1. INTRODUÇÃO

A descoberta das células progenitoras endoteliais (CPE) derivadas da medula óssea no sangue periférico, publicada pela revista *Science* em 1997, mudou o conceito dos mecanismos reparatórios voltados para o dano vascular e fortaleceu a possibilidade de que elas podem ser uma ferramenta poderosa na terapia vascular (ASAHARA, MUROHARA, SULLIVAN, SILVER, van der ZEE, LI, WITZENBICHLER, SCHATTEMAN & ISNER, 1997; MILLER-KASPRZAK, & JAGODZINSKI, 2007).

As CPE, originárias do hemangioblasto, são células tronco caracterizadas por ter a capacidade de se diferenciar em uma célula endotelial madura dando origem a novos vasos. Sabe-se ainda que elas são identificadas por específicos marcadores superficiais de membrana, tais como, o CD34+, CD133+ e o VEGFR2+ (EGUCHI, MASUDA & ASAHARA, 2007); e que o número e a capacidade funcional das CPE são reguladas, não somente por vários fatores de crescimento angiogênicos e citocinas em resposta ao dano vascular e a fatores de risco cardiovascular, mas também a modificações no estilo de vida, como a prática de exercício físico aeróbio (UMEMURA & HIGASHI, 2008).

Estudos observacionais evidenciam que as CPE derivadas da medula óssea circulam no sangue periférico (TAYLOR, ATKINS, HUNGSPREUGS, JONES, REEDY, HUTCHESON, GLOWER & KRAUS, 1998) migram e se incorporam para exercer uma de suas principais funções, a neovascularização (ASAHARA, MASUDA, TAKAHASHI, KALKA, PASTORE, SILVER, KEARNEY, MAGNER & ISNER, 1999). Mais recentemente, outros estudos mostraram que elas aumentam de número em resposta a isquemia tecidual (KOCHER, SCHUSTER, SZABOLCS, TAKUMA, BURKOFF, WANG, HOMMA, EDWARDS & ITESCU, 2001) e participam do desenvolvimento de vasos colaterais após expansão *ex vivo* e transplante de órgãos (KALKA, MASUDA, TAKAHASHI, KALKA-MOLL, SILVER, KEARNEY, LI, ISNER, ASAHARA, 2000; MUROHARA, IKEDA, DUAN, SHINTANI, SASAKI, EGUCHI, ONITSUKA, MATSUI & IMAIZUMI, 2001), o que contribuiu sobremaneira para quebrar o paradigma de que a neovascularização em adultos não está restrita a angiogênese, envolvendo também o mecanismo de vasculogênese no período pós-natal. Embora exista um expressivo número de estudos demonstrando que as CPE

derivadas da medula óssea na circulação contribuem para a angiogênese, neovascularização e reendotelização, há estudos que sugerem nenhuma evidência do uso de CPE na correção da disfunção endotelial em modelos animais de doenças vasculares (PERRY, SONG, DESPRES, KIM, SAN, YU, RAGHAVACHARI, SCHNERMANN, CANNON & ORLIC, 2009).

Na busca de novos conhecimentos envolvendo as CPE, alguns investigadores verificaram que fatores de risco para doenças cardiovasculares (DCV), como, diabetes, hiperlipidemia, fumo e hipertensão arterial (HA) afetam consideravelmente o número e a atividade funcional dessas células, tanto em indivíduos saudáveis quanto em pacientes com doença da artéria coronária, reportando uma correlação inversa entre o número de CPE e a quantidade de fatores de risco. (HILL, ZALOS, HALCOX, SCHENKE, WACLAWIW, QUYYUMI & FINKEL, 2003). Além disso, outros estudos sugerem que, entre os fatores de risco, a HA aparece como a principal causa da diminuição da capacidade migratória das CPE para circulação, provavelmente repercutindo no desenvolvimento da rarefação vascular (VASA, FICHTLSCHERER, AICHER, ADLER, URBICH, MARTIN, ZEIHER & DIMMELER, 2001). De fato, estes autores foram os primeiros a demonstrar que a função das CPE estava reduzida na circulação de pacientes com HA. Posteriormente, o grupo do Imanishi (IMANISHI, KOBAYASHI, HANO & NISHIO, 2005a; IMANISHI, MORIWAKI, HANO & NISHIO, 2005b) descreveram que a HA reduz os níveis de CPE na medula óssea e provoca um acelerado processo de envelhecimento celular. Recentemente, Werner e colaboradores (WERNER, KOSIOL, SCHIEGL, AHLERS, WALENTA, LINK, BOHM & NICKENIG, 2005) demonstraram que a redução do número de CPE é um preditor independente de morbidade e mortalidade de doenças cardiovasculares. Estes achados sugerem que a regulação do número e função das CPE influenciam diretamente na manutenção e no desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Por outro lado, evidências acumuladas mostram que o treinamento físico aeróbio (TF) reduz os níveis de pressão arterial (PA) e melhora a função endotelial e a rarefação capilar na HA (AMARAL, ZORN & MICHELINI, 2000; HAGBERG, PARK & BROWN, 2000; AMARAL, SILVEIRA, ZORN & MICHELINI, 2001; WHELTON, CHIN, XIN & HE, 2002; PESCATELLO, FRANKLIN, FAGARD, FARQUHAR, KELLEY

& RAY, 2004; FAGARD, 2005). Apesar desse importante papel do exercício na prevenção e no tratamento da HA, os mecanismos envolvidos nas mudanças vasculares provocadas por essa conduta não medicamentosa, especialmente na HA, não são totalmente compreendidos. Uma possibilidade atraente é o aumento na produção e função das CPE.

Investigações recentes mostram que o TF aumenta a liberação e melhora a função das CPE derivadas da medula óssea promovendo angiogênese (LAUFS, WERNER, LINK, ENDRES, WASSMANN, JURGENS, MICHE, BOHM & NICKENIG, 2004; ADAMS, LENK, LINKE, LENZ, ERBS, SANDRI, TARNOK, GIELEN, EMMRICH, SCHULER & HAMBRECHT, 2004; WAHL, BLOCK & SHMIDT, 2007; YANG, WANG, CHEN, LUO, TANG & TAO, 2007; WITKOWSHI & HAGBERG, 2007; SHAFFER, GREENE, ARSHI, SUPPLE, BANTLY, MOORE, PARMACEK & MOHLER, 2007; HOETZER, VAN GUILDER, IRMIGER, KEITH, STAUFFER & DE SOUZA, 2007), o que sugere que o TF pode recuperar a homeostase vascular por meio das CPE. Portanto, a proposta para essa investigação foi verificar: 1) o possível prejuízo no número e função das CPE associados ao dano vascular na HA em modelo de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), e 2) o efeito do TF sobre a rarefação vascular associada à HA, particularmente sobre os níveis e as propriedades funcionais das CPE em SHR.

2. JUSTIFICATIVA

A HA representa um fator de risco independente e contínuo para DCV, afetando em média 32,5% da população brasileira adulta (VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2010). Em nosso país, as DCV têm sido a principal causa de morte. Em 2007 ocorreram 308.466 óbitos por doenças do aparelho circulatório (FIGURA 1). Segundo os dados do Ministério da Saúde, em 2009 ocorreram 91.970 internações por DCV, com custo global de R$165.461.644,33. Além da alta prevalência, seu aparecimento está cada vez mais precoce e estima-se que cerca de 4% das crianças e adolescentes sejam portadoras de HA.

A carga de doenças representada pela morbi-mortalidade devido à HA é muito alta e por isso é considerada um grave problema de saúde pública, responsável por um grande ônus para os órgãos de saúde para tratamentos e prevenção. Considerando os fatos, o estudo se justifica devido à investigação com uso do TF ser não somente fundamental na prevenção primária da HA e redução dos gastos públicos, mas, como uma intervenção não farmacológica, diminuindo a incidência de diagnósticos relacionados à patologia e melhorando o prognóstico para os próximos eventos cardiovasculares.

Além disso, justifica-se o estudo pelo fato de que o entendimento dos mecanismos reparatórios induzidos pelo TF sobre as CPE em SHR poderá elucidar grandes eventos do quadro patológico associados à HA, desta forma contribuindo para o tratamento do dano vascular.

Dados prévios do nosso laboratório corroboram com os da literatura na tentativa de explicar os efeitos isolados do TF nas CPE como uma das responsáveis pela melhora na condição física alcançada. Entretanto, entendemos que o próximo passo seria relacioná-lo de forma direta no tratamento da HA, haja visto que, embora de suma importância, nada se tem publicado a respeito desse preâmbulo contendo CPE, HA e TF.

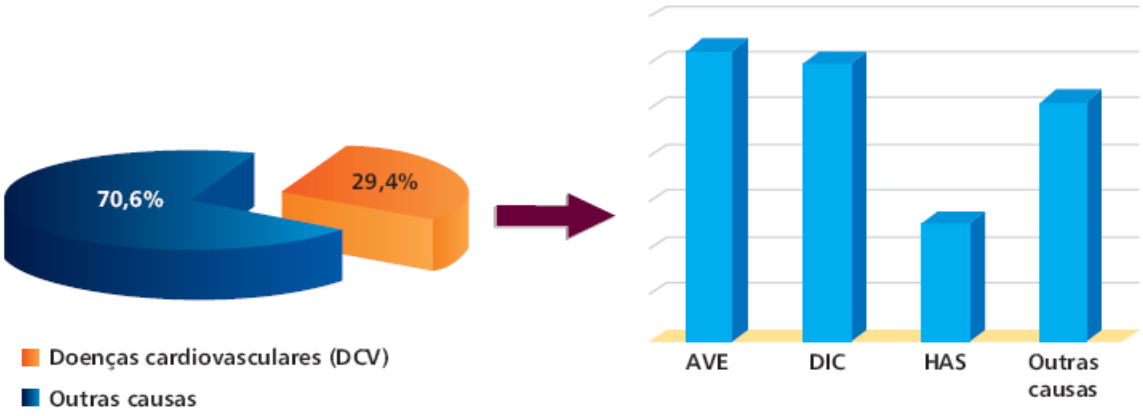


FIGURA 1 – Taxas de mortalidade por DCV e suas diferentes causas no Brasil em 2007. AVE: Acidente Vascular Encefálico; DIC: Doença Isquêmica do Coração; HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica (VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Estudar o efeito do TF sobre as CPE derivadas da medula óssea e investigar qual a participação dessas células na revascularização decorrentes do treinamento em modelo de SHR.

3.2 Específicos

Avaliar o efeito do TF em ratos WKY e SHR sobre:

- a evolução da massa corporal;
- o comportamento da pressão arterial no repouso;
- o comportamento da freqüência cardíaca no repouso,
- a capacidade de tolerância ao esforço físico;
- o consumo de oxigênio;
- a capacidade oxidativa muscular esquelética;
- o número de CPE da medula óssea e do sangue periférico;
- a capacidade funcional das CPE da medula óssea e do sangue periférico;
- a senescência das CPE da medula óssea;
- a revascularização muscular esquelética;
- a área de secção transversa muscular esquelética;
- a distribuição dos tipos de fibra muscular esquelética;
- os fatores mobilizadores de CPE circulante;
- a expressão protéica de fatores angiogênicos e mobilizadores de CPE no músculo esquelético;
- a expressão protéica de indutores e repressores da apoptose no músculo esquelético.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Hipertensão Arterial

A HA é uma síndrome multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de PA que afeta aproximadamente um bilhão de indivíduos em todo mundo, sendo considerada, portanto, um importante problema de saúde pública, representando um dos fatores de risco mais relevantes na etiologia das doenças cardiovasculares, tais como, doença cerebrovascular, doença arterial coronariana, insuficiência renal e cardíaca (VASAN, LARSON, LEIP, EVANS, O DONNELL, KANNEL & LEVY, 2001; CHOBANIAN, BAKRIS, BLACK, CUSHMAN, GREEN, IZZO, JONES, MATERSON, OPARIL, WRIGHT & ROCCELLA, 2003; SAFAR, 2005; PEREIRA, LUNET, AZEVEDO & BARROS, 2009).

No Brasil, de acordo com os dados epidemiológicos, as doenças cardiovasculares constituem importante causa de mortalidade, sendo que a HA atinge acima de 30% da população urbana adulta (com mais de 18 anos), chegando a 65% nos indivíduos mais idosos. Os valores de PA que permitem classificar como hipertensos os indivíduos acima de 18 anos são pressão sistólica ≥140 mm Hg e/ou pressão diastólica ≥ 90 mm Hg (VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2010). Na TABELA 1 apresenta-se a classificação diagnóstica da HA. Tanto o grupo limítrofe como o hipertenso estágio 1 são os mais prevalentes na população como um todo e os que mais podem se beneficiar com medidas preventivas (BRUM, RONDON, DA SILVA & KRIEGER, 2006).

TABELA 1 – Classificação diagnóstica da PA (indivíduos adultos ≥ 18 anos) (VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2010).

Classificação	Pressão sistólica (mmHg)	Pressão diastólica (mmHg)
Ótima	< 120	< 80
Normal	< 130	< 85
Limítrofe*	130–139	85–89
Hipertensão estágio 1	140–159	90–99
Hipertensão estágio 2	160–179	100–109
Hipertensão estágio 3	≥ 180	≥ 110
Hipertensão sistólica isolada	≥ 140	< 90
Quando as pressões sistólica e diastólica situam-se em categorias diferentes, a maior deve ser utilizada para classificação da pressão arterial.		

** Pressão normal-alta ou pré-hipertensão são termos que se equivalem na literatura.*

A HA pode ser classificada em primária ou essencial e secundária. Os 95% dos casos de HA é classificada como essencial e consiste em uma alteração multifatorial condicionada por fatores genéticos e ambientais. Quando os níveis de PA estão associados a outras situações patológicas como a insuficiência renal, hipertensão gestacional, doenças endócrinas, entre outras, se denomina de hipertensão secundária (SEVER & POULTER, 1989). Dessa forma, a HA, como a maioria das doenças crônicas cuja incidência aumenta com a idade, envolve tanto componentes etiológicos ambientais como hereditários, sendo, portanto, classificada como uma doença poligênica e multifatorial, estando relacionada a mudanças morfológicas e funcionais no sistema cardiovascular e no controle autonômico em humanos e animais (TIPTON, 1991; IRIGOYEN, LACCHINI, DE ANGELIS & MICCHELINI, 2003).

A PA é o produto do débito cardíaco e da resistência periférica total. Em condições normais, a PA deve ser mantida em uma estreita faixa de variação, permitindo uma adequada perfusão tecidual. Este controle envolve grande número de substâncias e de sistemas fisiológicos que interagem de maneira complexa para manter a PA em níveis adequados, nas mais diversas situações fisiológicas. Dessa forma, o controle da PA envolve mecanismos neurais, humorais e renais que, em curtos e longos prazos, modulam não só a atividade do sistema nervoso autônomo para o coração e para os vasos, como também o volume sangüíneo e a secreção de vários hormônios (KRIEGER & MICHELINI, 1992; IRIGOYEN, LACCHINI, DE ANGELIS & MICCHELINI, 2003).

A HA essencial em adultos pode ser explicada fundamentalmente por uma elevada resistência vascular periférica ao fluxo sangüíneo sem alterações no débito cardíaco (LÉVY, AMBROSIO, PRIES & STRUIJKER-BOUDIER, 2001; FEIHL, LIAUDET, WAEBER & LÉVY, 2006; DIAS DA SILVA, MACHADO & VOLTARELLI, 2009). A microcirculação composta por arteríolas e capilares, primariamente localizadas na parte distal da vasculatura arterial, constitui o maior local de origem da resistência vascular (CHRISTENSEN & MULVANY, 2001; LÉVY, 2005) e a fundamental causa de aumento desta resistência é devido à diminuição no diâmetro da luz do vaso bem como a perda dos mesmos. De acordo com a Lei de Poiseuille (Lei de Poiseuille – $R= 8\eta L/\pi r^4$, nos quais η = viscosidade; L = comprimento; r = raio),

a resistência varia inversamente à quarta potência do raio do vaso sangüíneo, isto significa dizer que uma pequena diminuição na luz do vaso aumenta marcadamente a resistência (SUTERA & SKALAK, 1993). Além disso, uma redução no número de vasos arteriolar e capilar dispostos em paralelo contribui consideravelmente para o aumento da resistência periférica total (LÉVY, AMBROSIO, PRIES & STRUIJKER-BOUDIER, 2001; FEIHL, LIAUDET, WAEBER & LÉVY, 2006; DIAS DA SILVA, MACHADO & VOLTARELLI, 2009).

Admite-se, portanto, que alterações da PA, como as encontradas na HA, resultam no desajuste dos mecanismos de controle da macro e microcirculação. Assim, a HA aparece amplamente associada com um desequilíbrio do tônus vasomotor, participando ativamente no aumento da vasoconstrição, repercutindo num aumento da resistência vascular periférica, culminando com a oclusão arteriolar e capilar na microcirculação (LÉVY, AMBROSIO, PRIES & STRUIJKER-BOUDIER, 2001; FEIHL, LIAUDET, WAEBER & LEVY, 2006).

Na última década, muitas pesquisas foram voltadas para a fisiopatologia da microcirculação no campo da hipertensão. A literatura mostra que a HA altera o funcionamento normal na microcirculação arteriolar e capilar, aumentando a resistência vascular periférica e diminuindo o número de vasos por unidade de volume tecidual. Este fenômeno é chamado de rarefação microvascular e foi primeiramente notificado por RUEDEMANN (1933) que pacientes hipertensos tinham um reduzido número de pequenos vasos, sendo posteriormente replicados os dados com outro grupo de pesquisadores com um equipamento de visualização mais sofisticado (SULLIVAN, PREWITT & JOSEPHS, 1983). HUTCHINS, BOND & GREEN (1974) foram os primeiros a descreveram a rarefação microvascular em modelo animal, onde eles reportaram 50% de rarefação no músculo cremaster de SHR. Desde então, tem sido confirmado por diferentes autores, tanto em humanos quanto em modelos animais de experimentação para hipertensão (GREENE, TONELLATO, LUI, LOMBARD & COWLEY, 1989; ANTONIOS, SINGER, MARKANDU, 1999; AMARAL, ZORN & MICHELINI, 2000; LÉVY, AMBROSIO, PRIES & STRUIJKER-BOUDIER, 2001; AMARAL, SILVEIRA, ZORN & MICHELINI, 2001; MELO, JR MARTINHO & MICHELINI, 2003; FEIHL, LIAUDET, WAEBER & LEVY, 2006).

