Cytognos (Salamanca, Espanha) foi convertido de modo analógico.

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

6.4-Análise estatística

Os resultados encontram-se expressos em médias \pm erro padrão. Tendo em consideração o tamanho e normalidade das amostras foram utilizados métodos não paramétricos. A comparação entre variáveis foi efectuada através do teste de Mann-Witney com um intervalo de confiança de 95%.

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

Capítulo IV – RESULTADOS

7-Resultados:

Sendo que os animais em estudo foram sujeitos a um programa de exercício físico que tende a modificar o tipo de fibras musculares, como veremos seguidamente, reveste-se da maior importância estudar outros parâmetros como a evolução da massa corporal e o desempenho físico dos animais após 8 semanas de treino.

Deste modo, e no que se refere à massa corporal, podemos observar (gráfico 1) que existe uma clara diferença entre o grupo com prática de exercício e simultânea administração de ibuprofeno (Exercício + IBU) e todos os outros grupos, reflectindo-se numa acentuada diminuição da massa corporal. Podemos ainda constatar que o grupo com prática de exercício possui um aumento da sua massa corporal superior aos restantes grupos. Porém, estes valores são apenas significativos em relação ao grupo com prática de exercício e administração de ibuprofeno (exercício + IBU) na última semana de treino. Tal como era de esperar há um aumento progressivo da massa corporal ao longo do tempo.

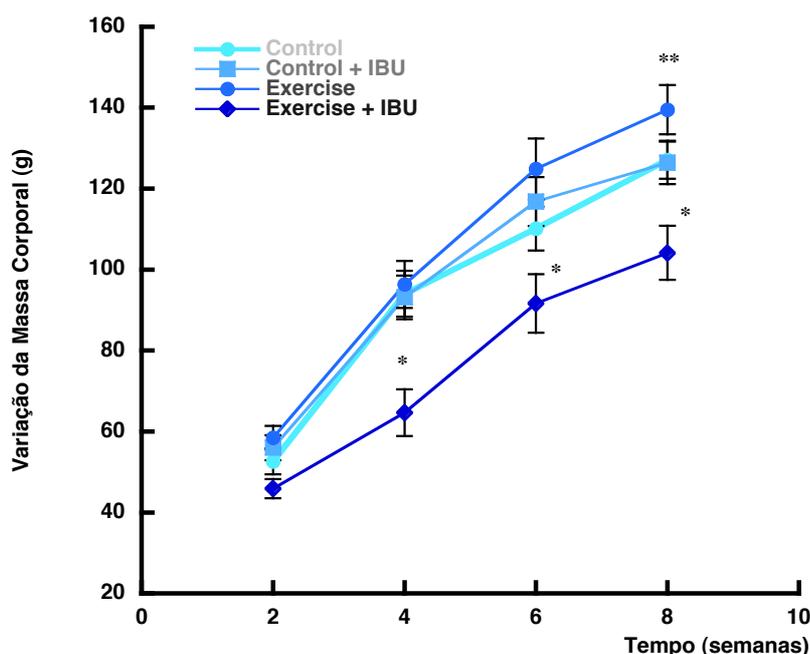


Gráfico 1 – valores médios da massa corporal dos ratos durante o período de treino. Controlo (n=8); Controlo com administração de Ibuprofeno (controlo +IBU; n=6); ratos treinados (exercício; n=10) e Exercício com administração de ibuprofeno (Exercício + IBU; n=10). O ibuprofeno foi administrado por via 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.

Os resultados do gráfico 1 podem ser suportados com os dados relativos à ingestão de comida ao longo do período de treino (gráfico 2). Podemos constatar que o grupo de exercício consumiu mais comida que qualquer outro grupo (gráfico 1), o que é compatível com o

aumento da massa corporal dos ratos deste mesmo grupo, enquanto o grupo com prática de exercício e administração de ibuprofeno parece não ter qualquer alteração em relação aos grupos controlo, mas significativamente mais baixa relativamente ao grupo que só praticou exercício físico (treino aeróbio). Após análise do gráfico 1, podemos observar que o aumento da massa corporal dos ratos deste último grupo referido é muito inferior comparativamente aos grupos controlo, sendo este um dado interessante e a ter em conta numa posterior análise. Para além disso, não parece ter existido qualquer alteração no consumo de comida, quando comparamos o grupo de controlo com o grupo de controlo com administração de ibuprofeno.

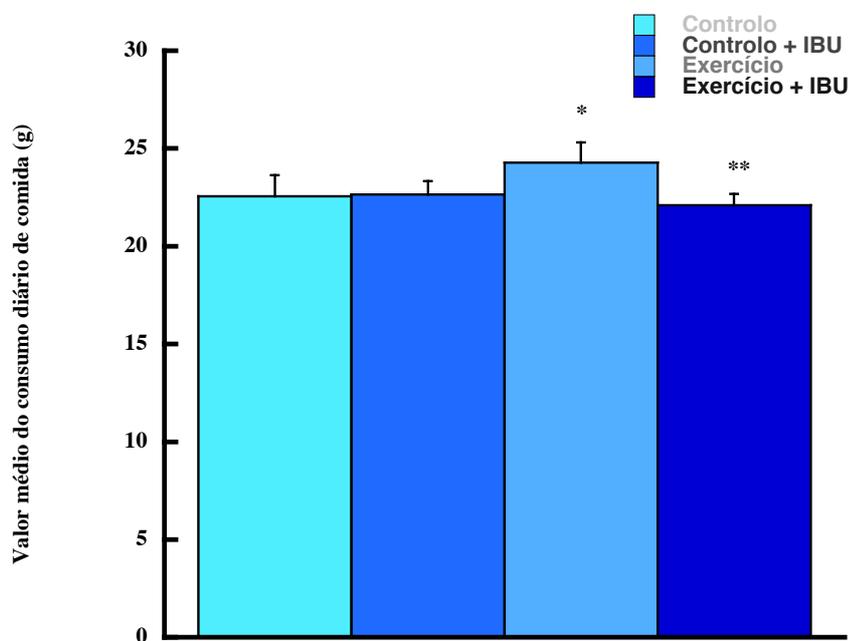


Gráfico 2 – valores médios de ingestão diária de comida durante as oito semanas de treino. Controlo (n=8); Controlo com administração de Ibuprofeno (controlo +IBU; n=6); ratos treinados (exercício; n=10) e Exercício com administração de ibuprofeno (Exercício + IBU; n=10). O ibuprofeno foi administrado por via oral, diariamente na dose de 40 mg.Kg⁻¹. As barras representam a média dos valores e as linhas verticais o erro da média. *p<0.05 relativo aos grupos controlo; **p<0.05 relativo ao grupo de exercício

Relativamente à performance de ambos os grupos com exercício e exercício e administração de ibuprofeno, podemos observar que superaram em todos os parâmetros a performance dos grupos controlo e controlo com administração de ibuprofeno (tabela I),

dados que estão de acordo com os gráficos 1 e 2 relativos ao grupo com exercício. Isto deve-se ao facto de que para uma maior performance podemos esperar um maior dispêndio de energia e por conseguinte um maior consumo de comida. Associando esse ponto ao aumento da massa muscular, entre outras razões, podemos esperar um aumento da massa do corpo dos animais, tal como é observável no gráfico 1 para o grupo de exercício. Quanto ao grupo com exercício e administração de ibuprofeno, podemos ver na tabela I que apresenta valores de performance maiores que os dos grupos controlo mas mais baixos que o grupo com exercício, o que poderia ser calculado visto que o consumo de comida é quase idêntico a esses mesmos grupos e inferior aos animais com prática de exercício apenas (gráfico II). De destacar que os animais tratados com ibuprofeno mas que não realizaram exercício apresentam valores de corrida (velocidade, distancia e tempo) inferiores ao grupo controlo, principalmente na velocidade e distancia percorrida.