Evidências experimentais sugerem que a rarefação microvascular, manifestada com um aumento na distância intercapilar, é responsável por uma perfusão tecidual não uniforme, o que remete para áreas pouco oxigenadas, podendo restringir a atividade metabólica local (AMBROSIO, CARLUCCIO & BENTIVOGLIO, 2003). Recentemente, DEBBABI, UZAN, MOURAD, SAFAR & LÉVY (2006) mostraram que o escore de Framingham para risco cardiovascular foi negativamente correlacionado com a densidade capilar em indivíduos hipertensos, demonstrando a implicação de uma adequada estrutura microvascular para manutenção da homeostase corporal.

PREWITT, CHEN & DOWELL (1982) foram os primeiros a fazerem a distinção entre rarefação funcional e estrutural. A funcional seria o resultado de excessiva vasoconstrição causando oclusão parcial do lúmen vascular e impedindo a perfusão do leito capilar. A rarefação estrutural resultaria de uma ausência anatômica de certas arteríolas e capilares, impossibilitando a irrigação tecidual. Isto tem sugerido que as duas formas de rarefação podem atuar em sinergia, a primeira funcional conduzindo para estrutural, possibilitando assim um entendimento melhor desta problemática ocasionada pela HA (GREENE, TONELLATO, LUI, LOMBARD & COWLEY, 1989; STRUIJKER-BOUDIER & AMBROSIO, 2000). Vários fatores e mecanismos têm sido propostos para explicar a rarefação microvascular na HA. Embora não se conheça completamente a causa da rarefação microvascular, ela parece estar associada a uma falha no processo angiogênico (LÉVY, AMBROSIO, PRIES & STRUIJKER-BOUDIER, 2001; FEIHL, LIAUDET, WAEBER & LÉVY, 2006; DIAS DA SILVA, MACHADO & VOLTARELLI, 2009).

4.2 Hipertensão Arterial e Treinamento Físico Aeróbio

Com a intenção de reverter o quadro de HA, tratamentos medicamentosos e não-medicamentosos são utilizados com o objetivo de reaver os valores normais de PA e restaurar a rede microvascular. O exercício físico aeróbio lidera a lista de tratamentos não-medicamentosos possibilitando múltiplos efeitos, principalmente hipotensor, em indivíduos hipertensos (FAGARD, 2005).

A incidência de DCV pode ser reduzida por um estilo de vida ativo. Dados epidemiológicos, clínicos e experimentais confirmam que a prática regular de

exercício físico reduz a progressão das DCV e, portanto a morbidade e mortalidade cardiovascular (HIGASHI & YOSHIZUMI, 2004). Além disso, estudo publicado por MYERS, PRAKASH, FROELICHER, DO, PARTINGTON, ATWOOD (2002) mostraram que indivíduos que apresentam fatores de risco para DCV, incluso histórico de HA, e um nível de capacidade física superior aos indivíduos apenas ativos comprovaram ter um risco ainda menor de morte.

O TF aeróbio conduz a importantes adaptações autonômicas, hemodinâmicas e estruturais que influenciam, sobremaneira, o sistema cardiovascular e muscular esquelético. A bradicardia de repouso (NEGRÃO, MOREIRA, BRUM, DENADAI & KRIEGER, 1992), o aumento do volume sistólico (BRANDÃO, WAJNGARTEN, RONDON, GIORGI, HIRONAKA & NEGRÃO, 1993) e a atenuação da atividade nervosa simpática renal (NEGRÃO, IRIGOYEN, MOREIRA, BRUM, FREIRE & KRIEGER, 1993) e muscular (GRASSI, SERAVALLE, CALHOUN, BOLLA & MANCIA, 1992) estão entre as mais importantes alterações provocadas pelo TF no sistema cardiovascular. Já as adaptações periféricas promovidas pelo TF proporcionam aumento da extração de oxigênio pelo músculo esquelético em atividade, tais como aumento da atividade das enzimas do metabolismo oxidativo (HOLLOSZY & COYLE, 1984; WIBOM, HULTMAN, JOHANSSON, MATHEREI, CONSTANTIN-TEODOSIU & SCHANTZ, 1992), aumento da capilarização muscular (POOLE & MATHIEU-COSTELLO, 1996), aumento da condutância vascular sistêmica (ROWELL, SALTIN, KIENS & CHRISTENSEN, 1986) e aumento do fluxo sanguíneo periférico (FRANCHINI, 1999).

Hoje, há consenso sobre os efeitos benéficos do exercício físico aeróbio nos estágios 1 e 2 da HA (FAGARD, 2005). Muitos ensaios clínicos e metanálises têm demonstrado que o TF provoca redução nos níveis de PA em indivíduos hipertensos (HAGBERG, PARK & BROWN, 2000; WHELTON, CHIN, XIN & HE, 2002; PESCATELLO, FRANKLIN, FAGARD, FARQUHAR, KELLEY & RAY, 2004). Estudos com animais de experimentação também tem mostrado redução significativa na PA de SHR (VERAS-SILVA, MATTOS, GAVA, BRUM, NEGRÃO & KRIEGER, 1997; SILVA, BRUM, NEGRÃO & KRIEGER, 1997; AMARAL, SILVEIRA, ZORN & MICHELINI, 2001; MELO, JR MARTINHO & MICHELINI, 2003). Além disso, o TF

restaura, em grande parte, a bradicardia e taquicardia reflexa em SHR (SILVA, BRUM, NEGRÃO & KRIEGER, 1997).

Outro resultado relevante alcançado pelo TF aeróbio em pacientes hipertensos diz respeito ao uso de tratamento não farmacológico da HA. O TF, na maioria dos pacientes hipertensos, leva à diminuição e, em alguns casos, até a suspensão de medicamentos, reduzindo, portanto, o ônus para os órgãos de saúde pública e os efeitos colaterais decorrentes do tratamento medicamentoso (FAGARD, 2005). No entanto, é importante ressaltar que, nem todo tipo de exercício é efetivo em reduzir a PA em hipertensos.

Um estudo em que melhor avalia a intensidade de TF foi realizado por VERAS-SILVA, MATTOS, GAVA, BRUM, NEGRÃO & KRIEGER (1997), em que demonstraram que a intensidade do TF aeróbio foi fundamental no resultado final alcançado sobre a queda pressórica pós-treinamento em SHR. Isto é, somente o treinamento de baixa intensidade (55% do VO_2 pico) foi efetivo em diminuir a PAS (pressão arterial sistólica) e PAD (pressão arterial diastólica), nesses animais. Ao contrário, o TF em alta intensidade (85% do VO_2 pico) não modificou a hipertensão nesses animais. Resultados semelhantes foram observados em humanos. HAGBERG, MONTAIN, MARTIN & EHSANI (1989) verificaram que em idosos hipertensos, o treinamento de baixa intensidade (50% do VO_2 pico) foi mais eficaz em reduzir a PA de repouso que o treinamento de intensidade moderada (70% do VO_2 pico), apesar dos dois grupos terem apresentado queda significativa da PA.

Embora se conheça que o TF aeróbio promova a redução da PA em hipertensos, os mecanismos envolvidos ainda não estão totalmente esclarecidos.

Um dos mecanismos bastante discutidos para explicar à queda da PA induzida pelo TF está relacionado à atenuação da atividade nervosa simpática periférica (LATERZA, DE MATOS, TROMBETTA, BRAGA, ROVEDA, ALVES, KRIEGER, NEGRÃO & RONDON, 2007). Além disso, uma melhora na sensibilidade do reflexo pressorreceptor também foi associada á diminuição na atividade nervosa simpática (BRUM, SILVA, MOREIRA, IDA, NEGRAO & KRIEGER, 2000).

Ainda no que concerne a redução da PA, diversos estudos apontam importantes efeitos do TF aeróbio sobre a microcirculação em SHR, tais como aumento na densidade capilar e razão capilar: fibra no músculo esquelético e

cardíaco, promovendo uma completa reversão da rarefação capilar ocorrida na hipertensão; além disso, o exercício aeróbio normalizou a resistência vascular periférica para a musculatura esquelética e a razão parede: luz arteriolar (AMARAL, ZORN & MICHELINI, 2000). Estes resultados sugerem que o aumento da densidade capilar é uma adaptação específica da musculatura esquelética em SHR, quando induzido pelo TF aeróbio. O restauro da rede microvascular pode contribuir determinantemente para o efeito da diminuição da PA através da redução da resistência vascular periférica, a qual vem sendo intitulada como a responsável pela HA essencial em adultos (AMARAL, SILVEIRA, ZORN & MICHELINI, 2001; MELO, JR MARTINHO & MICHELINI, 2003; SUZUKI, 2004).

Todos os tecidos do corpo humano demandam oxigênio e nutrientes, que são transportados através do sistema de vasos sanguíneos (RISAU, 1997). Para que este transporte seja adequado, é necessário um sistema vascular altamente desenvolvido. Esta eficiência é mantida por meio da angiogênese. Uma vez que HA promove rarefação arteriolar e capilar, este suporte de oxigênio está prejudicado, o que danifica os tecidos conduzindo a apoptose celular. O exercício físico aeróbio é, portanto, uma importante terapia para os indivíduos hipertensos por aumentar o aporte sanguíneo e restabelecer a rede microvascular (MELO, JR MARTINHO & MICHELINI, 2003; SUZUKI, 2004).

Diversos fatores têm sido apontados como responsáveis pela correção da disfunção endotelial e da defeituosa angiogênese na HA. Entre eles podemos destacar o crucial papel do óxido nítrico (NO) (KUBIS, RICHER, DOMERGUE, GIUDICELLI & LÉVY, 2002) e do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (BYRNE, BOUCHIER-HAYES & HARMEY, 2005), bem como o balanço de estimuladores e inibidores de apoptose, uma vez que esses componentes já foram comprovados estarem imbricados nestes processos (DE RESENDE, AMARAL, MUNZENMAIER & GREENE, 2006).

O aumento no fluxo sanguíneo para a musculatura esquelética promovido pelo TF aeróbio, e o conseqüente aumento do estresse de cisalhamento, ou *shear stress,* apresentam correlação direta com o aumento na liberação de NO e VEGF, que também contribui para o aumento do fluxo, pois leva não somente á vasodilatação dependente do endotélio, como a angiogênese; sendo considerados

por muitos pesquisadores o sinal primário para o remodelamento vascular (ARAKAWA, 1993; MOYNA & THOMPSON, 2004). Em condições fisiológicas, a manutenção, a formação e/ou a perda de capilares é dependente de um fino balanço de reguladores positivos e negativos de angiogênese (fatores pró-angiogênicos e angiostáticos, respectivamente) (POLVERINI, 1995).

Evidências acumuladas indicam que uma redução da sobrevida das células endoteliais, ou seja, uma maior apoptose na microcirculação pode causar rarefação em indivíduos hipertensos; embora os mecanismos das vias pró e/ou anti-apoptóticas não tenham ainda sido bem investigadas (GOBE, BROWNING, HOWARD, HOGG, WINTERFORD & CROSS, 1997). Estudos mostram que o estresse oxidativo promove apoptose de célula endotelial na microcirculação e induz rarefação em SHR. De fato, estudos posteriores comprovaram que o tratamento crônico com antioxidantes reduziu a apoptose das células endoteliais em microvasos e preveniu a rarefação estrutural em SHR (KOBAYASHI, DELANO & SCHMID-SCHONBEIN, 2005). Entretanto estudos com abordagem não farmacológica, como o TF, no que concerne a regulação das proteínas pró e anti-apoptóticas, ainda não foram estudadas.

A seguir discutiremos um pouco melhor cada um desses principais mediadores de angiogênese no intuito de compreender como estão concatenados no processo de dano e reparo vascular na HA e seus efeitos com o TF.

4.2.1 Óxido Nítrico e o Fator de Crescimento Vascular Endotelial na Angiogênese: Efeito da Hipertensão Arterial e do Treinamento Físico.

O NO é produzido pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) em uma reação que implica a conversão do aminoácido L-arginina para L-citrulina e NO (FIGURA 2). Para que ocorra esta reação é necessário a presença de oxigênio e NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) e co-fatores como FAD (flavina adenina dinucleotídeo), FMN (flavina mononucleotídeo) e BH_4 (tetrahidrobiopterina) (ALDERTON, COOPER & KNOWLES, 2001).

Existe 3 isoformas de NOS, codificadas por 3 genes distintos com diferente localização, regulação, propriedades catalíticas e sensibilidade a inibidores. A nNOS (NOS-1), conhecida como NOS neuronal, é uma isoforma constitutiva predominante

no tecido neuronal e renal; a iNOS (NOS-2) é induzível, e pode se expressar em grande variedade de células e tecidos, especialmente nos macrófagos estimulados por citocinas e outros agentes pró-inflamatórios, além de também estar presente em células endoteliais e musculares lisas vasculares; e a eNOS (NOS-3), conhecida como NOS endotelial, foi descoberta inicialmente nas células endoteliais e se expressa de maneira constitutiva (KATUSIC & COSENTINO, 1994).

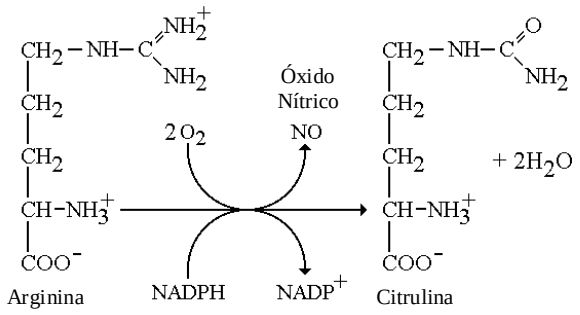


FIGURA 2 – Biosíntese de NO.

A eNOS, dependente em grande parte do complexo Ca^{2+}-CaM (cálcio-calmodulina) para sua ativação, é a responsável pela produção do NO endotelial que desempenha uma função fisiológica importante no sistema vascular (FLEMING, 1987; NISHIDA, HARRISON, NAVAS, FISHER, DOCKERY, UEMATSU, NEREM, ALEXANDER & MURPHY, 1992). Diversos estímulos, como o *shear stress*, fatores de crescimento e hormônios podem promover um aumento na expressão da eNOS e conseqüentemente na produção de NO (LI, WALLERATH & FORSTERMANN, 2002), atuando principalmente na vasodilatação, na angiogênese, na inibição da agregação plaquetária e do crescimento da musculatura lisa, assim como na inibição da adesão de monócitos e leucócitos no endotélio. Como conseqüência, o NO participa fundamentalmente na manutenção da função, estrutura e integridade vascular (COHEN, SHEPHERD & VANHOUTTE, 1983; DUBEY & OVERBECK, 1994; KUBIS, RICHER, DOMERGUE, GIUDICELLI & LÉVY, 2002).

Melhores entendimentos sobre o papel das isoformas da NOS foram possíveis com o advento dos camundongos *Knockout* para esses genes. De fato, o animal *Knockout* para o gene da eNOS ($eNOS^{-/-}$) mostrou HA sistêmica com disfunção endotelial, consistente com o papel do NO endotelial em reduzir o tônus

vascular (HUANG, HUANG, MASHIMO, BLOCH, MOSKOWITZ, BEVAN & FISHMAN, 1995), além de mostrar prejuízo na angiogênese (LEE, SALYAPONGSE, BRAGDONGA, SERÁS, WATKINS, EDINGTON & BILLIAR, 1999; KUBIS, RICHER, DOMERGUE, GIUDICELLI & LÉVY, 2002). Consistente com os dados, outros estudos mostraram que a inibição crônica da síntese de NO endotelial resultou em HA, aumento da resistência vascular periférica e rarefação microvascular, ressaltando um importante papel da microcirculação na regulação da PA (STRUIJKER BOUDIER, LE NOBLE, MESSING, HUIJBERTS, LE NOBLE & VAN ESSEN, 1992; KRIEFER, MISTELI, KALAK, TSCHUDIN, FINGERLE, KOOIJI, STUMM, SUMANOVSCKI, SIEBER & BATTEGAY, 2002). Além disso, SUN, HUANG, SMITH, STACKPOLE, CONNETTA, SHESELY, KOLLER & KALEY (1999) demonstraram que em músculo esquelético de camundongos $eNOS^{-/-}$ o diâmetro arterial basal estava significantemente reduzido comparado aos animais controle, implicado no desenvolvimento da rarefação microvascular. Por outro lado, o TF vem se mostrando eficaz em promover elevação nos níveis de NO tanto em humanos (MAEDA, MIYAUCHJ, KAKIYAMA, SUGAWARA, IEMITSU, IRUKAYAMA-TOMOBE, MURAKAMI, KUMAGAI, KUNO & MATSUDA, 2001), como em animais experimentais (GREEN, WALSH, MAIORANA, BURKE, TAYLOR & O´DRISCOLL, 2004), demonstrando seu papel benéfico na indução de vasodilatação e angiogênese, sendo uma terapia atrativa para doenças vasculares.

Muitas moléculas angiogênicas possuem propriedades vasodilatadoras, sendo que a existência de um link molecular/bioquímico entre vasodilatação, produção de NO e angiogênese tem sido estabelecida (ZICHE, MORBIDELLI, MASINI, AMERINI, GRANGER, MAGGI, GEPPETTI & LEDDA, 1994). O NO é o mediador final da angiogênese estimulada pelo VEGF, o principal fator implicado na vasculogênese e angiogênese (ZICHE, MORBIDELLI, CHOUDHURI, ZHANG, DONNINI, GRANGER & BICKNELL, 1997; PARENTI, MORBIDELLI, CUI, DOUGLAS, HOOD, GRANGER, LEDDA & ZICHE, 1998).

Estudos mostram que o VEGF é um potente fator de crescimento endotelial induzido pelo exercício (PRIOR, YANG & TERJUNG, 2004), tanto em animais (AMARAL, SILVEIRA, ZORN & MICHELINI, 2001; BIROT, 2003) quanto em humanos (GUSTAFSSON, KNUTSSON; PUNTSCHART, KAIJSER, NORDQVIST,

SUNDBERG & JANSSON, 2002), sendo não só importante por seu efeito angiogênico, mas também pelo efeito anti-apoptótico (FERRARA, 2001). Além disso, a progressão de vários processos patológicos tais como, crescimento de tumores, artrite reumatóide e retinopatia diabética, está relacionada ao aumento anormal das redes vasculares mediados pelo VEGF (HANAHAN & FOLKMAN, 1996).

O VEGF é um dímero protéico, sinalizador com ação autócrina e parácrina que ativa receptores transmembranares expressos, principalmente, em células endoteliais. Esta proteína se caracteriza como um dos membros da superfamília de fatores de crescimento, formado por oito resíduos de cisteínas ligados por pontes dissulfeto (HOLMES & ZACHARY, 2005). Em humanos, foram identificados seis membros: VEGF - A, VEGF - B, VEGF - C, VEGF - D, VEGF - E e PIGF (fator de crescimento placentário), tendo VEGF - A, comumente referenciado como VEGF, um papel mais ativo no processo angiogênico.

Até o presente momento, três diferentes receptores para o VEGF, receptores do tipo tirosina quinase, têm sido descritos: VEGFR1 ou Flt-1, VEGFR2 ou flk-1 (KDR) e VEGFR3 ou Flt-4, sendo que a ativação de cada receptor induz efeitos distintos (GUSTAFSSON & KRAUS, 2001). Na TABELA 2 apresenta o resumo das isoformas de VEGF e seus receptores.

TABELA 2 – Especificidade dos receptores ao ligante VEGF e efeitos biológicos.

Membro da família VEGF	Receptor	Função
VEGF (VEGF-A)	VEGFR1 e VEGFR2	angiogênese manutenção vascular
VEGF-B	VEGFR1	não estabelecida
VEGF-C	VEGFR2 e VEGFR3	linfangiogênese
VEGF-D	VEGFR2 e VEGFR3	linfangiogênese
VEGF-E (fator viral)	VEGFR2	angiogênese
PIGF	VEGFR1	angiogênese inflamação

O VEGFR2 é o receptor de maior importância no processo de angiogênese e aumento dos efeitos da permeabilidade do VEGF, estando o mesmo envolvido no processo de diferenciação das células endoteliais (NEUFELD, COHEN, GENGRINOVITCH & POLTORAK, 1999; FERRARA, 1999), quimiotaxia e sobrevivência celular (FERRARA, GERBER & Le COUTER, 2003). O VEGFR2 tem uma menor atividade com o VEGF quando comparado ao VEGFR1, porém uma maior atividade sinalizadora. O VEGFR2 sofre uma fosforização da tirosina e desencadeia a mitogênese, a migração celular e a permeabilidade vascular ao VEGF, enquanto que o VEGFR1 apresenta fraca e indetectável resposta (FERRARA, GERBER, Le COUTER, 2003).

A principal função que os receptores de VEGF (VEGFR1 e 2) possuem no desenvolvimento do sistema vascular foi demonstrada em estudos de animais *Knockout* para estes 2 genes, em que mostraram a morte dos animais antes do nascimento, devido ao fato de as células endoteliais não terem sofrido o processo de diferenciação e pela não ocorrência da formação de vasos sanguíneos (FERRARA, 2002).

Dessa forma, o VEGF é reconhecido como uma proteína reguladora chave da angiogênese fisiológica tanto na fase embriogênica como pós-natal, envolvido na formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes. Funciona também como um potente fator pró-sobrevivência (anti-apoptótico) para células endoteliais. Além disso, o VEGF induz a expressão de proteínas anti-apoptóticas nas células endoteliais, auxiliando sobremaneira na formação de capilares ao passo que inibe os processos que envolvem sua perda (FERRARA, 1999).

Para promoção de suas funções como descritas acima é necessário a ativação das vias de sinalização mediadas pela interação do VEGF com o VEGFR2. Resumidamente, a transdução de sinais dos receptores do tipo tirosina quinase tem várias etapas bioquímicas: (1) interação do ligante com receptor; (2) dimerização do receptor; (3) ativação da porção tirosina quinase; (4) auto fosforilação do receptor; (5) ligação e ativação de proteínas adaptadoras aos sítios de auto fosforilação. O entendimento desses mecanismos de sinalização intracelular mediados pelo VEGF possibilita intervenções terapêuticas para controlar o processo fisiopatológico da angiogênese (SCHLESSINGER, 2000).

A estimulação da eNOS pelo VEGF para o desempenho de suas funções é mediada por vários mecanismos, indicando que outras vias estão atreladas a alteração na produção de NO, independente da concentração intracelular de cálcio. Entre os mecanismos mais importantes podemos destacar o aumento na expressão gênica e protéica da eNOS, permitindo à célula endotelial produzir maiores quantidades de NO. O aumento na expressão da eNOS envolve a via de sinalização da PI3K (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato) e subseqüente ativação da AKT (PKB, proteína quinase B) (FIGURA 3) (FULTON, GRATTON, MCCABE, FONTANA, FUJIO, WALSH, FRANKE, PAPAPETROPOULOS, SESSA, 1999; DAHER, BOULAY, DESJARDINS, GRATTON & CLAING, 2010). Além disso, há estudos que compravam que o NO estimula a expressão de fatores de crescimento, tal como o VEGF (DULAK, JOZKOWICZ, DEMBINSKA-KIEC, GUEVARA, ZDZIENICK, ZMUDZINSA-GROCHOT, FLOREK, WOJTOWICZ, SZUBA & COOKE, 2000), o que demonstra uma ação sinérgica entre os 2 fatores requerido para um apropriado crescimento vascular.

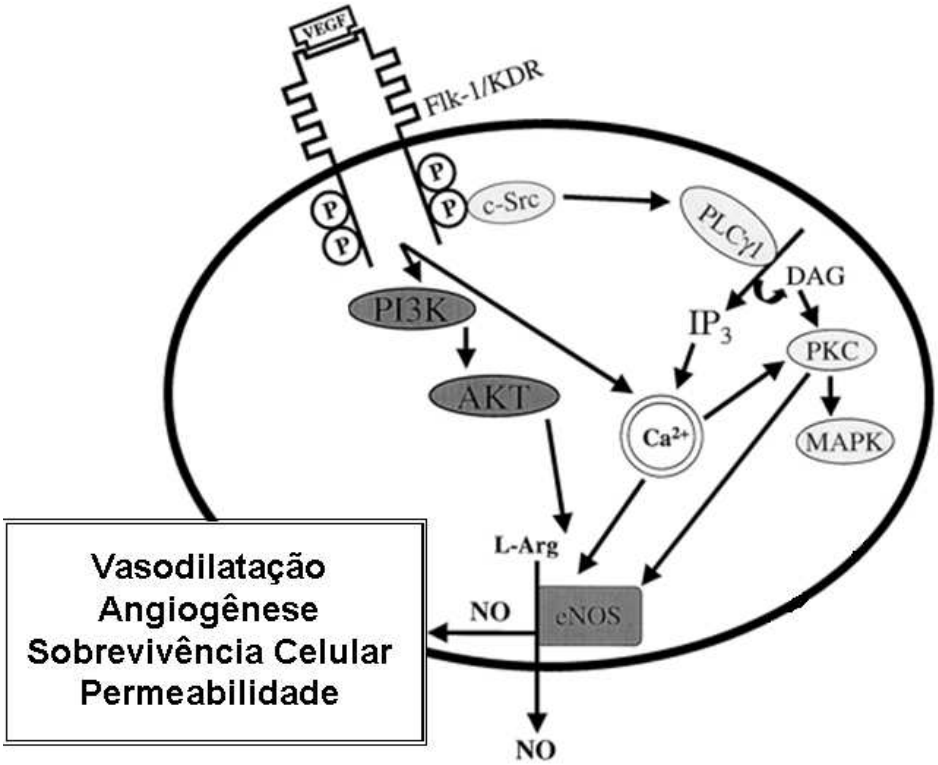


FIGURA 3 – Intracelular *cross talk* entre a sinalização da eNOS e a ativação do VEGFR2 (Flk-1/KDR) pelo VEGF e suas principais funções.

Sabe-se que os mecanismos de controle do processo angiogênico dependem de um balanço de proteínas que regulam a apoptose. Conforme demonstrado, a ativação de VEGF e eNOS tem um importante papel no controle da sobrevivência celular por estarem envolvidos diretamente na regulação das proteínas apoptóticas, revelando, de fato, que estes fatores estão intimamente concatenados para a promoção da homeostase vascular (DE RESENDE, AMARAL, MUNZENMAIER & GREENE, 2006).

4.2.2 Apoptose e Angiogênese: Efeito da Hipertensão Arterial e do Treinamento Físico.

Apoptose é uma morte celular geneticamente programada em resposta a mecanismos fisiológicos e ou patológicos; a célula se auto destrói sem causar danos ás células vizinhas. Esse conceito foi descrito pela primeira vez na literatura por KERR, WYLLIE & CURRIE (1972), no *British Journal of Cancer* e, a partir desse estudo, inúmeros artigos vêm sendo publicados sobre essa temática (ISRAELS & ISRAELS, 1999; NOR & POLVERINI, 1999).

O mecanismo celular de apoptose é marcado por alterações na permeabilidade celular (transição da permeabilidade mitocondrial), onde há formação de um canal de alta condutância com perda do potencial para fosforilação oxidativa; há extravasamento de citocromo c para o meio intracitoplasmático; ativação de uma série de substâncias serino-proteases como caspases (realizam clivagem protéica), transglutaminases (entrecruzamento de proteínas), endonucleases (clivagem nuclear) e fosfatidilserina / trombospondina (marcadores da membrana externa dos corpúsculos apoptóticos com indução da fagocitose). O processo implica na fragmentação da cromatina e das organelas com posterior clivagem das mesmas. Corpúsculos apoptóticos são fagocitados por macrófagos, que reconhecem suas sinalizações (DAMIANI, 2004).

Os mecanismos de iniciação do processo apoptótico são eficientemente regulados por uma série de inter-relações de múltiplos fatores. A via de ativação da apoptose pode ser induzida por vias extrínsecas de estímulos, como ligantes de superfície celular, ou por via intrínseca, com sinais originados no interior da célula (HENGARTNER, 2000).

A via extrínseca da apoptose por sinais extracelulares que envolve a ativação da pró-caspase 8 ocorre, por exemplo, com a ligação de fatores em receptores transmembrânicos, chamados “receptores de morte” os quais se encontram nas superfícies celulares, transmitindo um sinal de morte para o interior da célula. Receptores incluem o gene da superfamília de receptores para o fator de necrose tumoral (RTNF), incluindo RTNF-1, Fas (CD95), DR-4 e DR-5 (receptores TRAIL) (ASHKENAZI, 2002); além de defeito no reparo do DNA celular, drogas citotóxicas ou irradiações.

A via intrínseca da apoptose envolve a ativação da pró-caspase 9 a qual é ativada por eventos de transição da permeabilidade mitocondrial, com liberação de citocromo c para o meio intracitoplasmático (SALVESEN & DUCKETT, 2002). Nestes casos de ativação da caspase 9, há interação com o fator de ativação das proteases pró-apoptóticas 1 (Apaf-1). Uma vez ativada, a caspase 9 ativa uma série de outras pró-caspases como por exemplo a caspase 3, 6 e 7 subseqüentemente, clivando estas pró-caspases em substratos menores, resultando numa amplificação do sinal de morte (EARNSHAW, MARTINS & KAUFMANN, 1999).

O *link* de interação entre a mitocôndria e as caspases ocorre através da família das proteínas Bcl-2 (“linfoma de células B 2”). A família Bcl-2 vem sendo intensivamente investigada por ser uma família de proteínas indutoras e repressoras de morte por apoptose que participam ativamente da regulação da apoptose (BORNER, 2003). Os membros da família Bcl-2 como Bcl-2 e Bcl-xL inibem a apoptose, pois previnem a liberação de citocromo c e são chamados de reguladores anti-apoptóticos. Por outro lado, Bad, Bax e Bak são proteínas pró-apoptóticas por induzirem a liberação de citocromo c (HENGARTNER, 2000). O citocromo c liga-se ao Apaf-1 o qual, através de alterações conformacionais dependentes de ATP, oligomeriza-se e forma o aptossomo, um complexo que ativará a pró-caspase 9. Esta pró-caspase 9 ativada, desencadeia o sinal para a ativação das caspases 3, 6 e 7 resultando num processo amplificado e catalítico resultando no processo apoptótico (SLEE, 1999) (FIGURA 4).

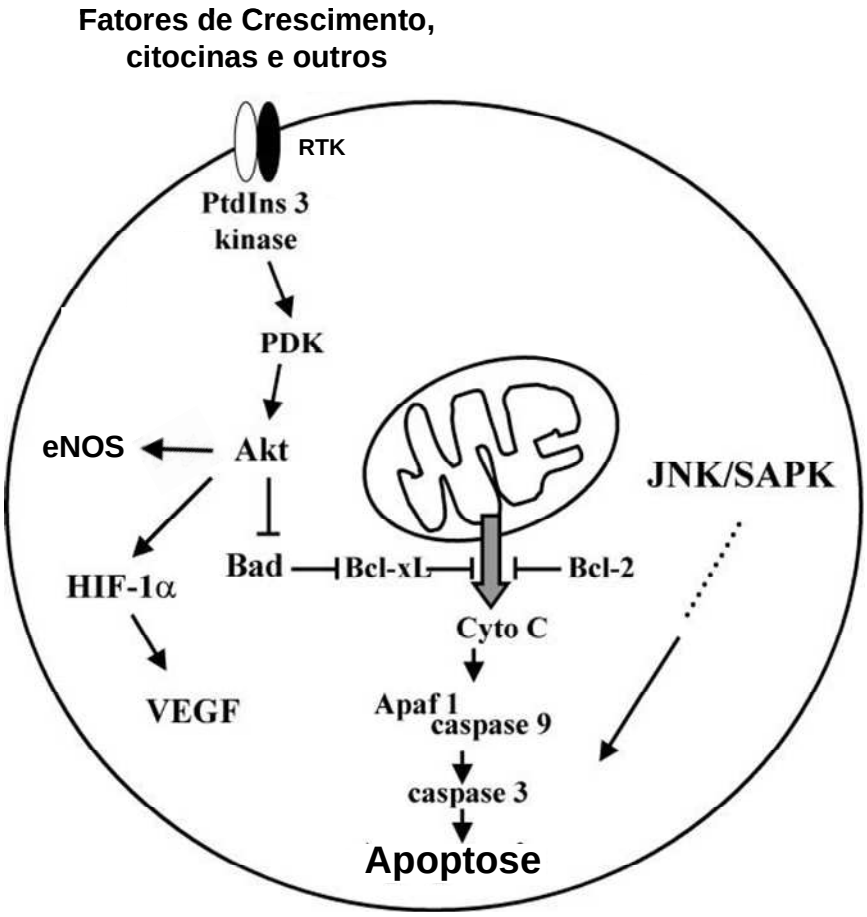


FIGURA 4 – Visão esquemática dos mecanismos intracelulares mediados pela família Bcl-2 ("linfoma de células B 2"), uma família de proteínas indutoras e repressoras de morte por apoptose. RTK: receptor de tirosina quinase; PtdIns3K: fosfatidilinositol 3,4,5- trifosfato quinase; PDK: quinase dependente de fosfosinositídeos, Akt: proteína quinase B; Bcl-2/Bcl-x e BAD: proteínas anti e pró-apoptóticas respectivamente; HIF-1α: fator induzido por hipóxia; Cyto C: citocromo c; Apaf1: fator de ativação das proteases pró-apoptóticas 1.

Sabidamente a mitocôndria funciona como chave para a integração e propagação dos sinais de morte. A maior parte dos sinais pró-apoptóticos são derivados da ruptura mitocondrial originada pela perda do potencial para fosforilação oxidativa, aumentando subitamente a permeabilidade da membrana mitocondrial com formação de um edema com grande influxo de água para a matriz mitocondrial e eventual ruptura da membrana. Proteínas são liberadas para o meio

intracitoplasmático (extra-mitocondrial) incluindo proteínas indutoras da apoptose (AIF), endonucleases (endoG), Smac/Diablo, Htr/Omi e o citocromo c, que ativa o aptossomo e, conseqüentemente, a cascata de caspases. A mitocôndria, quando sofre transição da permeabilidade mitocondrial, perde a homeostase bioquímica necessária para sobrevida celular: há depleção de ATP e ausência de síntese, moléculas reduzidas como NADH e NADPH, a glutationa é oxidada e radicais livres são liberados (KROEMER & REED, 2000; GOTTLIEB, 2001; GREEN & KROEMER, 2004).

Numa célula viável, o sinal apoptótico deve ser mantido “desligado”. Enquanto não houver um estímulo contundente de morte, com ligação em seus receptores, não haverá apoptose. Estudos nos mostram que todas as células de todas as espécies animais estão prontas para entrarem em apoptose, basta que o estímulo a vida cesse e entre em ação o estímulo de morte. Por esse motivo, a falta de ligantes “pró-sobrevivência”, induzem a apoptose, exemplos de ligantes que favorecem o estímulo a sobrevivência são ligações de hormônios, fatores de crescimento, principalmente o VEGF, citocinas, nutrientes, entre outros (RAFF, BARRES, BURNE, COLES, ISHIZAKI & JACOBSON, 1993; AMEISEN, 2001; DAMIANI, 2004).