Tabela 2 – Teste de performance. 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 valores representam a média ± SEM das velocidade máxima atingida, distancia máxima percorrida e tempo de teste.

Grupo	Velocidade (cm/s)	Distância (m)	Tempo (min)
Controlo	14.86 ± 0.68	194.71 ± 21.21	49.28 ± 2.75
Controlo + IBU	12.89 ± 0.59	162.60 ± 13.86	48.33 ± 1.66
Exercício	19.20 ± 2.99*	303.00 ± 21.35*	61.00 ± 8.00*
Exercício + IBU	17.14 ± 0.73*	294.00 ± 23.27*	59.29 ± 2.97*

*p<0.05 relativo ao controlo e controlo + IBU

Tendo em consideração que o ibuprofeno, à semelhança de outros AINEs pode produzir alterações gastrintestinais foi feita a análise anatomopatológica de vários órgãos como referido no capítulo matérias e métodos. Nenhum dos órgão analisados apresentou qualquer alteração histológica pelo que podemos considerar segura a toma do fármaco nas nossas condições experimentais.

Pela análise do gráfico 3 podemos observar que o exercício aeróbio continuado altera o tipo de fibras musculares. Assim, o grupo treinado apresenta uma maior percentagem de fibras tipo I após as oito semanas de exercício. Do mesmo modo, o grupo que foi submetido a treino mas que tomou concomitantemente ibuprofeno também evidencia um aumento de

fibras tipo I. Porém, neste último grupo, o aumento foi mais baixo. Estes referidos aumentos nas fibras tipo I parecem acompanhar a diminuição de fibras do tipo II que se verifica em ambos os grupos e por comparação com os respectivos grupo controlo.

Estes valores refletem-se na tabela I, onde podemos verificar que um aumento de fibras do tipo I está relacionado com uma melhor performance.

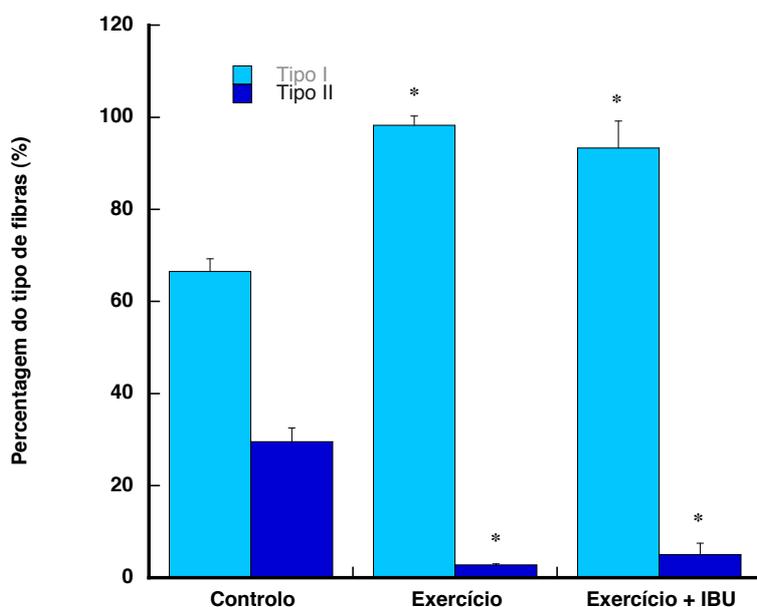


Gráfico 3 – Valores percentuais do acréscimo ou diminuição de fibras do tipo I e II respectivamente, no músculo solear. Controlo (n=8); Controlo com administração de Ibuprofeno (controlo +IBU; n=6); ratos treinados (exercício; n=10) e Exercício com administração de ibuprofeno (Exercício + IBU; n=10). O ibuprofeno foi administrado por via oral, diariamente na dose de 40 mg.Kg⁻¹.As barras representam a média dos pontos e as linhas verticais o erro padrão da média. *p<0.05 relativo ao controlo e controlo + IBU

É importante ter a noção que este estudo é feito com exercício prolongado aeróbio e que a colheita de sangue não foi feita imediatamente a seguir ao término do treino dos ratos, por isso os resultados obtidos, não vão ser fruto de um momento, mas sim de contínuos picos de exercício físico.

Assim após análise histológica do músculo solear, pode verificar-se que o número de capilares a irrigar o músculo aumentou com o treino. Estes valores são dados pela relação entre fibra e capilares na sua periferia. Com exercício é possível observar que há um aumento significativo do número de vasos sanguíneos, quando comparando a ambos os controlos. De igual modo, pode observar-se que há um aumento na vascularização do tecido muscular do músculo solear, com a prática de exercício físico e administração de ibuprofeno, pois o valor da razão capilar/fibra, apresentados no gráfico, é, também, superiores aos valores

apresentados pelos controlos (o que pode ser considerado normal, devido á presença de exercício). Mas contudo, esse valor é inferior à razão apresentada pelos grupos de exercício.

Entre os grupos de controlo e controlo com administração de ibuprofeno, não é observável qualquer alteração, apesar do valor do grupo de controlo com ibuprofeno, ser tendencialmente inferior ao controlo.

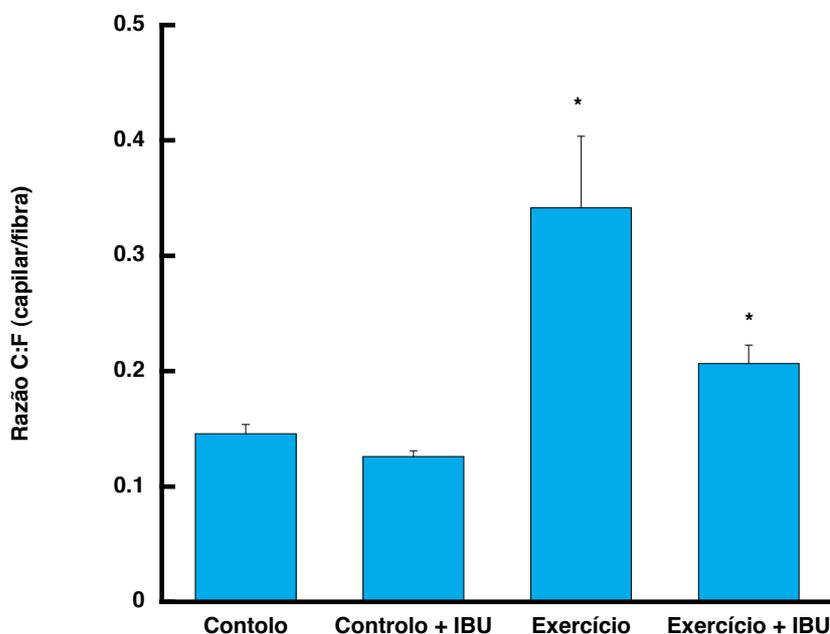


Gráfico 4 – Valores da razão capilar/fibra (C:F) no músculo solear em ratos controlo (n=8); Controlo com administração de Ibuprofeno (controlo +IBU; n=6); ratos treinados (exercício; n=10) e Exercício com administração de ibuprofeno (Exercício + IBU; n=10). O ibuprofeno foi administrado por via oral, diariamente na dose de 40 mg.Kg⁻¹. As barras representam médias e as linhas verticais o erro da média. *p<0.05 relativo ao controlo e controlo + IBU.

Na tentativa de justificar os valores apresentados no gráfico anterior, mediu-se o factor de crescimento endotelial vascular (VEGF).

De acordo com os dados anteriormente apresentados, A concentração plasmática de VEGF é maior concentração plasmática no grupo de exercício, quando comparando com todos os outros grupos, o que condiz com um aumento da vascularização promovida pelo exercício. No grupo de exercício com administração de ibuprofeno, podemos ver que o valor de VEGF é elevado, o que pode levar a uma vascularização elevada, tal como apresentado no gráfico anterior, mas neste caso, apresenta valores inferiores, em relação ao grupo que só praticou exercício físico. Mais uma vez, os controlos não apresentam diferenças significativas entre si, o que condiz com os resultados anteriormente descritos.