Estudos demonstram que a expressão de Bcl-2 é capaz de inibir a geração de espécies reativas do oxigênio e a acidificação intracelular, bem como estabilizar o potencial de membrana da mitocôndria (VANDER, HEIDEN & THOMPSON, 1999). A homeostasia é mantida pelo um fino controle da quantidade de proteínas anti e pró-apoptóticas. Além disso, sabe-se que os membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 seqüestram alguns dos fatores pró-apoptóticos e impedem a ativação dos genes Bax e Bak, inibindo assim, os eventos pró-apoptóticos mitocondriais: a superexpressão de Bcl-2 ou Bcl-xl potencialmente inibem a apoptose em resposta a muitos insultos citotóxicos, superexpressão de radicais livres, alterações da permeabilidade mitocondrial e potencial para fosforilações oxidativas, previnindo assim a liberação de citocromo c (REED, 1998).

Como mencionado, os sinais de sobrevivência endotelial envolvidos pela interação VEGF/VEGFR2 são predominantemente mediados pela via PI3K/AKT/eNOS implicados no aumento de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2

(NOR, CHRISTENSEN, MOONEY & POLVERINI, 1999) e AIF (TRAN, RAK, SHEEHAN, SAIBIL, LACASSE, KORNELUK & KERBEL, 1999), inibindo assim a ativação das caspases, conseqüentemente a apoptose bem como aumentando a angiogênese. Por outro lado, esta cascata de ativação pode inibir a atividade pró-apoptótica de Bad que resulta na fosforilação de Bad (Ser112 e Ser136), mantendo o peptídeo em forma inativa (fosforilado), impedindo assim a sinalização apoptótica (DATTA, DUDEK, TAO, MASTERS, FU, GOTOH & GREENBERG, 1997). Dessa forma, conseguimos ressaltar a interação e a importância desses fatores no combate a apoptose microvascular em prol da indução angiogênica.

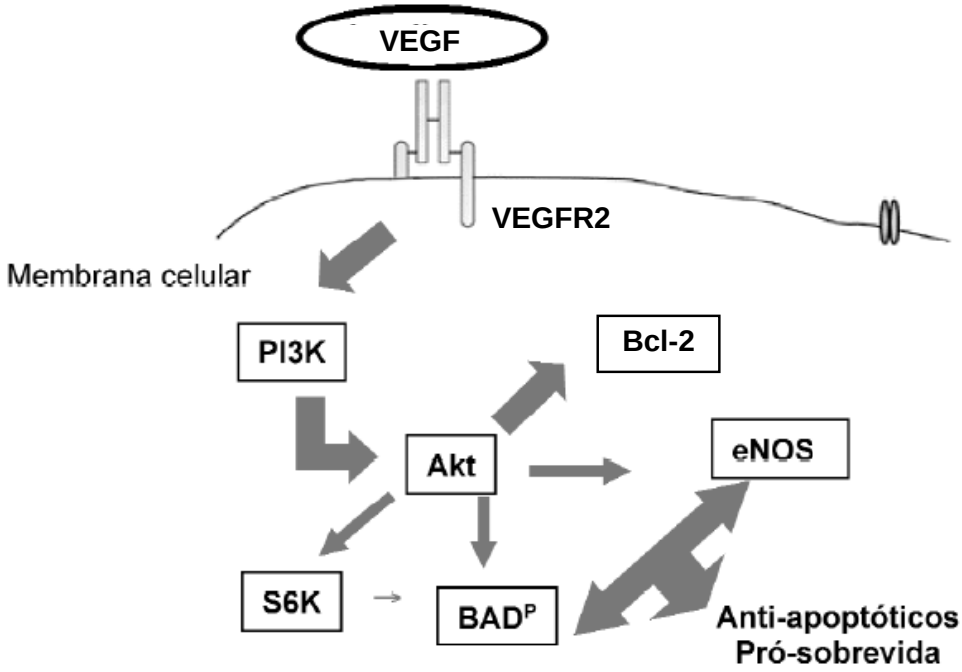


FIGURA 5 – Visão esquemática das vias de sinalização de VEGF/VEGFR2 que promovem sobrevida celular e angiogênese. PI3K: fosfoinositídio 3 quinase; Akt: proteína quinase B; Bcl-2/Bcl-x e BAD: proteínas anti e pró-apoptóticas respectivamente; S6K: p70S6 quinase; O p superescrito denota o estado fosforilado de BAD.

O desequilíbrio apoptótico é uma característica marcante de numerosas patologias humanas e desempenha um crítico papel em várias DCV incluindo insuficiência cardíaca, isquemia cardíaca, aterosclerose e HA (HAUNSTETTER &

IZUMO, 1998; FORTUNO, GONZALEZ, RAVASSA, LOPEZ & DIEZ, 2003). A apoptose tem sido observada em diferentes tecidos em SHR comparado ao seu controle WKY. Interessantemente, várias anormalidades da musculatura esquelética incluindo aumento de níveis de noradrenalina, elevação intracelular de Ca^{2+} livre, redistribuição de tipos de fibra, apoptose, redução de densidade capilar, entre outras, tem sido demonstrada em SHR (QUADRILATERO & RUSH, 2006). Em SHR, como mencionado, a rarefação capilar pode ser produzida pela apoptose endotelial, mediada em grande parte pelo prejuízo na ativação de VEGF/VEGFR2 (WANG, OLSZEWSKI, ROSEBURY, WANG, ROBERTSON & KEISER, 2004). Nessas células, o sistema renina angiotensina, particularmente a angiotensina II ativa a enzima NADH/NADH oxidase, aumentando a produção de superóxido e diminuindo a produção de NO na HA. O endotélio microvascular de SHR é exposto ao aumento do estresse oxidativo repercutindo em maior apoptose celular, em grande parte devido ao aumento na atividade da xantina oxidase (SUZUKI, DELANO, PARKS, JAMSHIDI, GRANGER, ISHII, SUEMATSU, ZWEIFACH & SCHMID-SCHONBEIN, 1998) e NADPH oxidase (WU, MILLETTE, WU & DE CHAMPLAIN, 2001) e/ou uma redução na atividade da superóxido desmutase (ITO, TORII & SUZUKI, 1995). Entretanto, até o momento poucos estudos foram desenvolvidos com esta temática na HA, principalmente no que concernem as vias de sinalização intracelular. Além disso, a apoptose e o perfil de várias proteínas relacionadas a apoptose não tem sido examinadas no músculo esquelético de animais hipertensos quando induzidos pelo TF.

Apesar desse importante papel do exercício na prevenção e no tratamento da HA, os mecanismos envolvidos no remodelamento vascular provocados por essa conduta não medicamentosa, não são totalmente compreendidos. Uma possibilidade atraente é o aumento na produção e função das CPE (SHANTSILA & LIP, 2009).

Com a descoberta das CPE foi possível mudar a visão dos mecanismos reparatórios voltados para o dano vascular e promover a possibilidade de exploração dessas como uma poderosa ferramenta para a terapia vascular (MILLER-KASPRZAK & JAGODZINSKI, 2007).

4.3 Células Progenitoras Endoteliais

4.3.1 Origem

Entre os processos celulares e moleculares que orquestram a construção de novos vasos sanguíneos, a contribuição de células circulantes tem-se tornado recentemente apreciado. Assim, a identificação de CPE na circulação foi uma das primeiras populações celulares encontradas que diretamente contribuem para a formação de novos vasos sanguíneos (ASAHARA, MUROHARA, SULLIVAN, SILVER, van der ZEE, LI, WITZENBICHLER, SCHATTEMAN & ISNER, 1997).

A arquitetura vascular em vertebrados resulta da associação de 2 processos distintos: a vasculogênese e a angiogênese. Vasculogênese é o processo de formação *in situ* de vasos sangüíneos a partir de angioblastos, que migram e se fundem com outras células endoteliais formando novos vasos. Já a angiogênese é a extensão de uma rede vascular já formada pelo surgimento de novos capilares e proliferação de células previamente diferenciadas (RISAU, 1997; ANVERSA, KAJSTURA, NADAL-GINARD & LERI, 2003). Entretanto, em adultos, a medula óssea é um vasto reservatório de células tronco, as quais são capazes de gerar tipos de células linhagem-específica, em particular as células tronco hematopoiéticas e as CPE, as quais contribuem para o processo de neovascularização (ASAHARA, MUROHARA, SULLIVAN, SILVER, van der ZEE, LI, WITZENBICHLER, SCHATTEMAN & ISNER, 1997; CHOI, KENNEDY, KAZAROV, PAPADIMITRIOU & KELLER, 1998; RAFII, 2000).

Por vários anos, o crescimento e o remodelamento vascular foram tradicionalmente explicados como resultado da capacidade proliferativa e migratória de células endotelias maduras. Até que um importante estudo em 1997 (ASAHARA, MUROHARA, SULLIVAN, SILVER, van der ZEE, LI, WITZENBICHLER, SCHATTEMAN & ISNER, 1997) desafiou o tradicional dogma de formação de vasos sanguíneos em tecidos adultos, quando os autores isolaram e caracterizaram uma população de CPE humana CD34+, os quais podem se diferenciar em células com características de célula endotelial. O estudo foi o primeiro que sugeriu que as CPE em sangue periférico poderiam contribuir para a formação de novos vasos, participando do processo de vasculogênese. Dessa forma, a descoberta das CPE contribuiu sobremaneira para quebrar o paradigma de que a neovascularização em

adultos não está restrita a angiogênese, envolvendo também o mecanismo de vasculogênese no período pós-natal.

Além disso, as CPE derivadas da medula óssea, não somente se incorporam dentro de vasos sanguíneos funcionais dando origem a novos vasos, mas também podem fornecer a liberação de uma gama de fatores de crescimento, seria presumidamente providenciar sinais parácrinos às células endoteliais adjacentes, que facilitam a angiogênese e vasculogênese simultaneamente, demonstrando um adicional significado pelo qual as CPE derivadas da medula óssea contribuem para o processo de neovascularização e reendotelização (FIGURA 6) (KAMIHATA, MATSUBARA, NISHIUE, FUJIYAMA, TSUTSUMI, OZONO, MASAKI, MORI, TATEISHI, KOSAKI, SHINTANI, MUROHARA, IMAIZUMI & IWASAKA, 2001; GNECCHI, ZHANG, NI & DZAU, 2008).

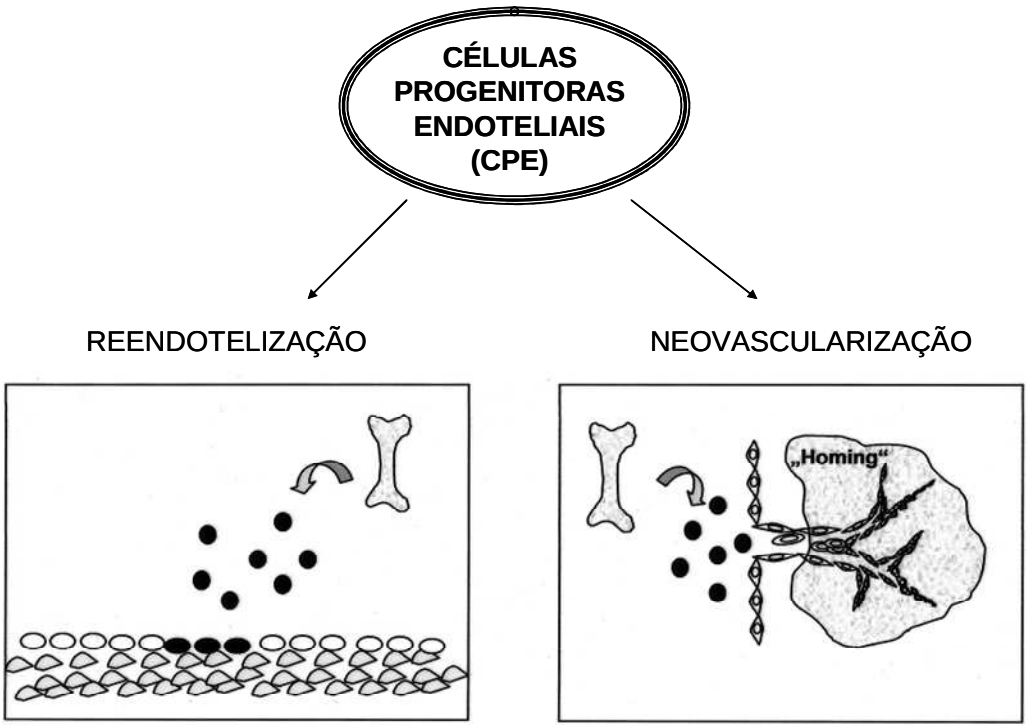


FIGURA 6 – Participação das CPE na reconstrução e formação de vasos sanguíneos

De acordo com a descoberta inicial, as CPE e as células tronco hematopoiéticas são derivadas de um precursor comum na medula óssea, o

hemangioblasto. As CPE podem ser definidas como células positivas para ambos marcadores superficiais de membrana, tais como: o de células tronco hematopoiéticas, CD34, e o marcador de célula endotelial, o VEGFR2. Atualmente, vem sendo proposto outros marcadores de CPE com as mais diversas combinações entre eles, na tentativa de melhor identificar esta população celular. Além disso, estas células são caracterizadas por terem alta capacidade proliferativa, distinguindo as mesmas das células endoteliais maduras (URBICH & DIMMELER, 2004).

Existem controvérsias com respeito à identificação e a origem das CPE, as quais são isoladas da porção mononuclear do sangue periférico. Assim, diferentes fontes de células tronco podem se diferenciar em célula endotelial, tais como, as células tronco mesenquimais (multipotentes), mielóide (monócitos e macrófagos) e células tronco residentes nos tecidos (tecido adiposo, células progenitoras cardíacas e células neuroprogenitoras) (REYES, DUDEK, JAHAGIRDAR, KOODIE, MARKER & VERFAILLIE, 2002). Dessa forma, fica evidente que o conceito de fonte original de CPE na circulação não pode ser limitado a medula óssea, podendo ser encontradas em diferentes nichos teciduais.

4.3.2 Mobilização

As CPE derivadas da medula, quando requeridas, têm sido liberadas para circulação periférica. A liberação das CPE da medula óssea é regulada por uma variedade de fatores de crescimento, enzimas e receptores de superfície. As células tronco são localizadas em um microambiente conhecido como “nicho de células tronco”, onde elas estão mantidas em um estado indiferenciado e quiescente. A medula óssea é o maior reservatório de células tronco adultas. Em condições basais as células tronco que darão origem as CPE permanecem na fase G0 do ciclo celular e ficam associadas às células tronco do estroma na medula óssea (HEISSIG, HATTORI, DIAS, FRIEDRICH, FERRIS, HACKETT, CRYSTAL, BESMER, LYDEN, MOORE, WERB & RAFII, 2002).

A transformação do estado quiescente para o proliferativo na medula óssea depende de fatores específicos que precedem a mobilização das CPE para a circulação. O recrutamento das CPE do nicho quiescente da medula óssea tem sido associado com a ativação de proteinases como a elastase, catepsina G e

metaloproteinases da matriz (MMPs). Estas enzimas proteolíticas clivam a matriz extracelular ou moléculas ligadas à membrana celular responsáveis pela adesão das CPE sobre as células estromais da medula óssea. Estas células expressam nas membranas o *Kit ligand* (mKitL), o qual liga-se ao receptor c-Kit da membrana das CPE quando o *ligand* está em forma solúvel (sKitL) na medula. MMP-9 cliva proteoliticamente mKitL para sKitL, o qual interage com o receptor c-Kit na CPE para conduzir o sinal essencial para diferenciação e migração para circulação (HEISSIG, HATTORI, DIAS, FRIEDRICH, FERRIS, HACKETT, CRYSTAL, BESMER, LYDEN, MOORE, WERB & RAFII, 2002).

Um dos modelos usados para estudar o recrutamento das CPE na medula óssea é a supressão das células medulares por agentes citotóxicos. Esta supressão não afeta as células tronco hematopoiéticas na fase G0 do ciclo celular. Portanto, estas células podem servir como uma população de células capazes de retomar a liberação de células hematopiéticas e CPE. Dessa forma, a introdução de agentes citotóxicos na medula de camundongos que superexpressam ou são *knockout* (MMP-$9^{+/+}$ e MMP-$9^{-/-}$) para o gene da metaloproteinase-9 resultou em um pobre recrutamento e diferenciação de células hematopoiéticas e CPE somente no grupo MMP-$9^{-/-}$. O tratamento dos camundongos MMP-$9^{+/+}$ com fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator derivado do estroma 1 (SDF-1) e fator de estimulação de colônias de granulócitos (G-CSF) causou um acentuado aumento na concentração plasmática de sKitL, comparado ao grupo não tratado. Estes resultados mostram que o VEGF, SDF-1 e o G-CSF têm um importante papel na indução da MMP-9, precursor da biosíntese, secreção e posterior mobilização das CPE medulares para o sangue periférico (HRISTOV & WEBER, 2004).

De fato, diversos estudos vêm demonstrando que o VEGF e o SDF-1 têm sido considerados cruciais na diferenciação e migração das CPE para circulação. A isquemia ou hipóxia está entre as condições acreditadas serem mais determinantes para induzir a mobilização de CPE da medula óssea. A isquemia ou hipóxia induz um aumento nos níveis de VEGF e SDF-1 circulantes promovendo a mobilização de CPE da medula óssea via mecanismo dependente de MMP-9 (ASAHARA, TAKAHASHI, MASUDA, KALKA, CHEN, IWAGURO, INAI, SILVER & ISNER, 1999; YAMAGUCHI, KUSANO, MASUO, KAWAMOTO, SILVER, MURASAWA, BOSCH-

MARCE, MASUDA, LOSORDO, ISNER, & ASAHARA, 2003; URBICH & DIMMELER, 2004; HRISTOV & WEBER, 2004). Além disso, estudos clínicos usando terapia gênica, utilizando transfecção de plasmídeo com VEGF, demonstraram um aumento na concentração de CPE circulantes em humanos (KALKA, MASUDA, TAKAHASHI, GORDON, TEPPER, GRAVEREAUX, PIECZEK, IWAGURO, HAYASHI, ISNER, & ASAHARA, 2000).

Além desses fatores descritos de mobilização das CPE, outros autores mostraram que a eNOS, responsável pela produção de NO, também é determinante para produção e mobilização das CPE para circulação (AICHER, HEESCHEN, MILDNER-RIHM, URBICH, IHLING, TECHNAU-IHLING, ZEIHER & DIMMELER, 2003). De fato, a deficiência de eNOS diminui a mobilização de CPE pelo VEGF, reduzindo a capacidade de recuperação da medula óssea após mielossupressão (AICHER, HEESCHEN & DIMMELER, 2004). Da mesma forma, CPE colhidas de camundongos $eNOS^{-/-}$ revelaram reduzida capacidade para aumentar a vascularização após isquemia; uma vez que este gene foi mostrado ser essencial para proliferação dessas células dentro do compartimento medular (LAUFS, WERNER, LINK, ENDRES, WASSMANN, JURGENS, MICHE, BOHM & NICKENIG, 2004).

4.3.3 *Homing*, Adesão e Diferenciação

Embora a neovascularizaçao em adultos seja um assunto bastante investigado, os mecanismos de *homing* e diferenciação das CPE são pouco compreendidos. Uma interessante questão a ser levantada após entendimento da mobilização das CPE seria: como as CPE são endereçadas para os locais de neovascularização. Estudos recentes mostram que o passo inicial de *homing* envolve adesão de CPE em células endoteliais, as quais são ativadas por citocinas, fatores de crescimento e situações de hipóxia ou isquemia. As CPE expressam β2- integrina, as quais medean a adesão das CPE na monocamada de células endoteliais e posterior transmigração destas, nesta monocamada (VAJKOCZY, BLUM, LAMPARTER, MAILHAMMER, ERBER, ENGELHARDT, VESTWEBER & HATZOPOULOS, 2003). De acordo com esses resultados, camundongos *knockout*

para o gene da β2-integrina mostraram reduzido *homing* de CPE e baixa capacidade de melhorar a neovascularização após isquemia (URBICH & DIMMELER, 2004).

Outra possibilidade bastante atraente de *homing* é a atração química conhecida como quimiotaxia. Dado os baixos níveis de CPE na circulação, acredita-se que a atração química possa ser a medida mais importante para recrutar um considerável número de CPE para o tecido isquêmico. Assim, investigadores analisaram os fatores que influenciam a atração das CPE circulantes para sítios isquêmicos ou com hipóxia. Portanto, SDF-1 tem sido provado estimular o recrutamento de células progenitoras para tecidos isquêmicos e a sua expressão acentuada promoveu um aumento no *homing* e incorporação de células tronco dentro de tecidos isquêmicos (YAMAGUCHI, KUSANO, MASUO, KAWAMOTO, SILVER, MURASAWA, BOSCH-MARCE, MASUDA, LOSORDO, ISNER & ASAHARA, 2003). Além disso, os níveis de VEGF são aumentados durante isquemia e hipóxia e muito eficiente em atuar como um fator de atração química para CPE (KALKA, MASUDA, TAKAHASHI, GORDON, TEPPER, GRAVEREAUX, PIECZEK, IWAGURO, HAYASHI, ISNER, & ASAHARA, 2000, MILLER-KASPRZAK & JAGODZINSKI, 2007; EGUCHI, MASUDA & ASAHARA, 2007). Interessantemente, a capacidade migratória de CPE e células da medula óssea em direção ao VEGF e SDF-1, respectivamente, determinaram a melhora funcional de pacientes após terapia celular (BRITTEN, ABOLMAALI, ASSMUS, LEHMANN, HONOLD, SCHMITT, VOGL, MARTIN, SCHACHINGER, DIMMELER & ZEIHER, 2003).

Finalmente, a maturação da CPE para uma célula endotelial funcional pode ser muito importante para integração funcional do vaso. A cascata de eventos que regulam a diferenciação no sistema adulto é largamente desconhecida. Entretanto, vários estudos determinaram a diferenciação do precursor mesodermal comum, o hemangioblasto, durante o desenvolvimento embrionário. Claramente, o VEGF e seus receptores têm um papel crucial na estimulação da diferenciação endotelial no desenvolvimento embrionário (SHALABY, ROSSANT, YAMAGUCHI, GERTSENSTEIN, WU, BREINTMAN & SCHUH, 1995), em que o VEGF induz diferenciação de células endoteliais em ensaios de cultura *ex vivo,* usando uma variedade de células progenitoras adultas como o CD34+, o CD133+ e as células

mononucleadas do sangue periférico (KALKA, MASUDA, TAKAHASHI, KALKA-MOLL, SILVER, KEARNEY, LI, ISNER & ASAHARA, 2000).

Portanto, os mecanismos de *homing* e diferenciação das CPE requerem uma coordenada sequência de múltiplos passos e eventos de sinalização incluindo a proliferação, atração química, mobilização, adesão e finalmente a diferenciação em células endoteliais para reparo e formação de novos vasos (FIGURA 7) (URBICH & DIMMELER, 2004).

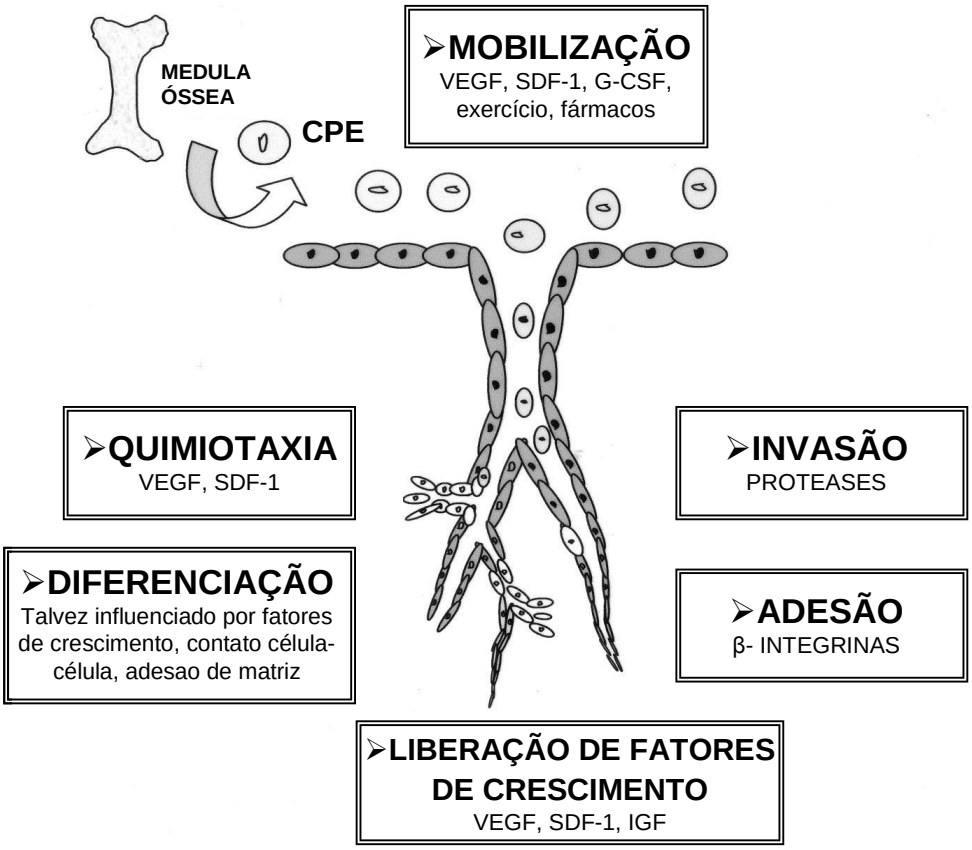


FIGURA 7 – Mecanismos de *homing* e diferenciação de CPE.

4.4 Células Progenitoras Endoteliais e Treinamento Físico

Investigações recentes evidenciam o TF aeróbio como responsável por promover maior liberação e melhorar as propriedades funcionais das CPE derivadas da medula óssea tanto em humanos quanto em animais, o qual contribui para a melhora da função endotelial, angiogênese e consequentemente, a manutenção da

homeostase cardiovascular (WAHL, BLOCK & SHMIDT, 2007; YANG, WANG, CHEN, LUO, TANG & TAO, 2007; WITKOWSHI & HAGBERG, 2007; MANFREDINI, RIGOLIN, SOFFRITTI, BOARI, CONCONI, CASTOLDI, CATIZONE, ZAMBONI, MANFREDINI, 2007; SHAFFER, GREENE, ARSHI, SUPPLE, BANTLY, MOORE, PARMACEK & MOHLER, 2007; HOETZER, VAN GUILDER, IRMIGER, KEITH, STAUFFER & DESOUZA, 2007; SHANTSILA & LIP, 2009).

Estudos mostram que a hipóxia é um dos mais importantes estímulos que iniciam a angiogênese muscular esquelética (PRIOR, YANG & TERJUNG, 2004). Na presença de hipóxia ocorre um marcante aumento na transcrição do fator induzido por hipóxia (HIF-1α) que por sua vez estimula a transcrição do VEGF. O desequilíbrio inicial da pressão parcial de O_2, pelo aumento do consumo do oxigênio, estimula a expressão VEGF e consequentemente a proliferação de células endoteliais e a formação de novos vasos sanguíneos. Se a pressão de O_2 volta aos níveis normais à estimulação das células endoteliais e do VEGF cessam (KUO, BENHAYON, PRZYBYLSKI, MARTIN & LAMANNA, 1999). Estudos acrescentam que o exercício realizado em condições exacerbadas de hipóxia, não promove aumento adicional do VEGF se comparado com o exercício realizado em normóxia, ou seja, em condições normais de utilização de oxigênio (GUSTAFSSON, PUNTSCHART, KAIJSER, JANSSON & SUNDBERG; 1999).

Posteriormente, a hipóxia gerada na musculatura esquelética pelo TF aeróbio foi descrita ser um dos mais potentes estímulos fisiológicos conhecidos por desencadear o aumento do número de CPE circulantes mediada pela síntese de fatores de crescimento, principalmente de VEGF (ADAMS, LENK, LINKE, LENZ, ERBS, SANDRI, TARNOK, GIELEN, EMMRICH, SCHULER & HAMBRECHT, 2004). A hipóxia altera o endotélio microvascular causando a mobilização de CPE para estas regiões. A adesão dessas são significativamente elevadas no endotélio nesta condição e a exposição das CPE nesses sítios gera a proliferação e a organização de *clusters* celulares, os quais se alinham em direção ao gradiente isquêmico e formam cordões como vasos. Dessa forma, tanto o aumento do VO_2 máximo como do fluxo sanguíneo induzido pelo TF aeróbio são capazes de gerar maior hipóxia e estresse de cisalhamento, respectivamente, conduzindo ambos para uma elevada produção de VEGF e NO, os quais vêm sendo intitulados como os principais

responsáveis pela atividade migratória, adesão e incorporação de CPE na microcirculação, promovendo o reparo e a formação de novos vasos (WAHL, BLOCK & SHMIDT, 2007) (FIGURA 8).

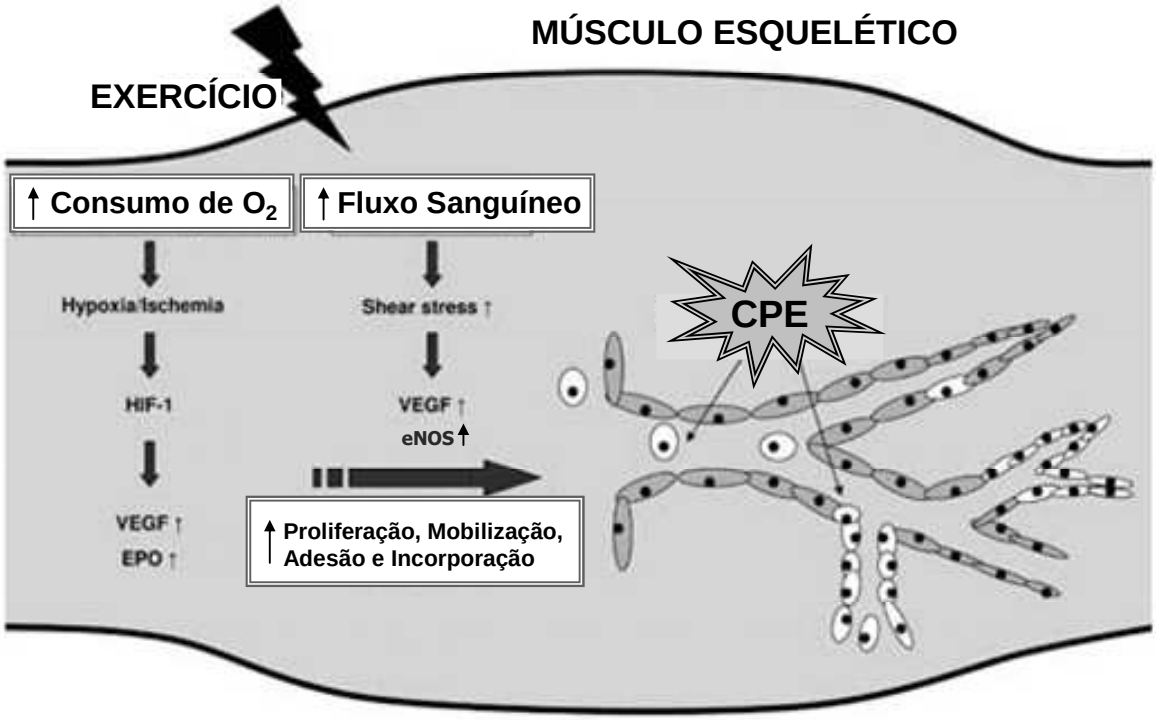


FIGURA 8 – Efeito do TF aeróbio sobre as CPE. HIF-1α: fator induzido por hipóxia, VEGF: fator de crescimento vascular endotelial, EPO: eritropoitina, eNOS: óxido nítrico sintase endotelial, CPE: células progenitoras endoteliais.

Além disso, STEINER, NIESSNER, ZIEGLER, RICHTER, SEIDINGER, PLEINER, PENKA, WOLZT, HUBER, WOJTA, MINAR & KOPP (2005) investigaram pacientes com doença arterial coronariana e com fatores de risco cardiovascular e observaram, depois de 12 semanas de treinamento aeróbio, um aumento no número de CPE e que estava correlacionado com o aumento de NO. LAUFS, WERNER, LINK, ENDRES, WASSMANN, JURGENS, MICHE, BOHM & NICKENIG (2004) mostraram que o TF é capaz de influenciar no número de CPE, em que camundongos treinados comparados aos sedentários apresentaram um significante aumento de CPE na circulação e na medula óssea a partir do 7º dia de treinamento,

sendo mantido por mais de um mês de atividade continuada. Os pesquisadores também mostraram que camundongos tratados com bloqueador da NO sintase e *knockout* para este gene tiveram estes aumentos bloqueados, indicando o importante papel do NO na mobilização de CPE (AICHER, HEESCHEN, MILDNER-RIHM, URBICH, IHLING, TECHNAU-IHLING, ZEIHER & DIMMELER, 2003), e um aumento NO dependente da CPE na resposta ao exercício (LAUFS, WERNER, LINK, ENDRES, WASSMANN, JURGENS, MICHE, BOHM & NICKENIG, 2004).

Não obstante, ADAMS, LENK, LINKE, LENZ, ERBS, SANDRI, TARNOK, GIELEN, EMMRICH, SCHULER & HAMBRECHT (2004) observaram que pacientes com isquemia do miocárdio apresentavam aumento de CPE dentro de 24-48hs após exercício máximo. Os aumentos encontrados no número de CPE foram também relacionados com uma maior concentração de VEGF no plasma. Como bem documentado anteriormente, estudos mostram que o VEGF ativa a via PI3K/AKT, sendo agora também descrito como um significante mecanismo responsável para mobilização de CPE da medula óssea para o sangue periférico (DIMMELER, AICHER, VASA, MILDNER-RIHM, ADLER, TIEMANN, RÜTTEN, FICHTLSCHERER, MARTIN & ZEIHER, 2001; MILLER-KASPRZAK & JAGODZINSKI, 2007).

A cinética das CPE considera também a intensidade do exercício realizado. Assim, o TF vigoroso em indivíduos saudáveis estava associado com a liberação na circulação de potentes fatores angiogênicos como o VEGF e substancial aumento tempo dependente de CPE na circulação (MOBIUS-WINKLER, HILBERG, MENZEL, GOLLA, BURMAN, SCHULER & ADAMS, 2009). Além disso, outro estudo demonstrou que pacientes com infarto agudo do miocárdio que realizaram o programa de reabilitação cardíaca com carga mais intensa foi associado com um nível mais acentuado de CPE, as quais se correlacionaram significantemente com o VO_2 máx (IKEDA, YASU, KUBO, NAKAMURA, SUGAWARA & UEDA, 2008).