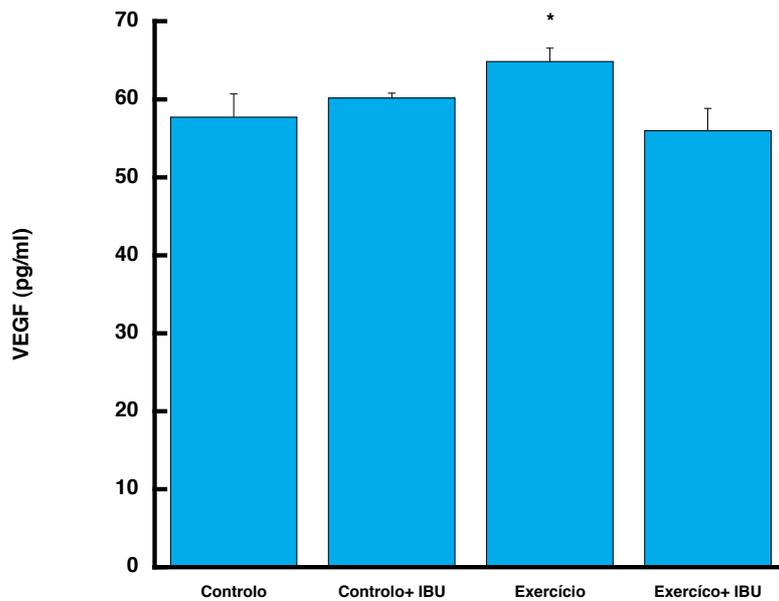


Gráfico 5 – Valores plasmáticos de VEGF em ratos controlo (n=8); Controlo com administração de ibuprofeno (controlo +IBU; n=6); ratos treinados (exercício; n=10) e Exercício com administração de ibuprofeno (Exercício + IBU; n=10). O ibuprofeno foi administrado por via oral, diariamente na dose de 40 mg.Kg⁻¹. As barras representam médias e as linhas verticais o erro da média. *p<0.05 relativo ao controlo e controlo + IBU.

No que diz respeito a células CD133⁺ é possível verificar que estão pouco presentes nas amostras de sangue, no entanto, podemos afirmar que há um aumento no valor destas células nas amostras de sangue do grupo com prática de exercício e administração de ibuprofeno. Este grupo apresenta o valor mais alto dos quatro grupos, não havendo qualquer diferença nos restantes três grupos.

No Gráfico 6 podemos observar que as células CD34⁺ estão elevadas em todas as amostras. Ainda assim, sem alguma significância, podemos ver que existem muito mais células CD34⁺ nas amostras de sangue do grupo com exercício e ibuprofeno.

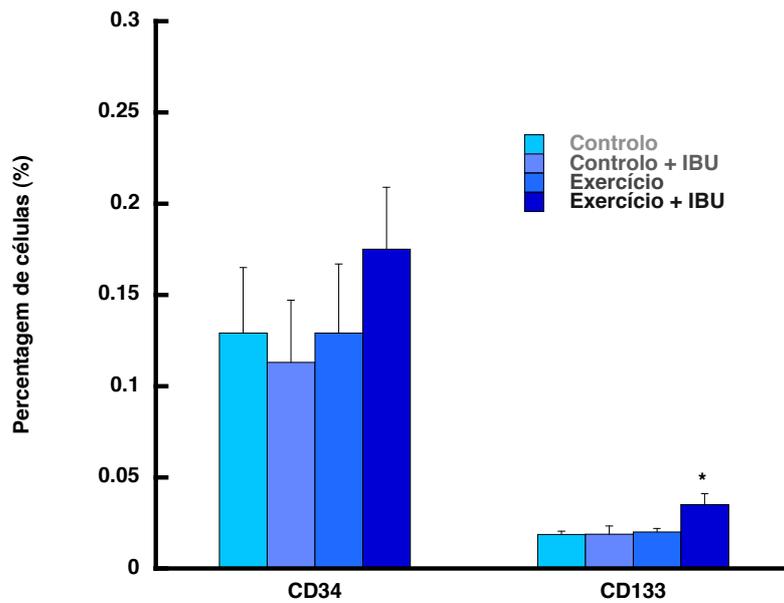


Gráfico 6 – Percentagem de células marcadas com CD34 e CD133 em sangue total de ratos controlo (n=8); Controlo com administração de Ibuprofeno (controlo +IBU; n=6); ratos treinados (exercício; n=10) e Exercício com administração de ibuprofeno (Exercício + IBU; n=10). O ibuprofeno foi administrado por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

É possível verificar que existem elevados valores de células que expressam tanto KDR, como CD146, o que era de esperar, visto que há tanto um aumento do valor da razão capilar/fibra como no VEGF encontrado nas amostras. No entanto, há uma clara predominância de células com KDR e CD146, na corrente sanguínea, no grupo de exercício com administração de ibuprofeno, sobre os outros grupos, sendo que apenas apresenta um valor significativo quando comparando o grupo de exercício com administração de ibuprofeno, ao grupo com exercício apenas. Nos valores de CD146, não existe nenhuma diferença, apesar dos valores no grupo controlo serem superiores aos restantes.

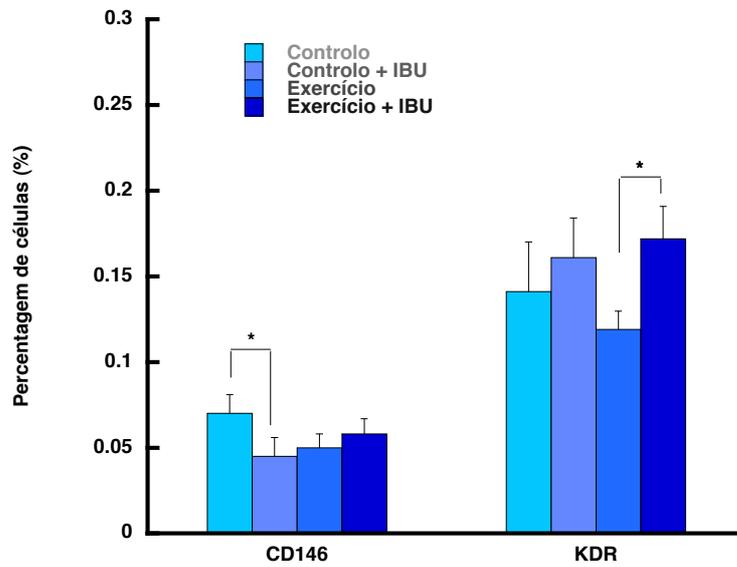


Gráfico 7 – Percentagem de células marcadas com CD146 e KDR (Flk1) em sangue total de ratos controlo (n=8); Controlo com administração de Ibuprofeno (controlo +IBU; n=6); ratos treinados (exercício; n=10) e Exercício com administração de ibuprofeno (Exercício + IBU; n=10). O ibuprofeno foi administrado por via oral, diariamente na dose de 40 mg.Kg⁻¹. As barras representam médias e as linhas verticais o erro da média. *p<0.05 entre os grupos assinalados (controlo vs Controlo + IBU; para CD146 e Exercício vs exercício + IBU para o KDR).

Capítulo V – DISCUSSÃO

8-Discussão:

É incontestável que o exercício físico tem inúmeros benefícios para a saúde. Porém, o uso de certas substâncias associadas ao exercício pode, em certos casos, diminuir a eficácia pretendida.

O uso de Ibuprofeno sem prescrição tem aumentado exponencialmente entre a população que frequenta ginásios. Tendo em conta que a plasticidade do músculo esquelético e estruturas adjacentes são parte integrante do benefício do exercício físico foi objectivo deste trabalho saber até que ponto a toma de ibuprofeno associada ao exercício altera as adaptações musculares.