4.5 Células Progenitoras Endoteliais e Fatores de Risco Cardiovascular

Nas últimas décadas tem sido mostrado que a disfunção endotelial e a rarefação microvascular estão associadas com o desenvolvimento de DCV. Idade, HA, diabetes mellitus, hiperlipidemia, fumo e obesidade são reconhecidos como fatores de risco cardiovascular que induzem resposta inflamatória nas células

endoteliais, promovendo apoptose e perda da integridade endotelial. É bem conhecido que os fatores de risco influenciam consideravelmente o número e a função das CPE. HILL, ZALOS, HALCOX, SCHENKE, WACLAWIW, QUYYUMI & FINKEL (2003) reportaram uma forte correlação inversa entre os níveis de CPE circulantes e a quantidade de fatores de risco para DCV em indivíduos saudáveis. Os autores encontraram que a função das CPE, medida através do ensaio de unidades formadoras de colônia, estava alterada em voluntários com presença de fatores de risco cardiovascular comparado com os que não apresentavam fatores de risco.

VASA, FICHTLSCHERER, AICHER, ADLER, URBICH, MARTIN, ZEIHER & DIMMELER (2001) mostrou que pacientes com doença da artéria coronária, o número de CPE e sua capacidade migratória estavam alteradas. O número de células $CD34^{+}/VEGFR2^{+}$ do sangue periférico avaliadas por citometria de fluxo foram encontradas 48% reduzidas em doentes comparados aos controles saudáveis. Em analogia, a identificação de CPE por meio de anticorpos com dupla marcação positiva para lectina e DiLDL também estavam 40% reduzidas em pacientes com doença da artéria coronária. A redução dos níveis de CPE e da capacidade migratória apresentam correlação inversa com o número de fatores de risco para DCV.

Um importante estudo de WERNER, KOSIOL, SCHIEGL, AHLERS, WALENTA, LINK, BOHM & NICKENIG, publicado pela *The New England Journal of Medicine* em 2005, mostra a relação entre os níveis de CPE e a ocorrência de eventos vasculares em pacientes com doença da artéria coronária. Os resultados obtidos no estudo claramente indicam que o aumento do número de CPE CD34+/VEGFR2+ e de função das CPE pela análise de unidades formadoras de colônia foram acompanhados por uma diminuição do risco de morte de causa cardiovascular, de hospitalização e de ocorrência de um primeiro evento cardiovascular em maiores proporções. Estes achados demonstraram que a redução do número de CPE é um preditor independente de morbidade e mortalidade por DCV, sugerindo que a regulação do número e função das CPE influenciam diretamente na manutenção e no desenvolvimento de DCV.

Em complemento, as CPE circulantes colhidas de pacientes com múltiplos fatores de risco apresentavam alta taxa de envelhecimento *in vitro* quando

comparadas às daqueles com poucos fatores de risco (HILL, ZALOS, HALCOX, SCHENKE, WACLAWIW, QUYYUMI & FINKEL, 2003; WERNER, KOSIOL, SCHIEGL, AHLERS, WALENTA, LINK, BOHM & NICKENIG, 2005). Uma hipótese que explicaria tais achados é que pacientes expostos a lesão endotelial contínua pelos fatores de risco teriam exaurido depósitos presumidamente limitados de CPE localizadas na medula óssea (HILL, ZALOS, HALCOX, SCHENKE, WACLAWIW, QUYYUMI & FINKEL, 2003). Essa hipótese é mostrada pela observação de que CPE colhidas de camundongos *Knockout* para o gene da eritropoitina ($ApoE^{-/-}$) ou $eNOS^{-/-}$ estão reduzidas em número e habilidade em participar no reparo vascular (RAUSCHER, GOLDSCHMIDT-CLERMONT, DAVIS, WANG, GREGG, RAMASWAMI, PIPPEN, ANNEX, DONG & TAYLOR, 2003; AICHER, HEESCHEN, MILDNER-RIHM, URBICH, IHLING, TECHNAU-IHLING, ZEIHER & DIMMELER, 2003). Em pacientes sem DCV, correlação inversa também existe entre idade e número de CPE na circulação periférica (HILL, ZALOS, HALCOX, SCHENKE, WACLAWIW, QUYYUMI & FINKEL, 2003). Tal achado sugere que número diminuído de CPE pode explicar, em parte, o aumento significativo de mortalidade cardiovascular observado com o aumento da idade.

Resultado similar foi encontrado num modelo de isquemia em camundongos imunodeficientes (*nude mice*) em que demonstraram que CPE colhidas de indivíduos com insuficiência cardíaca, conhecidos por apresentarem um ambiente de inflamação crônica e diminuição de NO, eram menos capazes de aderir ao vaso no membro isquêmico de camundongos, além de possuírem menor capacidade migratória (HEESCHEN, LEHMANN, HONOLD, ASSMUS, AICHER, WALTER, MARTIN, ZEIHER & DIMMELER, 2004).

Portanto, o desequilíbrio entre o processo de dano e reparo vascular promove a progressão de DCV. Um possível mecanismo pelo qual os fatores de risco cardiovascular causam o início, a manutenção e a progressão dessas doenças estão na bioatividade das CPE (UMEMURA & HIGASHI, 2008) (FIGURA 9). Estudos adicionais demonstraram que a transfusão sistêmica ou a mobilização intrínseca de CPE aceleram a restauração do endotélio lesado, resultando no menor espessamento da camada neo-intimal, recuperando a integridade vascular em indivíduos com DCV (WALTER, ZEIHER & DIMMELER, 2004).

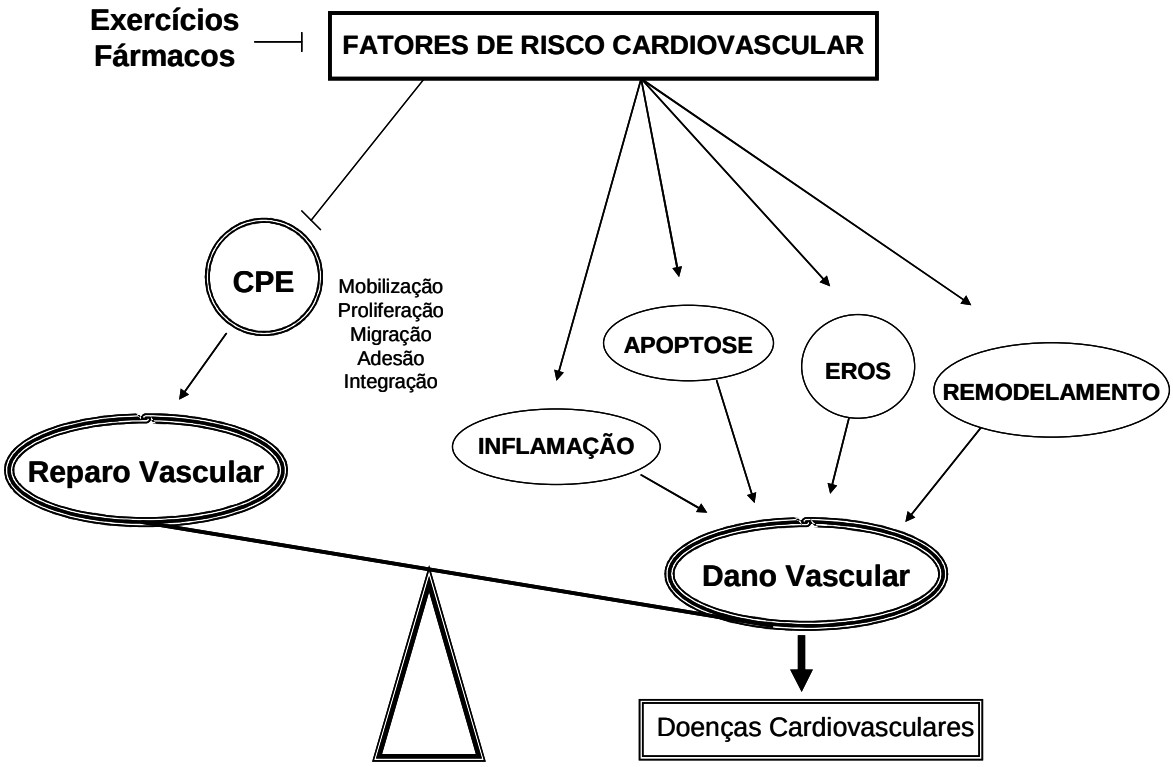


FIGURA 9 – Balanço entre o reparo e o dano vascular. Fatores de risco cardiovascular causam doenças cardiovasculares mediante prejuízo na bioatividade das CPE. CPE: células progenitoras endoteliais; EROS: espécies reativas de oxigênio.

4.6 Células Progenitoras Endoteliais e Hipertensão Arterial: Papel do Treinamento Físico

O exercício físico regular tem sido bem reconhecido como um fator essencial para promoção de benefícios vascular e tem se tornado, portanto, uma parte importante de um estilo de vida saudável e de programas de reabilitação cardiovascular (SHANTSILA & LIP, 2009).

Estudos recentes mostram que vários fatores de risco para doenças cardiovasculares, afetam negativamente o número e a atividade funcional das CPE, tanto em voluntários saudáveis quanto em pacientes com DCV. Entretanto, certas intervenções, tais como, a prática de exercício físico ou uso de terapia farmacológica podem melhorar a função endotelial e as características das CPE (UMEMURA &

HIGASHI, 2008). Evidências recentes sugerem que as CPE circulantes provenientes da medula óssea desempenham função regeneradora importante no endotélio vascular sob essas intervenções. Essa regeneração pode ocorrer pela secreção de fatores angiogênicos ou talvez pela incorporação direta de tais células na parede vascular, limitando assim a progressão da doença.

Através da análise holística dos diversos fatores de risco, a HA aparece como a principal causa do prejuízo migratório das CPE para a circulação (VASA, FICHTLSCHERER, AICHER, ADLER, URBICH, MARTIN, ZEIHER & DIMMELER, 2001). De fato, estes pesquisadores foram os primeiros a demonstrar que a função das CPE estava reduzida na circulação de pacientes com HA, provavelmente repercutindo no desenvolvimento da rarefação vascular associado à HA.

Posteriormente, os estudos de IMANISHI e colaboradores (IMANISHI, KOBAYASHI, HANO & NISHIO, 2005a; IMANISHI, MORIWAKI, HANO & NISHIO, 2005b) foram também os primeiros a relatarem que além da diminuição das CPE na medula óssea, existe um acelerado processo de envelhecimento destas células progenitoras tanto em SHR quanto em pacientes hipertensos, no qual podem ser analisados pela diminuição da atividade da telomerase e pelo aumento da atividade da β-galactosidase. Portanto é concebível que situações clínicas não favoráveis possam ser associadas com disfunção das CPE derivadas da medula óssea, defeituosa vasculogênese, e, portanto, prejuízo na neovascularização.

De fato, TEPPER, GALIANO, CAPLA, KALKA, GAGNE, JACOBOWITZ, LEVINE & GURTNER (2002) reportam que a proliferação e a formação de tubos como vasos das CPE foram diminuídas em pacientes com diabetes tipo 2 comparada com sujeitos normais. Além disso, estudos em modelos de ratos geneticamente hipertensos e pacientes com HA demonstram que os números e a capacidade funcional das CPE estavam também diminuídos e que drogas anti-hipertensivas têm sido associadas com a reversão da função endotelial e rarefação microvascular decorrentes da HA, em sinergia com a correção da disfunção das CPE (LOOMANS, DAO, VAN ZOMMEVELD & RABELINK, 2004; VAN ZONNEVELD & RABELINK, 2006).

Assim, estudos também mostram que o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, especialmente devido ao aumento do sistema renina angiotensina na HA, é

responsável pela diminuição da vasodilatação endotélio-dependente nestes pacientes, provavelmente mediada pela redução da biodisponibilidade de NO nesse processo, consequentemente conduzindo a uma redução na mobilização de CPE da medula óssea para circulação (AICHER, ZEIHER & DIMMELER, 2005; YU, FUKUDA, YAO, MATSUMOTO, KOBAYASHI, SUZUKI, TAHIRA, UENO & MATSUMOTO, 2008). Interessantemente, sujeitos tratados com inibidores do sistema renina angiotensina apresentaram um aumento dos níveis de CPE, concomitante com aumentos dos níveis de NO (IMANISHI, HANO & NISHIO, 2005).

Ainda que especulativo, devido a poucos e recentes estudos relacionando exclusivamente a HA e as CPE, possivelmente a disfunção das CPE participa do estabelecimento da HA (LOOMANS, DAO, VAN ZOMMEVELD & RABELINK, 2004; VAN ZONNEVELD & RABELINK, 2006).

Embora os efeitos do TF aeróbio pareçam estar bem estabelecidos na cinética das CPE, nenhum estudo até o momento reporta os efeitos deste treinamento em modelos animais e humanos com HA. Assim, espera-se que o TF aeróbio seja capaz de reverter esta diminuição de CPE medulares e circulantes, melhorando as propriedades funcionais e culminando num processo de revascularização necessário para a HA que apresenta quadros de disfunção endotelial e rarefação microvascular cardíaca e muscular esquelética.

É interessante destacar que estudo recente realizado em nosso laboratório mostra que realmente o TF aeróbio de natação foi capaz de aumentar o número de CPE na medula óssea e aumentar a razão capilar/fibra no músculo esquelético sóleo de ratas Wistar saudáveis (FERNANDES, 2006). O que condiz com uma maior proliferação e mobilização de CPE medulares induzidas pelo treinamento e pode estar relacionado com a formação de novos capilares, sendo esta adaptação essencial para um indivíduo treinado que necessita de maior oferta de substratos energéticos e metabólitos para a musculatura exercitada.

Assim, seria pertinente pensar que o TF aeróbio seria um forte candidato para o aumento do número e melhora da função das CPE e uma alternativa para reverter o acelerado envelhecimento das CPE na HA.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais Experimentais

Para realização do presente estudo foram utilizados 28 ratos machos espontaneamente hipertensos (SHR), com 12 semanas de vida com o quadro de HA já estabelecido e 28 ratos machos Wistar Kyoto (WKY), como controles do SHR. Os animais foram provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Os ratos estavam pesando entre 240 e 270 g no início do protocolo.

Os animais utilizados neste estudo foram mantidos em gaiolas plásticas em grupos de 3 ou 4 animais por caixa e separados por grupo experimental. A temperatura ambiente do biotério foi mantida entre 22º- 24ºC com luz controlada em ciclo invertido de claro-escuro de 12 em 12 horas. Água e comida foram administradas *ad libitum*.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, sendo este projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (EEFE-USP) (n°2007/35).

5.2 Identificação dos Animais

Para a realização deste projeto de pesquisa os animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos com quatorze animais em cada grupo, conforme o protocolo experimental:

- ratos Wistar-Kyoto (WKY);
- ratos Wistar-Kyoto treinado (WKY-T);
- ratos espontaneamente hipertensos (SHR);
- ratos espontaneamente hipertensos treinado (SHR-T).

Os ratos foram inicialmente identificados por números, pesados e adaptados ao protocolo de medida da PA e o VO_2. Foram utilizados dois lotes de animais conforme subdivisão acima.

5.3 Protocolo de Treinamento Físico Aeróbio

O TF de natação foi realizado segundo protocolo de MEDEIROS, OLIVEIRA, GIONOLLA, CASARINI, NEGRÃO & BRUM (2004). Os animais foram treinados durante 10 semanas, sessões de 60 min, 1 vez ao dia, 5 vezes por semana, com aumento gradual da sobrecarga de trabalho (peso na cauda em porcentagem do peso corporal) até atingir 4 % do peso corporal (TABELA 3).

TABELA 3 – Visão esquemática do protocolo de treinamento físico de natação para ratos. PC: peso corporal.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	semanas
0	2 3 4	4	4	4	4	4	4	4	4	Carga (%PC)
30 40 50 60	40 50 60	60	60	60	60	60	60	60	60	Tempo (min)

O protocolo utilizado foi caracterizado como treinamento de baixa a moderada intensidade e longa duração, sendo efetivo na promoção de adaptações cardiovasculares e no aumento da capacidade oxidativa muscular. Os ratos foram identificados e pesados semanalmente, para a correção da sobrecarga de treinamento em função do aumento do peso corporal. O treinamento foi realizado em um sistema de natação específico para ratos, com água aquecida a 30-32º C (FIGURA 10).

FIGURA 10 – Aparato de treinamento físico de natação para ratos.

Pré e pós o período de TF os animais foram submetidos a análises hemodinâmicas, ao teste de tolerância ao esforço físico máximo e a medidas do VO_2 máximo; e posteriormente foram mortos por anestesia com injeção intraperitoneal de pentobarbital de sódio (50 mg/Kg), e as amostras necessárias foram coletadas e armazenadas adequadamente para análises histológicas, bioquímicas, celulares e moleculares.

5.4 Avaliação das Respostas Hemodinâmicas

A PA foi realizada pré e pós período de TF por pletismografia de cauda (sistema da KENT SCIENTIFIC RTBP1001 para ratos e camundongos, Litchfield, USA), nos 4 grupos de animais. Os animais estavam acordados, em repouso e mantidos sob restrição de movimentos para que as medidas fossem realizadas. Para evitar erros de medida e análise, os ratos foram submetidos a um período de uma semana de ambientação com a técnica de medida.

O equipamento de registro da PA de cauda consiste em um manguito de borracha que é adaptado a região proximal da cauda, que está ligado ao pletismógrafo para insuflar e desinsuflar gradualmente o manguito de 1 a 250/300 mmHg. Numa região mais distal da cauda é acoplado um transdutor de pulso pneumático para detecção dos sinais de passagem da onda de pulso de PA na artéria caudal e registrado no sistema de aquisição de sinais.

Este método de medida indireta da PA permite quantificar a PA e a freqüência cardíaca ao longo de todo o período do protocolo.

5.5 Avaliação da Tolerância ao Esforço Físico Máximo

Para realização do protocolo de avaliação do esforço físico máximo, os animais dos 4 grupos - WKY, WKY-T, SHR e SHR-T foram posicionados individualmente sobre a esteira rolante. Imediatamente após o posicionamento do animal foi iniciado o teste de esforço. A velocidade inicial foi de 6m/min (sem inclinação), que constitui em um protocolo escalonado com incrementos de velocidade de 3m/min a cada 3 min, até que fosse atingida a velocidade máxima suportada pelos animais. O critério para a determinação da exaustão do animal e

interrupção do teste foi o momento em que o rato não foi mais capaz de correr dentro da caixa metabólica mediante o incremento de velocidade da esteira.

Esta avaliação foi feita pré e pós o período de treinamento, para comparar a resposta de desempenho do animal entre os grupos. Embora o teste em esteira não seja específico ao treinamento físico realizado no presente estudo, utilizamos esse teste para auxiliar na verificação da eficácia do treinamento físico como predição de uma melhora na capacidade de realização de esforço. Foram comparados o tempo (min), a velocidade (m/min) e a distância (m) percorrida por cada rato.

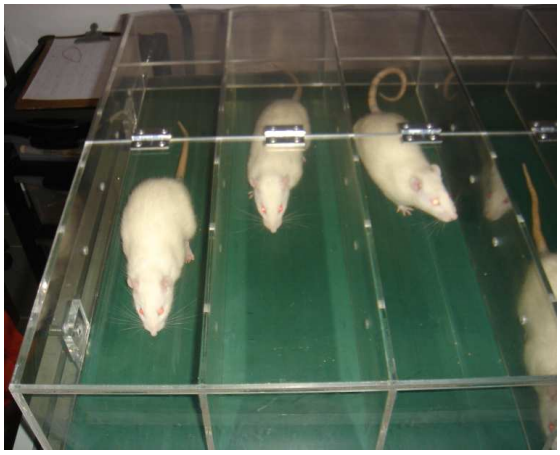


FIGURA 11 – Sistema em esteira rolante para avaliação do esforço físico máximo.

5.6 Avaliação do Consumo Máximo de Oxigênio.

Após a semana de adaptação à caixa metabólica, os ratos foram submetidos a um teste progressivo de esforço máximo em esteira rolante adaptado de BROOKS & WHITE (1978), com incremento de carga de 3m/min a cada 3 min, até a exaustão, para a obtenção do VO_2 pico.

O consumo de oxigênio pico foi mensurado por determinação da fração expirada de oxigênio (FeO_2) durante o teste de exercício progressivo até exaustão.

Neste protocolo os ratos foram colocados numa caixa metabólica sobre a esteira rolante, que serviu como câmara de mistura dos gazes expirados. Esta câmara é conectada a um tubo na forma de “T”, para a retirada de amostras de ar (1.000 ml/min) para ser analisada a FeO_2 em um analisador de gazes. A outra via do

tubo em “T” é utilizada para a aspiração do ar em fluxo contínuo (2.500 ml/min), regulável por bomba aspiradora. A parte da frente da caixa metabólica possui uma abertura de 2 mm da superfície, que permite a entrada de ar ambiente unidirecional sugado pela bomba aspiradora. O fluxo de ar na caixa metabólica é de 3.500 ml/min.

O rato foi colocado dentro da caixa metabólica por um período de repouso de 30 minutos para o registro do estado basal e, em seguida, o teste foi iniciado com velocidade de 3 m/min. Durante cada estágio (3min) de exercício realizado, foram analisadas as FeO_2 dos gazes contidos no ar da caixa metabólica. Foram consideradas as frações expiradas dos trinta últimos segundos de cada estágio para a determinação do VO_2 pico de cada estágio.

Ao atingir a exaustão o rato foi mantido na caixa metabólica por aproximadamente 3 min e as frações expiradas foram registradas para verificar a recuperação do animal e o funcionamento dos analisadores.

O VO_2 foi calculado através da seguinte fórmula matemática:

$$VO_2 = \text{fluxo de ar X } (FiO_2 - FeO_2) / \text{ peso corporal}$$

Onde:

VO_2 = $ml.Kg^{-1}.min^{-1}$

Fluxo de ar = 1000 ml/min (analisador) + 2500 ml/min (bomba de aspiração) = 3500 ml/min.

FiO_2 = fração de oxigênio inspirada (ar ambiente).

FeO_2 = fração de oxigênio expirada (caixa de mistura).

Peso corporal = Kg.

Para a análise dos dados foi utilizado o maior valor do VO_2.

5.7 Avaliação Histoquímica do Músculo Esquelético.

Vinte quatro horas após a última sessão de treino os animais foram mortos como já descrito anteriormente e o músculo esquelético sóleo foi dissecado e extraído cuidadosamente e fixado em uma massa de montagem à base de *tissue tek* (para manter o tecido na posição correta pré-congelamento) pela região tendinosa (FIGURA 12).

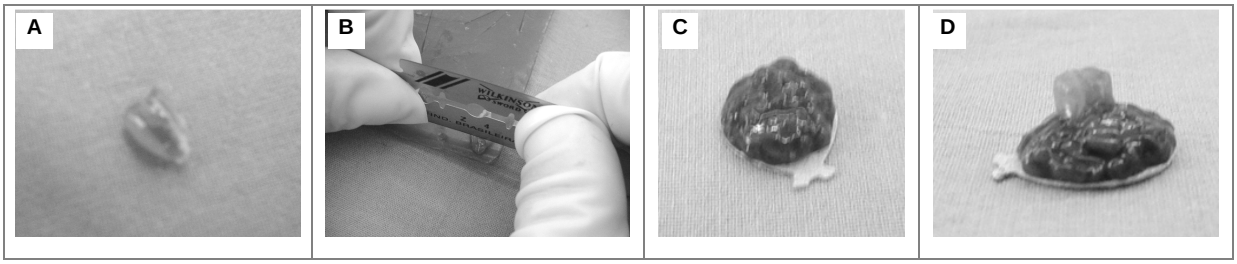


FIGURA 12 – Extração do tecido muscular esquelético. (A) Retirada do músculo sóleo. (B) Corte transversal com lâmina nova sobre base rígida. (C) Massa de montagem à base de *tissue tek* sobre a placa onde foi identificada a amostra. (D) O tecido sobre a massa de montagem que serviu como apoio para a permanência na posição correta pré congelamento.

Posteriormente à fixação na massa de montagem à base de *tissue tek*, o sóleo foi mergulhado em isopentano (crioprotetor que evita artefatos nas amostras) e em seguida em nitrogênio líquido para o congelamento, onde foram mantidos até que os cortes fossem realizados (FIGURA 13).

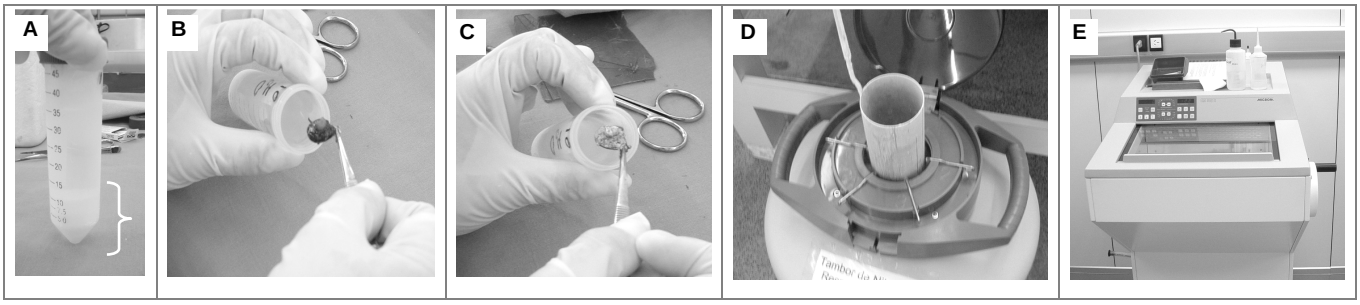


FIGURA 13 – Congelamento e cortes do tecido. (A) Isopentano refrigerado em nitrogênio líquido. Quando o isopentano fica com a base congelada é o ponto ótimo para imersão do tecido. (B) Tecido é introduzido no isopentano durante 10 segundos (C) e posteriormente transferido para tubo de 50 ml contendo nitrogênio líquido. (D) Conservação em nitrogênio líquido a aproximadamente -196ºC (E) Criostato Mícron HM505E (Zeiss, Walldorf, Germany), onde foram realizados os cortes do tecido.

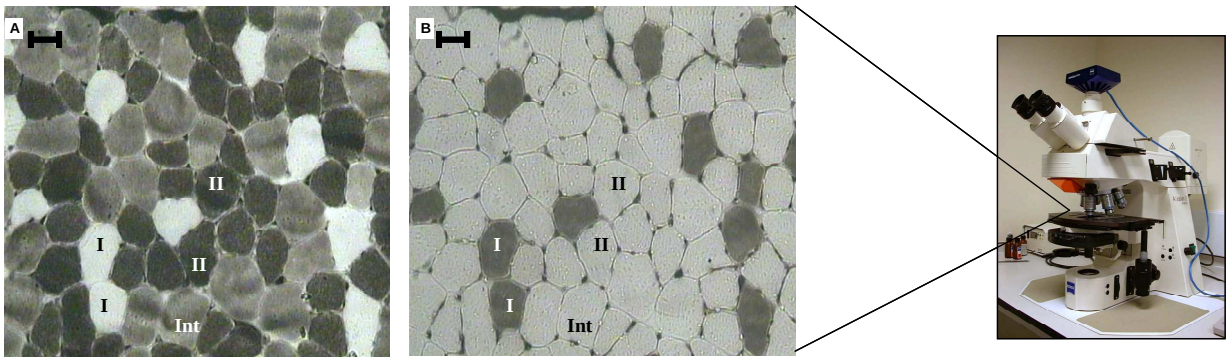
Após a obtenção dos cortes de 10 µm foram realizadas reações adaptadas de BROOKE & KAISER (1970), que permitiram a avaliação da atividade

da enzima miosina ATPase por meio de soluções com diferentes pHs (4,3 e 10,3), com o intuito de realizar a tipagem das fibras.

5.7.1 Determinação da Área de Secção Transversa e Tipos de Fibras Musculares

A captura das imagens foi realizada com amplificação de 200x em objetiva de 20x. A aquisição das imagens foi processada em computador acoplado a um sistema de vídeo por meio de um programa de imagens (Image-Pro Plus; Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Foram analisados 10 campos de cada corte histológico, na tentativa de avaliar o tecido por inteiro. Foi calculada a área de secção transversa por cada tipo de fibra muscular em µm².

Para a identificação dos tipos de fibras pela técnica ATPase miosínica em pH 10,3 (alcalino) (FIGURA 14A), as fibras escuras foram caracterizadas de tipo II, as claras de tipo I e cinza as intermediárias. Já no pH 4,3 (ácido) (FIGURA 14B), as fibras escuras são do tipo I, as claras do tipo II e as cinzas do tipo intermediárias.



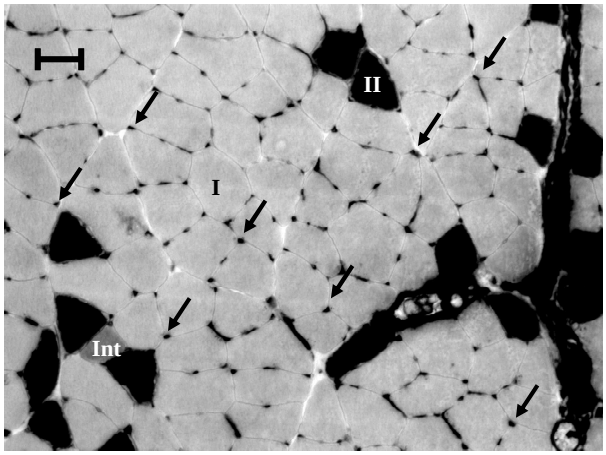
pH 10.3 pH 4.6

FIGURA 14 – Análise microscópica do corte histológico do músculo plantáris em diferentes pHs: 10,3 (A) e 4,3 (B) de um rato controle. Barra: 30 µm.

5.7.2 Análise da Razão Capilar por Fibra

A razão capilar por fibra do músculo sóleo foi avaliada por meio da reação histoquímica para miosina ATPase no pH 10,3, como descrito anteriormente (SILLAU & BANCHERO, 1977) e quantificada pela análise de 10 campos não sobrepostos, com uma amplificação de 200x, distribuídos de uma maneira randômica usando um

sistema computacional morfométrico (Leica Quantimet 500, Cambridge, UK) (FIGURA 15). Para calcular a razão capilar por fibra, o número total de capilares foi dividido pelo número total de fibras contabilizadas no mesmo campo. Somente vasos com um diâmetro menor que 12 µm foram contabilizados.



200x

FIGURA 15 – Análise microscópica da capilarização no músculo sóleo em rato controle, pH 10,3. As setas indicam os capilares. Barra: 30 µm.

5.8 Avaliação da Atividade da Enzima Citrato Sintase

O aumento da atividade das enzimas oxidativas presentes na mitocôndria é um indicativo da otimização do metabolismo aeróbio. A citrato sintase catalisa a primeira reação do ciclo de Krebs, onde ocorre a condensação do acetil coenzima A (acetil-CoA) com o oxaloacetato para formar citrato e coenzima A (CoA).

Para avaliar a atividade da citrato sintase o músculo sóleo foi homogeneizado a 4℃ em tampão de extração (pH 7,4) contendo Tris-base (50 mM) e EDTA (1 mM). As amostras foram centrifugadas a 3.000 g durante 15 minutos a 4℃ e o sobrenadante foi utilizado para a realização da cinética enzimática. A quantificação da proteína no homogenato foi realizada segundo o método de BRADFORD, (1976).

A atividade máxima da enzima foi determinada segundo ALP & NEWSHOLME (1976) (ALP, NEWSHOLME & ZAMMIT, 1976) a partir de quantificação do complexo formado entre a coenzima A com o ácido 5,5´ditio-bis 2 nitrobenzóico (DTNB), adicionado ao meio, formando um complexo amarelo. O

tampão de ensaio consistiu de Tris-base (100 mM), DTNB (0,4 mM), acetil-CoA (1,24 mM), Triton X-100 1% (v/v) e o homogeneizado. A reação foi iniciada pela adição de oxaloacetato (18,9 mM) ao meio e o registro da cinética enzimática foi realizada a 25℃ durante um intervalo de 10 minutos, em 412 nm com o uso do Victor (Victor3 1420 Multilabel Counter/ PerkinElmer, MA, USA). O resultado da atividade da enzima foi expresso em valores de $nmol.min^{-1}.mg\ proteína^{-1}$.

5.9 Extração das Células Mononucleadas da Medula Óssea

Após o período de treinamento e morte dos animais conforme já descrito as células da medula óssea (MO) foram obtidas do fêmur e tíbia dos 4 grupos de animais. Após tricotomia dos membros inferiores, foi realizada uma incisão para a visualização da articulação coxo-femural. Após ruptura dos ligamentos e divulsão para a retirada do tecido muscular adjacente, o fêmur foi imerso em tubo *falcon* contendo PBS (*phosphate-buffered saline*) e penicilina G (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). O mesmo procedimento foi repetido para a retirada da tíbia.

Sob condições estéreis, a MO foi extraída do osso através da lavagem da cavidade com meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Médium* (DMEM, Gibco, NY, USA) através de seringa e agulha. Após sucessivas lavagens e homogeneização do meio contendo células, foi feito um gradiente de separação com Ficoll (Ficoll-Paque, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) para separação da porção de células mononucleadas (CMN). O material foi centrifugado por 25 minutos a 2.000 rpm (± 23ºC) para a separação das células. Depois de separadas as células foram lavadas com PBS e novamente submetidas à centrifugação por 5 minutos a 1.000 rpm, e em seguida ressuspendidas em pequeno volume de PBS 1X para posterior contagem. Em seguida, foram encaminhadas para análise de número, senescência e ensaios funcionais, conforme metodologias descritas posteriormente (FIGURA 16).

5.10 Extração das Células Mononucleadas do Sangue Periférico

Concomitante a retirada dos fêmures e tíbias para separação das CMN da medula óssea, foram retirados 10 ml de sangue periférico (SP) de cada animal para separação da porção de CMN circulantes. Com uma seringa estéril usando um anti-

coagulante (heparina sódica), os 10 ml de sangue foram coletados via veia cava inferior.

Após coleta, o sangue foi transferido para um tubo tipo *falcon* de 50 ml em que foi adicionado um volume igual de PBS 1X, portanto 10 ml. Em seguida, adicionamos em um tubo tipo *falcon* novo, 15 ml de Ficoll e cuidadosamente depositamos o SP diluído para que fosse realizado um gradiente de separação por densidade para obtenção da porção de CMN circulantes. O material foi centrifugado por 25 minutos a 2.000 rpm (± 23º C) para a separação das células. Depois de separadas as células foram lavadas com PBS 1X e novamente submetidas à centrifugação por 5 minutos a 1.000 rpm, e em seguida ressuspendidas em pequeno volume de PBS 1X para posterior contagem. Em seguida, destinadas a análise no citômetro de fluxo e ensaio funcional, conforme metodologias descritas posteriormente (FIGURA 16).