Os mecanismos de vascularização muscular induzidos pelo exercício são, em parte, promovidos pelas EPCs. A importância destas células vai além do músculo esquelético uma vez que podem contribuir para a substituição de endotélio lesado em outras partes do corpo.

Neste trabalho foi usado um modelo animal de modo a ultrapassar as questões éticas das biopsias musculares em humanos.

Com esse objectivo em mente começámos por determinar a massa corporal de cada rato Wistar ao longo do período de 8 semanas de treino.

O exercício em passadeira é bastante utilizado em laboratório para estudar o aumento da massa muscular e a síntese proteica de ratos (Munoz et al. 1994).

De acordo com o estudo de Slentz et al. 2004, a massa corporal aumenta consoante a intensidade de treino prolongado, possivelmente devido, entre outros factores, ao aumento da taxa da síntese proteica nos músculos exercitados. Aumento esse, que pode ir até 19%, segundo o estudo de Trappe et al. 2001. Conjugando estes resultados com os estudos de Weinheimer et al. 2006, Bondesen et al. 2004, McNulty et al. 2006 e Mikkelsen et al. 2009, podemos afirmar que através da administração de ibuprofeno a síntese de proteínas diminui. Estes estudos comprovam que o ibuprofeno bloqueia a actividade das ciclooxigenases através da produção de prostaglandina $F_{2\alpha}$, o que leva a uma diminuição da síntese de proteínas nos músculos e, provavelmente em outros tecidos corporais. Estes resultados podem ser transpostos para o nosso trabalho, justificando assim, os dados demonstrados no gráfico 1, onde o aumento de peso dos ratos do grupo de exercício com administração de ibuprofeno é inferior a todos os outros grupos, uma vez que o ibuprofeno inibe a ciclooxigenase.

Conjuntamente a estes resultados foi apresentado um estudo sobre o efeito do ibuprofeno na densidade óssea (Kohrt et al. 2010). Neste estudo podemos ver a influência negativa do ibuprofeno na densidade óssea, onde este fármaco, com toma anterior ao

exercício físico, proporciona a inibição de prostaglandinas, nomeadamente a prostaglandina E_2 , que apresenta um papel vital da transdução mecânica na formação óssea (Kohrt et al. 2010).

O aumento da massa corporal nos restantes grupos pode ser justificado com o trabalho de Tokuyama et al. 1981, onde está demonstrado que massa corporal dos ratos aumenta ao longo de 50 dias de treino, tanto no grupo de exercício, como nos controlos. Também o consumo de comida aumenta ao longo do estudo, sendo que é ainda superior no grupo de exercício (Tokuyama et al. 2004). Estes resultados são compatíveis com os dados apresentados no nosso trabalho (Gráfico 1 e 2).

No estudo de Vikne et al. (2006), em que participaram 17 homens que realizaram exercícios concêntricos ou excêntricos de flexão do membro anterior, com a finalidade de estudar a performance muscular, verificou-se que com a prática dos respectivos exercícios, tanto a velocidade angular do braço, como resistência e força suportada pelo mesmo membro, aumentaram. Isto deve-se a cima de tudo, ao aumento de fibras especializadas no tipo de exercício executado (Vikne et al 2006). Transpondo estes resultados e enquadrando com o nosso trabalho, pode facilitar a compreensão dos dados apresentados na tabela 1 e nos gráficos 3, posto que, nos grupos em que o exercício está presente, a performance aumenta, em comparação com os grupos controlo, tal como descrito por Vikne et al. 2006. Com os resultados deste trabalho, descritos anteriormente, podemos concluir que é devido ao aumento do número de fibras do tipo I, que, neste caso, são as fibras específicas para exercícios prolongados aeróbios (gráficos 3). Tendo este dado em conta, é compreensível que a performance dos grupos controlo seja parecida e com os valores mais baixos dos quatro grupos. Os dados de Vikne et al. 2006 podem servir para explicar, também, os resultados da performance do grupo com exercício e administração de ibuprofeno. Estes são ligeiramente inferiores ao grupo com apenas exercício (Tabela 1), pois o número de fibras de tipo I é, também, inferior aos valores apresentados pelo grupo com exercício (Gráfico 3).

Este resultado revela que conjugando a prática de exercício com a toma de ibuprofeno há uma redução do número de fibras especializadas para o tipo de treino em prática (Gráficos 3 e 4), que neste caso é um treino prolongado. Isto deve-se principalmente ao facto de que o ibuprofeno é um fármaco que inibe a via das ciclooxigenases, em particular, a produção da prostaglandina $F_{2\alpha}$ (Weinheimer et al. 2006; Bondesen et al. 2004). As prostaglandinas (PGs) são responsáveis pela produção de proteínas após exercício. Apesar dos processos envolvidos não serem ainda explícitos (Weinheimer et al. 2006), estas foram implicadas em processos de proliferação, diferenciação e fusão de mioblastos (Bondesen et al. 2004). Acoplando os estudos de Weinheimer et al. 2006, Bondesen et al. 2004, McAnulty et al.

2006 e Mikkelsen et al. 2009, podemos chegar á conclusão que após a administração de ibuprofeno, a activação das ciclooxigenases é muito menor, o que leva a uma produção muito reduzida de prostaglandinas e assim, como é observável nas imagens da publicação de Mikkelsen et al. (2009), em exercício excêntrico, leva a uma diminuição da activação de células satélite e portanto uma menor capacidade de troca de fibras aptas ao exercício imposto.

Os resultados deste estudo demonstram não só que o exercício físico aumenta a presença de células progenitoras endoteliais (EPCs) na corrente sanguínea, como também, prova que a administração de ibuprofeno inibe a angiogénese.

Foi também demonstrada uma relação linear entre o aumento da produção de NO na corrente sanguínea e a activação de EPCs em resposta a exercício físico (Laufs et al. 2004). Como descrito o exercício físico reduz o stress oxidativo, pelo menos, em parte, pela via da sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS) (Kodja et al. 2001 e Fukai et al. 2000). Assim, o exercício físico aumenta a biodisponibilidade de NO o que promove um aumento das EPCs na corrente sanguínea (Fukai et al. 2000). Este dado pode ser comprovado pela deleção de eNOS, que leva a uma drástica redução dos níveis de EPCs, enquanto que tratamento com estatina, leva a um aumento de EPCs, por uma via dependente de NO (Vasa et al. 2001). Para além das células progenitoras, a inibição de NO, leva a uma abrupta redução no teor de VEGF no plasma. O que indica que o VEGF é regulado, durante o exercício, por NO (Lafus et al. 2004).

O VEGF, tal como o SDF-1, são conhecidos por causarem a mobilização rápida de células estaminais hematopoiéticas e células progenitoras endoteliais, em circulação, em modelos animais (Moore et al. 2001, Hackett et al. 2001). Há ainda outro grande factor na produção de VEGF que é a isquemia. A isquemia leva a produção de VEGF para a circulação, com intuito de mobilizar EPCs para o local (Sandri et al. 2005). O exercício físico em sessões intensas pode gerar lactato suficiente para causar isquemia momentânea, o que leva ao aumento de VEGF na corrente sanguínea (Sandri et al. 2005).

Para verificar a importância do VEGF e das EPCs começámos por analisar a vascularização do músculo através do cálculo da razão capilar/fibra, que de acordo com os estudos anteriormente referidos, deveria mostrar um claro aumento na vascularização das amostras do músculo solear dos grupos com prática de exercício. Ao comparar os resultados obtidos com a literatura, podemos observar que, efetivamente, ambos os grupos com exercício possuíam uma vascularização superior aos grupos controlo. No entanto, observámos também, que o grupo de exercício possuía valores de razão capilar/fibra muito superiores ao grupo de exercício com administração de ibuprofeno. Isto pode ser comprovado pois, o estudo de Murali et al. 2012, afirma que a actividade da ciclooxigenase-2 leva a uma inibição do processo angiogénico por parte de células tumorais endoteliais e pelas células progenitoras

endoteliais. Assim, com a aplicação de ibuprofeno, um inibidor de COX-2 (Weinheimer et al, 2007, Sciorati et al. 2010, Carroll et al. 2011), podemos justificar a diminuição da razão capilar/fibra nos tecidos em estudo, devido á diminuição da angiogénese. Portanto, a pesar do exercício elevar os valores a cima dos resultados apresentados pelos controlos, a razão capilar/fibra mantem-se inferior á razão apresentada pelo grupo com exercício.

Neste ponto devemos lembrar que o ibuprofeno é um inibidor não selectivo da ciclooxigenase, inibindo tanto a COX-1 como a COX-2.

Dada a relevância que o VEGF possui, fomos, ainda, calcular a concentração de VEGF na corrente sanguínea, após todas as sessões de treino.

A VEGF mantém-se em valores muito elevados, no plasma, apenas por 5 minutos posteriores à sessão de exercício. A pesar disso, os contínuos picos de VEGF, levam a um nível basal superior em indivíduos com treino regular, quando comparado a indivíduos sedentários. Assim, tal como descrito na literatura e em conjunto com todos os factos previamente referidos, observámos que os níveis de VEGF no grupo com prática de exercício, apresentavam-se significativamente mais elevados que nos controlos (Lafus et al. 2004, Yang et al. 2007). Como demonstrado na tabela 1 dos resultados deste trabalho, podemos ver que com a administração de ibuprofeno, há uma ligeira redução na performance dos animais, quando comparado com o grupo de exercício. Como comprovado no estudo de Laufs et al. (2005), podemos observar que a intensidade do treino é, também, significativa na actividade das EPCs, assim, podemos especular se os resultados com ibuprofeno não sejam comparáveis a um treino de menor intensidade, causando um nível basal de VEGF inferior, no grupo de exercício com administração de ibuprofeno, ou se, tal como refere a literatura, os efeitos do ibuprofeno derivam directamente das acções inibitórias sobre a ciclooxigenase. Os restantes dois grupos controlo, não apresentam diferenças.

De acordo com os resultados obtidos, podemos prever que o grupo de exercício resultará numa maior frequência de activação de EPCs e, portanto, estando intimamente correlacionado com o aumento da angiogénese por nós observado. E, por conseguinte, que o oposto ocorra no grupo de exercício com administração de ibuprofeno.

Para comprovar estes dados, procedeu-se à marcação de células com anticorpos contra CD34, CD133, CD146 e KDR. Foi então comprovado que existia, no plasma, uma grande presença de células CD34⁺ em todos os grupos, com predominância no grupo de exercício e ibuprofeno. O CD34 é uma glicoproteína que existe na membrana celular de células da linha hematopoiética (Pilling et al. 2009). Esta molécula está presente, por exemplo, não só em macrófagos, como também em fibrócitos, para além de várias populações de EPCs (Pilling et al. 2009). Possivelmente, devido a inespecificidade do marcador, os níveis de CD34⁺ apareceram

mais elevados do que deveriam, pois não estão apenas a detectar uma colónia de EPCs, mas também, muito possivelmente, outras populações celulares.

Em casos de prática de exercício, os níveis de fibroцитos, macrófagos e EPCs estarão mais elevados que em casos regulares (Li et al. 2012, Woods et al. 2000), mas devido à inibição da angiogénese, poucas EPCs, poderão terminar a sua diferenciação aumentando a vascularização. Assim, são obrigadas a continuar a circular pela corrente sanguínea até à sua morte. Este será um factor principal, para o facto dos valores de CD34⁺ aparecerem tão elevados. Esta inibição não está presente no grupo com exercício, o que pode justificar o facto de haver uma maior vascularização, e, portanto, um menor número de células CD34⁺ na corrente sanguínea.

O CD 133 é um marcador endotelial, localizado na superfície celular de células progenitoras endoteliais (Dome et al. 2008). Este marcador é, no entanto, perdido ainda na medula óssea, ou pouco depois destas células entrarem em circulação (Dome et al. 2008). Pode ser, então, atribuído o título de marcador de células indiferenciadas à molécula CD133. A falta deste marcador nas células em circulação, pode ser um factor fundamental para os níveis baixos de células CD133⁺ em todas as amostras. O único dado significativo neste gráfico é, o facto o valor mais elevado destas células, ser atribuído ao grupo de exercício com administração de ibuprofeno. Isto pode dever-se ao facto de que devido à acção do ibuprofeno, a diferenciação não é prioritária para as populações de EPCs, o que obriga a permanência de células indiferenciadas mais tempo na corrente sanguínea, como descrito anteriormente por outros autores.

O KDR (Flk-1) é o receptor de VEGF-2 e localiza-se, essencialmente, na membrana célula de populações da linha endotelial (Smadja et al. 2007, Holmes et al. 2007).

Os nossos resultados não mostraram diferenças entre os valores do grupo em exercício e do grupo com exercício e administração de ibuprofeno. Estes valores podem dever-se, essencialmente, a dois factores. Primariamente, o facto do ibuprofeno inibir a angiogénese, leva a que um maior número de EPCs indiferenciadas, sejam obrigadas a circular na corrente sanguínea até morrerem, como já referido anteriormente. Este pode ser um contributo para que o número de células KDR⁺ seja superior no grupo de exercício e ibuprofeno e menor no com exercício apenas. Mas outro factor, também importante, é o facto de níveis elevados de VEGF regular a expressão de KDR e eNOS (Fenge t al. 1999).

A VEGF promove a remoção de KDR para o núcleo, através de calveolina, num processo dependente de NOS (Fenge t al. 1999). Com estes dados, podemos afirmar que caso

exista um meio onde esteja presente mais VEGF, deveram existir menos células KDR⁺. Ora, como podemos constatar pelos nossos resultados, atribuído ao grupo com pratica de exercício, está o maior valor de VEGF na corrente sanguínea e de forma inversa, um menor valor no grupo com exercício e administração de ibuprofeno. Assim, é simples de assumir, que os resultados do nosso trabalho e os dados adquiridos por Fenge et al. (1999), poderão estar relacionados.

Podemos verificar também, que os valores de CD146 apresentados, são bastante inferiores aos valores de KDR. Isto pode dever-se ao facto do marcador CD 146, ser mais restrito dentro das populações de EPCs, que quando comparando com KDR (Fenge t al. 1999, Thijssen et al. 2006, Shih, 1999). O CD146 é uma molécula intermembranar que permite a adesão celular (Shih, 1999).

Os nossos resultados não mostraram diferenças significativas, mas podemos observar que o valor tendencialmente mais elevado diz respeito ao grupo controlo, estando todos os outros grupos a baixo deste. Este é um marcador novo e possui uma acção ainda, pouco determinada e algo controversa na literatura.

Capítulo VI – CONCLUSÕES

Tal como referido anteriormente a prática de exercício físico induz adaptações musculares que numa fase inicial podem provocar desconforto ou mesmo dor. Por esta razão, o consumo sem prescrição de anti-inflamatórios não esteroides, nomeadamente o ibuprofeno, tem aumentado exponencialmente. Tendo em conta que o ibuprofeno é um inibidor não selectivo da ciclooxigenase seria de esperar que o consumo deste fármaco interferisse na plasticidade da musculatura esquelética. Por outro lado, o exercício aeróbio aumenta o número de fibras lentas-oxidativas o que implica um aumento do aporte de oxigénio e como consequência um possível aumento do número de capilares no músculo exercitado.

Assim, este trabalho teve como principal objectivo explorar o efeito do ibuprofeno na vascularização do músculo esquelético através do estudo do seu efeito nas células progenitoras do endotélio (EPCs).

Os resultados obtidos permitem-nos concluir que o ibuprofeno reduz a vascularização do músculo solear, através da inibição da diferenciação/mobilização de EPCs, num modelo animal com prática de exercício regular (treino aeróbio).

Os estudos através de marcadores, mostram que o nível de EPCs em circulação no grupo de exercício com administração de ibuprofeno é superior a todos os outros, o que indica que estas células não estão a entrar em diferenciação gerando células endoteliais maduras.

A redução da actividade de EPCs reflete-se numa menor vascularização, como pudemos observar por uma menor razão capilar/fibra, quando comparado com o grupo apenas treinado sem influência do fármaco.

Acresce o facto de os nossos resultados terem demonstrado que o ibuprofeno também interfere negativamente na adaptação das fibras musculares ao exercício e na performance após treino reduzindo-as.

Em conjunto, estes dados sugerem que as EPCs circulantes contribuem para a vascularização do musculo solear mas que a sua actividade é reduzida pelo uso de ibuprofeno, o que reforça a necessidade de apelar contra o uso recreativo deste fármaco.

Capítulo VII – BIBLIOGRAFIA

Bibliografia:

- Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, Zeiher A, Dimmeler S. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 2003; 9: 1370–6.
- Allen RE, Boxhorn LK. Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor I, and fibroblast growth factor. *J Cell Physiol* 138: 311–315, 1989.
- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284: 770–776, 1999.
- Asahara, T., and A. Kawamoto: Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 287, C572– C579, 2004.
- Asahara, T., H. Masuda, T. Takahashi, C. Kalka, C. Pastore, M. Silver, M. Kearne, M. Magner, and J. M. Isner: Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ. Res.* 85, 221–228. , 1999
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964–7.
- Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N et al Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOP-CARE-AMI). *Circulation* 106:3009–3017 (2002).
- Atesok K, Li R, Stewart DJ, et al. Endothelial progenitor cells promote fracture healing in a segmental bone defect model. *J Orthop Res* 28:1007–1014 (2010).
- Bagley RG, Walter-Yohrling J, Cao X, Weber W, Simons B, Cook BP, Chartrand SD, Wang C, Madden SL, Teicher BA. Endothelial precursor cells as a model of tumor endothelium: characterization and comparison with mature endothelial cells. *Cancer Res* 63: 5866–5873 (2003).
- Balabanian K, Lagane B, Infantino S, et al. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem.* 2005; 280: 35760–6.
- Baldwin, H. S.: Early embryonic vascular development. *Cardiovasc. Res.* 31 Spec No, E34–E45, 1996.
- Burger PE, Coetzee S, McKeegan WL, Kan M, Cook P, Fan Y, Suda T, Hebbel RP, Novitzky N, Muller WA, Wilson EL. Fibroblast growth factor receptor-1 is expressed by endothelial progenitor cells. *Blood* 2002;100:3527–3535
- Burns JM, Summers BC, Wang, Y, et al. A novel chemokine receptor for SDF-1 and ITAC involved in cell survival, cell adhesion and tumor development. *J Exp Med.* 2006 203: 2201–13.
- Carmeliet, P.: Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* 6, 389–395, 2000.
- Carroll, C. C. et al. Influence of acetaminophen and ibuprofen on in vivo patellar tendon adaptations to knee extensor resistance exercise in older adults. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. 1985) 111, 508–15 (2011).
- Case, J. et al. Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. *Exp. Hematol.* 35, 1109–18 (2007).

- Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 2004; 10: 858–64. 21
- Chang J, Li Y, Huang Y, Lam KSL, Hoo RLC, Wong WT, Cheng KKY, Wang Y, Vanhoutte PM, Xu A: Adiponectin prevents diabetic premature senescence of endothelial progenitor cells and promotes endothelial repair by suppressing the p38MAP Kinase/p16INK4A signaling pathway. *Diabetes* 2010, 59:2949-2959.
- Chavakis E, Aicher A, Heeschen C, Sasaki K, Kaiser R, El Makhfi N, Urbich C, Peters T, Scharffetter-Kochanek K, Zeiher AM, Chavakis T, Dimmeler S. Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. *J Exp Med* 201: 63–72 (2005)
- Chen L, Wu F, Xia WH, Zhang YY, Xu SY, Cheng F, Liu X, Zhang XY, Wang SM, Tao J. CXCR4 gene transfer contributes to in vivo reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells. *Cardiovasc. Res.* 88, 462–470 (2010)
- Croce G, Passacuale G, Necozone S, Ferri C, Desideri G. Nonpharmacological treatment of hypercholesterolemia increases circulating endothelial progenitor cell population in adults. *Arter Thromb Vasc Biol* 2006; 26: e38–e39
- Daniel JG, Andrew M, Gerry OD, Roger T. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *J Physiol* 2004; 561: 1–25.
- Dar A, Kollet O, Lapidot T. Mutual, reciprocal SDF-1/CXCR4 interactions between hematopoietic and bone marrow stromal cells regulate human stem cell migration and development in NOD/SCID chimeric mice. *Exp Hematol* 2006; 34: 967–75.
- De Palma M, Venneri MA, Roca C, Naldini L Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *Nat Med* 9: 789–795 (2003).
- Demello, D. E., D. Sawyer, N. Galvin, and L. M. Reid: Early fetal development of lung vasculature. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 16, 568–581, 1997.
- Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest* 2001; 108: 391–7.
- Dome B, Timar J, Dobos J, Meszaros L, Raso E, Paku S, Kenessey I, Ostoros G, Magyar M, Ladanyi A, Bogos K, Tovari J. Identification and clinical significance of circulating endothelial progenitor cells in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2006;66:7341–7347
- Drake, C. J.: Embryonic and adult vasculogenesis. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 69, 73–82, 2003.
- Dubois, R. N. et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 12, 1063–73 (1998).
- Eguchi, M., H. Masuda, and T. Asahara: Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Clin. Exp. Nephrol.* 11, 18–25, 2007.
- Evans, W. J. Skeletal Muscle PGF 2 and PGE 2 in Response to and Acetaminophen. 86, 5067–5070 (2014).
- Feigl W, Susani M, Ulrich W, Matejka M, Losert U, Sinzinger H. Organization of experimental thrombosis by blood cells. *Virchows Arch A* 1985;406:133–48.

- Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 1996;380:439–442.
- Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*. 1995;376:66–70.
- Fujiyama S, Amano K, Uehira K, Yoshida M, Nishiwaki Y, Nozawa Y, Jin D, Takai S, Miyazaki M, Egashira K, Imada T, Iwasaka T, Matsubara H. Bone marrow monocyte lineage cells adhere to injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells. *Circ Res* 93: 980–989 (2003)
- Fujiyama S, Amano K, Uehira K, Yoshida M, Nishiwaki Y, Nozawa Y, Jin D, Takai S, Miyazaki M, Egashira K, Imada T, Iwasaka T, Matsubara H. Bone marrow monocyte lineage cells adhere to injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells. *Circ Res*. 2003;93:980–989.
- Garmy-Susini, B. & Varner, J. a. Circulating endothelial progenitor cells. *Br. J. Cancer* 93, 855–8 (2005).
- Garmy-Susini, B. & Varner, J. a. Circulating endothelial progenitor cells. *Br. J. Cancer* 93, 855–8 (2005).
- Gebb, S. A., and J. M. Shannon: Tissue interactions mediate early events in pulmonary vasculogenesis. *Dev. Dyn.* 217, 159–169, 2000.
- Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, et al. In vitro differentiation of endothelial cells from AC 133 positive progenitor cells. *Blood* 2000;95:3106–12.
- Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, Girardi L, Yurt R, Himel H, Rafii S. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)/AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res* 88: 167–174 (2001)
- Grant, M. B., W. S. May, S. Caballero, G. A. Brown, S. M. Guthrie, R. N. Mames, B. J. Byrne, T. Vaught, P. E. Spoerri, A. B. Peck, and E. W. Scott: Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat. Med.* 8, 607–612 (2002).
- Grzeszkiewicz TM, Lindner V, Chen NY, Lan S, Lau LF. The angiogenic factor cysteine-rich 61 (CYR61, CCN1) supports vascular smooth muscle cell adhesion and stimulates chemotaxis through integrin α 6 β 1 and cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Endocrinology* 143:1441–1450 (2002)
- Gulati R, Jevremovic D, Peterson TE, Chatterjee S, Shah V, Vile RG, Simari RD. Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood. *Circ Res* 93: 1023–1025 (2003)
- Guo Y, Chan R, Ramsey H, Li W, Xie X, Shelley WC, Martinez-Barbera JP, Bort B, Zaret K, Yoder M, Hromas R. The homeoprotein Hex is required for hemangioblast differentiation. *Blood*. 2003;102: 2428–2435.
- Hattori K, Heissig B, Tashiro K, Honjo T, Tateno M, Shieh JH, Hackett NR, Quitoriano MS, Crystal RG, Rafii S, Moore MA. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 2001; 97: 3354–60
- Hattori, K., S. Dias, B. Heissig, N. R. Hackett, D. Lyden, M. Tateno, D. J. Hicklin, Z. Zhu, L. Witte, R. G. Crystal, M. A. Moore, and S. Rafii: Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 193, 1005–1014 (2001).

- He, J. et al. The expression of functional Toll-like receptor 4 is associated with proliferation and maintenance of stem cell phenotype in endothelial progenitor cells (EPCs). *J. Cell. Biochem.* 111, 179–86 (2010).
- Heeschen, C., Aicher, R., Lehmann, S., Fichtlscherer, M., Vasa, C., Urbich, C., Mildner-Rihm, H., Martin, A. M., Zeiher, and S. Dimmeler: Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 102, 1340–1346 (2003).
- Hildbrand P, Cirulli V, Prinsen RC, Smith KA, Torbett BE, Salomon DR, Crisa L. The role of angiopoietins in the development of endothelial cells from cord blood CD34+ progenitors. *Blood* 104: 2010–2019 (2004)
- Hoetzer GL, Van Guilder Gary GP, Irmiger HM, Keith RS: Aging, exercise, and endothelial progenitor cell clonogenic and migratory capacity in men. *J Appl Physiol* 2007, 102:847-852.
- Hristov M, Zerneck A, Bidzhekov K, Liehn EA, Shagdarsuren E, Ludwig A, Weber C. Importance of CXC chemokine receptor 2 in the homing of human peripheral blood endothelial progenitor cells to sites of arterial injury. *Circ. Res.* 100, 590–597 (2007a)
- Hristov, M., Erl, W., Weber, P.C.: Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 23(7), 1185–1189 (2003)
- Hueper WC, Russell MA. Capillary-like formations in tissue cultures of leukocytes. *Arch Exp Zellforsch* 1932;12:407–24.
- Hur J, Yoon CH, Kim HS, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24:288–93 27 (2004).
- Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 103(9):1231– 1236 . 1999
- Iwami, Y., Masuda, H. & Asahara, T. Endothelial progenitor cells: past, state of the art, and future. *J. Cell. Mol. Med.* 8, 488–97 (2004).
- Kaßmeyer, S., and J. Plendl: Monitoring der Gefäßarchitektur in vitro versus in vivo. *Kleintierpraxis* 52, 639–645, 2007.
- Kalka C, Tehrani H, Laudenberg B, et al. VEGF gene transfer mobilizes endothelial progenitor cells in patients with inoperable coronary disease. *Ann. Thorac. Surg.* 70:829–34 2000.
- Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 2001;103:634-637.
- Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001; 7: 430–6.
- Kollett O, Shivtiel S, Chen YQ. HGF, SDF1 and MMP are involved in stress induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest* 2003; 112: 160–9.
- Kurz, H., and B. Christ: *Vascular Development of the Brain and Spinal Cord*. Boston: Birkhäuser, 2001.
- Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood*; 106: 1901–10 (2005).
- Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Haematol* 2002; 30: 973–81.

- Laufs U, Urhausen A, Werner N, Scharhag J, Heitz A, Kissner G et al. Running exercise of different duration and intensity: effect on endothelial progenitor cells in healthy subjects. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2005; 12: 407–414.
- Laufs, U. et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* 109, 220–6 (2004).
- Lee, S. H., P. L. Wolf, R. Escudero, R. Deutsch, S. W. Jamieson, and P. A. Thistlethwaite: Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N. Engl. J. Med.* 342, 626–633 (2000).
- Lenz D, Lenk K, Mittag A, Adams V, Krankel N, Boldt A, Gerstner AO, Raida M, Weiss T, Hambrecht R, Tarnok A. Detection and quantification of endothelial pro- genitor cells by flow and laser scanning cytometry. *J Biol Regul Homeost Agents* 2005;19:180–187.
- Leu HJ, Feigl W, Susani M. Angiogenesis from mononuclear cells in thrombi. *Virchows Arch A* 1987;411:5–14.
- Liu, C. et al. Implantation of endothelial progenitor cells into laser-induced channels in rat ischemia hindlimb augments neovascularization. *Ann. Vasc. Surg.* 19, 241–7 (2005).
- Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Wu Y, Hicklin D, Zhu Z, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Hajjar KA, Manova K, Benezra R, Rafii S. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hemato- poietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 7: 1194–1201(2001)
- Massa M, Rosti V, Ferrario M, Campanelli R, Ramajoli I, Rosso R, De Ferrari GM, FerliniM, Goffredo L, Bertolotti A, Klersy C, Pecci A, Moratti R, Tavazzi L. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood* 2005;105:199–206. 191
- Mikkelsen, U. R., Langberg, H., Helmark, I. C., Skovgaard, D., Andersen, L. L., Kjaer, M., & Mackey, a L. Local NSAID infusion inhibits satellite cell proliferation in human skeletal muscle after eccentric exercise. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md.□: 1985), 107(5), 1600–11. doi:10.1152/jappphysiol.00707.2009
- Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, et al. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization and molec- ular cloning. *Blood* 1997;90:5013–21.
- Mutin M, Canavy I, Blann A, Bory M, Sampol J, Dignat-George F. Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unsta- ble angina by demonstration of circulating endothelial cells. *Blood* 1999;93:2951
- Palombo et al.: Circulating endothelial progenitor cells and large artery structure and function in young subjects with uncomplicated Type 1 Diabetes. *Cardiovascular Diabetology* 2011 10:88
- Parker RC. The development of organized vessels in cultures of blood cells. *Science* 1933;77:544–6.
- Patan, S.∴ Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J. Neuroon- col.* 50, 1–15, 2000.
- Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000;95:952–8.
- Peterson, J. M. et al. Ibuprofen and acetaminophen: effect on muscle inflammation after eccentric exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 35, 892–6 (2003)..

- Pillarisetti K, Gupta SK.. Cloning and relative expression analysis of rat stromal cell derived factor-1 (SDF-1)1: SDF-1 alpha mRNA is selectively induced in rat model of myocardial infarction. *Inflammation* 25:293–300 (2001).
- Pillarisetti, K., and S. K. Gupta: Cloning and relative expression analysis of rat stromal cell derived factor-1 (SDF-1)1: SDF-1 alpha mRNA is selectively induced in rat model of myocardial infarction. *Inflammation* 25, 293–300 (2001).
- Ponomaryov T, Peled A, Petit I, Taichman RS, Habler L, Sandbank J, Arenzana-Seisdedos F, Magerus A, Caruz A, Fujii N, Nagler A, Lahav M, Szyper-Kravitz M, Zipori D, Lapidot T. Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *J Clin Invest* 2000; 106: 1331–9. 14
- Rafii S, Lyden D, Benezra R, Hattori K, Heissig B. Vascular and haematopoietic stem cells: Novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat Rev Cancer* 2002;2:826–835.
- Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Kucia M, et al. The pleiotropic effects of the SDF-1 CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia* . 2006; 20: 1915–24.
- Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood ‘endothelial progenitor cells’ are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 107: 1164–1169 (2003)
- Ribatti, D.: The discovery of endothelial progenitor cells. An historical review. *Leuk. Res.* 31, 439–444, 2007.
- Ricciotti, E. & FitzGerald, G. a. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 986–1000 (2011).
- Robert, B., P. L. St John, and D. R. Abrahamson: Direct visualization of renal vascular morphogenesis in Flk1 heterozygous mutant mice. *Am. J. Physiol.* 275, F164–F172, 1998.
- Roels B. Paradoxical effects of endurance training and chronic hypoxia on myofibrillar ATPase activity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294:1911-1918. 2008
- Romagnani P, Annunziato F, Liotta F, et al. CD14+CD34 low cells with stem cell phenotypic and functional features are the major source of circulating endothelial progenitors. *Circ Res* 2005;97:314–22.
- Sabine S, Alexander N, Sophie Z, Bernhard R, Daniela S, Johannes P et al. Endurance training increases the number of endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk and coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2005; 181: 305–310.
- Sainz J, Sata M. CXCR4, a key modulator of vascular progenitor cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 263–265. (2007)
- Sandri MB, Adams V, Gielen S, Linke A, Lenk K, Krahnkel N et al. Effects of exercise and ischemia on mobilization and functional activation of blood-derived progenitor cells in patients with ischemic syndromes: results of 3 randomized studies. *Circulation* 2005; 111: 3391–3399.
- Schatteman GC, Hanlon HD, Jiao C, Dodds SG, Christy BA. Blood-derived angioblasts accelerate blood-flow restoration in diabetic mice. *J Clin Invest* 2000; 106: 571–8.
- Schatteman, G. C., and O. Awad: Hemangioblasts, angioblasts, and adult endothelial cell progenitors. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* 276, 13–21, 2004.

- Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kamper U, Dimmeler S, Zeiher AM. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation* 111, 2981–2987 (2005).
- Scott LM, Priestley GV, Papayannopoulou T. Deletion of alpha4 integrins from adult hematopoietic cells reveals roles in homeostasis, regeneration, and homing. *Mol Cell Biol.* 2003;23:9349–9360.
- Segal MS, Bihorac A, Koc M. Circulating endothelial cells: tea leaves for renal disease. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 283:F11–19 19 (2002).
- Shaked Y, Bertolini F, Man S, Rogers MS, Cervi D, Foutz T, Rawn K, Voskas D, Dumont DJ, Ben-David Y, Lawler J, Henkin J, Huber J, Hicklin DJ, D’Amato RJ, Kerbel RS. Genetic heterogeneity of the vasculogenic phenotype parallels angiogenesis; Implications for cellular surrogate marker analysis of antiangiogenesis. *Cancer Cell* 7: 101–111(2005)
- Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature.* 1995;376:62–66
- Shea, K. L., Xiang, W., LaPorta, V. S., et al. Sprouty1 regulates reversible quiescence of a self-renewing adult muscle stem cell pool during regeneration. *Cell Stem Cell*, 6(2), 117–129 (2010).
- Siddique, A., Shantsila, E., Lip, G. Y. H. & Varma, C. Endothelial progenitor cells: what use for the cardiologist? *J. Angiogenes. Res.* 2, 6 (2010).
- Sierro F, Biben C, Martinez-Munoz L, et al. Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104: 14759–64.
- Smadja, D. M., Cornet, a, Emmerich, J., Aiach, M. & Gaussem, P. Endothelial progenitor cells: characterization, in vitro expansion, and prospects for autologous cell therapy. *Cell Biol. Toxicol.* 23, 223–39 (2007).
- Soligo D, Schiro R, Luksch R, Manara G, Quirici N, Parravicini C, Lambertenghi Delilieri G. Expression of integrins in human bone marrow. *Br J Haematol.* 1990;76:323–332.
- Steinmetz M, Nickenig G, Werner N: Endothelial-regenerating cells: an expanding universe. *Hypertension* 2010, 55:593-599
- Takahashi, T., C. Kalka, H. Masuda, D. Chen, M. Silver, M. Kearney, M. Magner, J. M. Isner, and T. Asahara: Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat. Med.* 5, 434–438 (1999).
- Tilling, L., Chowienzyk, P. & Clapp, B. Progenitors in motion: mechanisms of mobilization of endothelial progenitor cells. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 68, 484–92 (2009).
- Tsvitse, S. Notch and Wnt signaling, physiological stimuli and postnatal myogenesis. *Int. J. Biol. Sci.* 6, 268–81 (2010).
- Ulrich L, Nikos W, Andreas L, Matthias E, Wassmann KJ, Eckart M et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* 2004; 109: 220–226
- Urbich C, Heeschen C, Aicher A, et al. Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation* 108:2511–16. 2003

- Urbich C, Heeschen C, Aicher A, et al. Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation* 108:2511–16 30 (2003).
- Urbich C, Heeschen C, Aicher A, Sasaki K, Bruhl T, Farhadi MR, Vajkoczy P, Hofmann WK, Peters C, Pennacchio LA, Abolmaali ND, Chavakis E, Reinheckel T, Zeiher AM, Dimmeler S. Cathepsin L is required for endothelial progenitor cell-induced neovascularization. *Nat Med* 11: 206–213 (2005)
- Urbich, C., Dimmeler, S.: Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ. Res.* 95, 343–353 (2004)
- Vajkoczy P, Blum S, Lamparter M, Mailhammer R, Erber R, Engelhardt B, Vestweber D, Hatzopoulos AK. Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis. *J Exp Med.* 2003;197:1755–1765.
- Volker A, Karsten L, Axel L, Dominik L, Sandra E, Markus S et al. Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia. *Arter Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 670–684.
- Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, Nishimura H, Losordo DW, Asahara T, Isner JM. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation.* 2002;105:3017–3024.
- Weinheimer, E. M. et al. Resistance exercise and cyclooxygenase (COX) expression in human skeletal muscle: implications for COX-inhibiting drugs and protein synthesis. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 292, R2241–8 (2007).
- White GC, Parshley MS. Growth in vitro blood vessels from bone marrow of adult chickens. *Am J Anat* 1950;89:321–45.
- Widmaier EP, Raff H, Strang KT. *Vander's Human Physiology - The mechanisms of body function.* 12ed, McGraw-Hill, 2011
- Xia, W.-H. et al. Physical exercise attenuates age-associated reduction in endothelium-reparative capacity of endothelial progenitor cells by increasing CXCR4/JAK-2 signaling in healthy men. *Aging Cell* 11, 111–9 (2012).
- Yang L, D Busk LM, Fukada K, Fingleton B, Green-Jarvis B, Shyr Y, Matrisian LM, Carbone DP, Lin PC. Expansion of myeloid immune suppressor Gr+CD11b+ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 6: 409–421(2004)
- Yang Z, Tao J, Wang JM, Tu C, Xu MG, Wang Y et al. Shear stress contributes to t-PA mRNA expression in human endothelial progenitor cells and nonthrombogenic potential of small diameter artificial vessels. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 342: 577–584
- Yang, L. et al. Depression is associated with lower circulating endothelial progenitor cells and increased inflammatory markers. *Acta Neuropsychiatr.* 23, 235–240 (2011).
- Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997;90:5002–12.
- Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, Krasich R, Temm CJ, Prchal JT, Ingram DA: Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* 2007, 109:1801-9

Zippo A, De Robertis A, Bardelli M, Galvagni F, Oliviero S. Identification of Flk-1-target genes in vasculogenesis: Pim-1 is required for endothelial and mural cell differentiation in vitro. *Blood*. 2004;24:24.