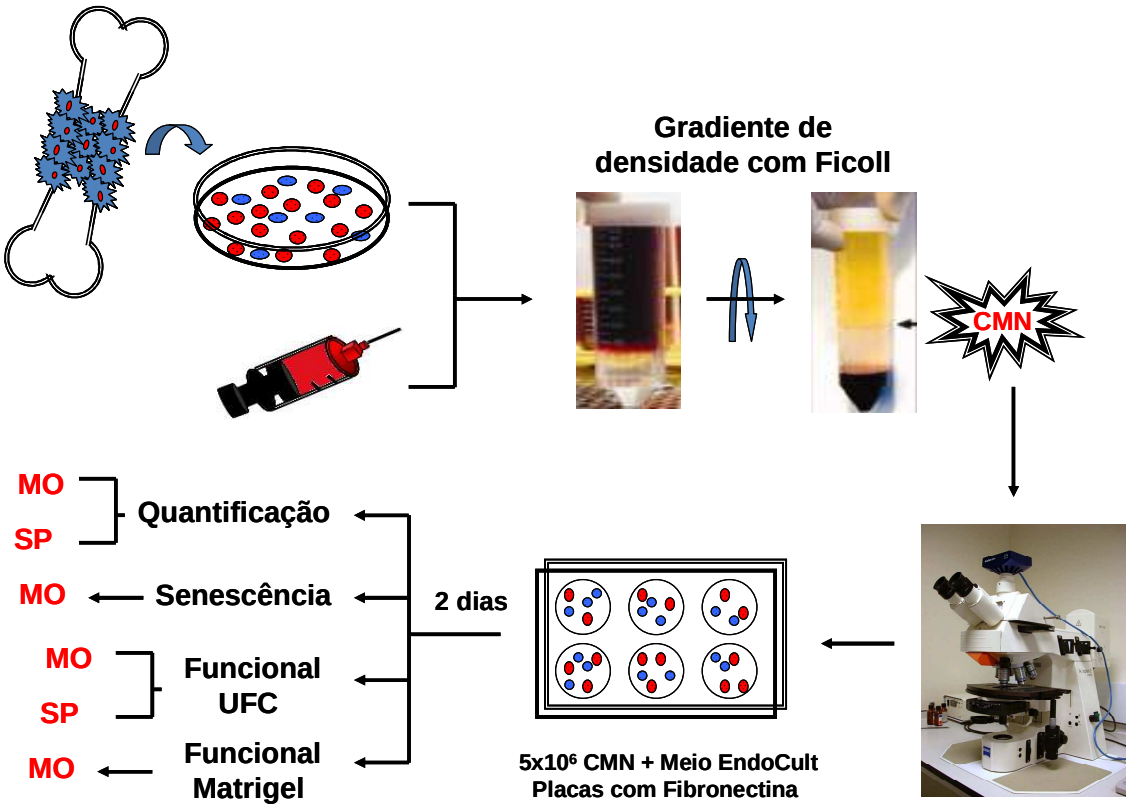


FIGURA 16 – Processo de extração e cultivo das células mononucleadas (CMN) da medula óssea (MO) e sangue periférico (SP).

5.11 Quantificação das Células Progenitoras Endoteliais da Medula Óssea

Após a obtenção das CMN derivadas da MO dos grupos WKY, WKY-T, SHR e SHR-T como descrito acima, foram cultivadas em cultura celular sendo plaqueadas aproximadamente $5x10^6$ de CMN, de cada grupo, em placas de cultura 6 poços contendo fibronectina (BD BioCoat, CA, USA). As células foram cultivadas em meio endotelial basal (EndoCult Basal Medium, StemCell Technologies Inc, Vancouver, Canada) com suplementação (EndoCult Supplements, StemCell Technologies Inc, Vancouver, Canada), incubadas por 2 dias a 37ºC, 5% de CO_2 com 95% de umidade.

Após 2 dias de cultura, as células não aderentes contendo a população de CPE foram coletadas e plaqueadas novamente em placas de cultura 24 poços contendo fibronectina (BD BioCoat, CA, USA) com meio endotelial basal suplementado. As células aderidas na primeira placa continham células endoteliais maduras e alguns monócitos, as quais foram descartadas. Experimentalmente, o procedimento de pré plaqueamento alega evitar contaminação para a heterogeinidade das CPE cultivadas (SHI, RAFII, WU, WIJELATH, YU, ISHIDA, FUJIDA, KOTHARI, MOHLE, SAUVAGE, MOORE, STORB & HAMMOND, 1998; HILL, ZALOS, HALCOX, SCHENKE, WACLAWIW, QUYYUMI & FINKEL, 2003; URBICH & DIMMELER, 2004).

Após adesão das células, aproximadamente 4 horas, as mesmas foram lavadas com meio de cultura e as CPE foram identificadas pela incubação com 2,4 µg/mL de *1,1- dioctadecyl-3,3,3,3- tetramethylindocarbocyanine-labelled acetylated low-density lipoprotein* (Di-acLDL; Molecular Probes, OR, EUA, coloração vermelha) por 1 hora. Em seguida, as células foram fixadas em 2% de paraformaldeído e contracoradas com isotiocianato de flurescéína (FITC, coloração verde) conjugado a *Ulex europaeus aglutinina I* (lectina-FITC, 10 µg/mL, Sigma-Aldrich, MO, EUA). A coloração positiva para Di-acLDL e lectina-FITC foram caracterizadas como CPE (FIGURA 17). Dois investigadores analisaram o número de CPE por placa, pela contagem de 3 campos aleatórios em microscópio invertido para fluorescência (Zeiss, Oberkochen, Germany). Os resultados foram expressos em porcentagem da média do controle.

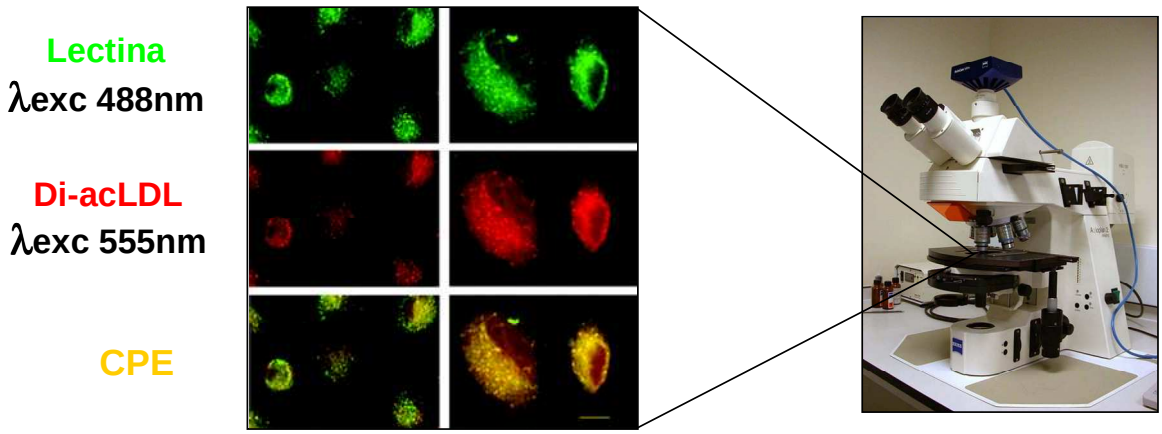


FIGURA 17 – Imagens representativas da marcação das CMN com anticorpos fluorescentes para Lectina-FITC (verde), Di-acLDL (vermelho) e a dupla marcação para identificação das CPE.

5.12 Avaliação da Senescência Celular Associada à Atividade da Enzima β-galactosidase (SA- β-gal).

A SA- β-gal foi medida, conforme descrito por DIMRI, LEE, BASILE, ACOSTA, SCOTT, ROSKELLEY, MEDRANO, LINSKENS, RUBEJ, PEREIRA-SMITH, PEACOCKE & CAMPISI (1995). Como demonstrado pelos autores, a SA- β-gal é uma enzima hidrolase que catalisa a hidrólise de β- galactosídios em monossacarídios somente em células senescentes. Dessa forma, sua utilização permanece como um biomarcador de células senescentes, devido à facilidade e confiabilidade *in situ* e *in vitro*. Concisamente, $1x10^6$ de CPE plaqueadas foram lavadas duas vezes em PBS, fixadas por 3 min (temperatura ambiente) em 2% de paraformaldeído, lavadas com PBS novamente e incubadas por 24h a 37ºC com a solução de coloração SA- β-gal [5-bromo-4-cloro-3 indyl *β-D-galactopylanoside* (X-Gal), 1mg/mL, ferrocianeto de potássio 5 mmol/L, ferricianeto de potássio 5 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, $MgCl_2$ 2 mmol/L, deoxicolato de sódio 0,01% e Nonidet-40 0,02%]. A análise citoquímica foi baseada na produção de coloração azul presente nas células senescentes que resulta da clivagem do substrado X-Gal. Após a coloração, as imagens foram visualizadas e capturadas com uma amplificação de 400x de maneira randomizada em um microscópio invertido acoplado com câmera (Nikon,

NY, EUA). O número total de células senescentes foram dividas pelo número total de células contadas no mesmo campo, sendo analisados em 5 campos. Os resultados foram expressos em porcentagem da média do controle.

5.13 Quantificação das Células Progenitoras Endoteliais no Sangue Periférico por Citometria de Fluxo

As CPE circulantes foram quantificadas em citometria de fluxo, em que foram submetidas à marcação com anticorpos de membrana específicos para identificação dessas células, com intuito de averiguar a quantidade de CPE mobilizadas para circulação. A porcentagem de CMN duplamente positivas para CD34+/Flk1+ foram determinadas por meio da análise de separação de célula ativada por fluorescência (FACS, Becton-Dickinson).

Concisamente, $1x10^6$ de CMN foram incubadas por 30 min a 4℃ no escuro com Flk1 conjugado com FITC (marcador de célula endotelial; BD Biosciences, NJ, EUA) e CD34 conjugado com PE (*Phycoerythrin*) (marcador de célula tronco; Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA). Os devidos controles isotípicos para cada um dos fluorocromos usados, FITC e PE, respectivamente (IgG, BD Biosciences, NJ, EUA) e da condição de células sem marcação foram utilizados para a padronização das fluorescências. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes e ressuspendidas em tampão composto por PBS e 2% FCS (*Fetal Calf Serum*) (FIGURA 18). Durante o processamento no citômetro de fluxo, há a passagem de células individualmente por uma câmara de fluxo que gera um fluxo laminar de células, onde incide um raio de luz (laser). A dispersão do mesmo e dos corantes fluorescentes emite luzes de freqüências variadas que são captadas por filtros e detectores fotomultiplicadores, os quais convertem a luz em pulsos eletrônicos e que são captados pelo software. A dispersão luminosa fornece os primeiros dados sobre a caracterização da amostra celular. Assim, os corantes fluorescentes permitem a identificação do fenótipo celular. Deste modo, o conjunto dessas informações permite a quantificação das células e análise da pureza celular. Os resultados das CMN CD34+/Flk1+ foram expressos como porcentagem.

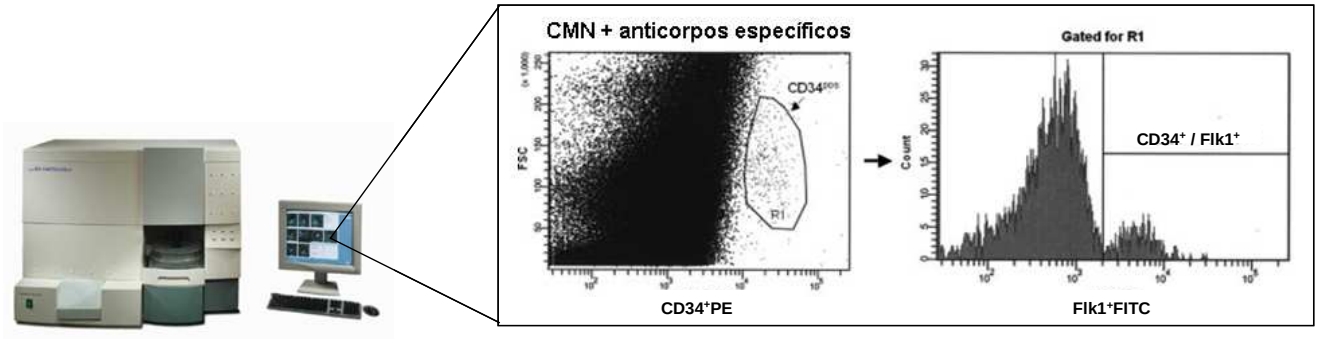


FIGURA 18 – Imagens representativas de FACS da marcação das CMN com anticorpos fluorescentes para CD34+PE, Flk1+FITC e a dupla marcação (CD34+/Flk1+) para quantificação das CPE.

5.14 Avaliação Funcional das Células Progenitoras Endoteliais por Formação de Unidade Formadora de Colônia.

As CPE possuem propriedades como a clonogenicidade, que é a capacidade de duplicação celular, demonstrando o potencial dessas células de formar colônias (HILL, ZALOS, HALCOX, SCHENKE, WACLAWIW, QUYYUMI & FINKEL, 2003). Dessa forma, o ensaio clonogênico representa uma tecnologia valiosa para a avaliação da atividade funcional das CPE. Esta técnica foi empregada nas CPE medulares e circulantes. Basicamente o ensaio clonogênico envolve três etapas: 1) a primeira etapa consiste na separação e quantificação das CMN, como já descrita anteriormente 2) a segunda etapa envolve a cultura celular dessas células em que foram então colocadas $5x10^6$ CMN em placas de cultura de 6 poços contendo fibronectina (BD BioCoat, CA, EUA). As células foram cultivadas em meio endotelial específico para análise de função destas células tronco (EndoCult-StemCell Technologies, Vancouver, Canada). Após 2 dias de incubação para seleção da população de CPE, as células não aderentes são novamente plaqueadas com meio específio EndoCult 3) Finalmente, após 3 dias de cultura, a terceira etapa inclui a contagem em microscópio invertido acoplado a câmera (Nikon, NY, EUA) do número de unidades formadoras de colônia (UFC), após 7 dias a 37º C, 5% de CO_2 com 95% de umidade. Os resultados foram expressos em porcentagem da média do controle de número de colônias formadas por $1x10^6$ de células plaquedas.

5.15 Avaliação Funcional das Células Progenitoras Endoteliais pela Formação de Tubos como Capilares.

O ensaio de formação de tubos como capilares sobre matrigel representa uma técnica importante para avaliar a função das CPE, particularmente seu potencial de diferenciação. A técnica foi realizada como previamente descrita (CHEN, ZHANG, LI, WANG, XU, GAUTAM, LU, ZHU & CHOPP, 2003). Sucintamente, placas de cultura de 96 poços foram cobertas com 100 µl de Matrigel (13 mg/ml, BD Biosciences, NJ, EUA), os quais foram solidificados por 30 min a 37º C. Posteriormente, $2x10^4$ de CPE foram plaqueadas sobre a superfície de matrigel com meio endotelial basal já suplementado (EndoCult, StemCell Technologies Inc, Vancouver, Canada) e cultivadas a 37ºC, 5% de CO_2 com 95% de umidade. As imagens dos poços com matrigel foram fotografadas com microscópio invertido acoplado a câmera (Nikon, NY, EUA) com amplificação de 200x, para análise qualitativa das CPE em forma de tubos como capilares. Foram analisados 3 campos aleatórios para cada animal. Cada ensaio foi realizado em duplicada.

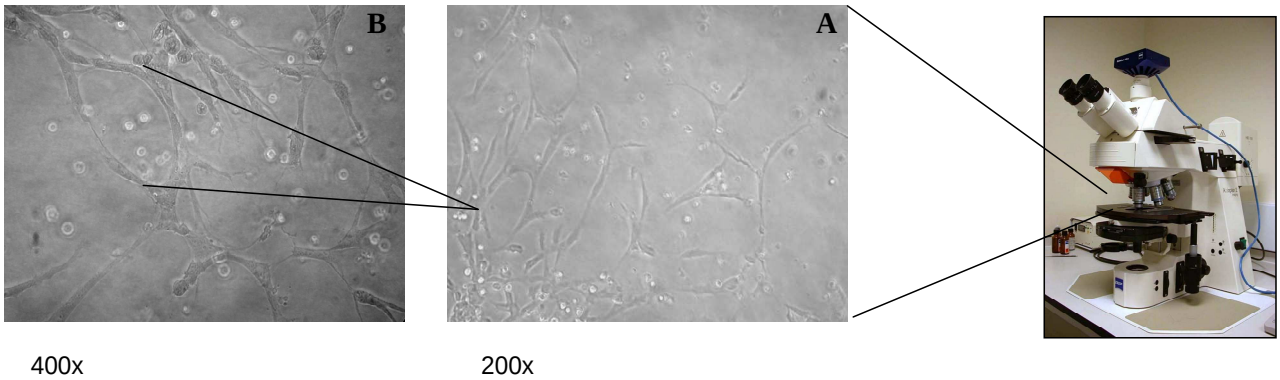


FIGURA 19 – Imagens representativas do ensaio funcional das CPE na formação de tubos como capilares sobre matrigel capturadas pelo microscópio invertido com amplificação de 200x (A) e 400x (B).

5.16 Concentração do Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF)

A concentração de VEGF no soro foi medida por um Kit de ELISA para ratos, disponível comercialmente, seguindo as instruções do fabricante (RayBiotech, GA, USA). Os resultados foram expressos em pg/ml.

5.17 Determinação da Expressão de Proteínas

O músculo sóleo foi homogeneizado em tampão de lise hipotônico contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), sacarose 0,3 M, DTT 0,5 mM, EDTA 1 mM (pH 8,0), PMSF 0,3 mM, NaF 10 mM e coquetel de inibidor de protease e fosfatase (1:100). O homogenato foi centrifugado por 10 minutos à 4℃ com 12.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para tubos de 1,5 ml e a concentração de proteína das amostras foram analisadas por meio do método de BRADFORD (1976). As amostras foram armazenadas em freezer -80ºC até o momento da utilização.

Alíquotas do homogeneizado, 30 µg de proteína foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl pH 6,8 240 mM; SDS 0,8%; β-mercaptoetanol 200 mM; Glicerol 40% e Azul de bromofenol 0,02 %). A análise dos níveis protéicos foi realizada pela técnica de *western blotting*. Para isso, foi utilizada a técnica de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE, 6 - 12%: dependendo do peso molecular da proteína), que consiste na migração de moléculas com carga, numa solução, decorrente da aplicação de um campo elétrico no aparelho para minigel (Mini Protean, BioRad, EUA). Posteriormente, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences, NJ, EUA), do mesmo modo que foram separadas no SDS-PAGE. As membranas foram coradas com *Ponceau S*, para a verificação das bandas protéicas obtidas pela eletroforese.

A fim de bloquear ligações inespecíficas, a membrana foi incubada em solução contendo caseína, proteína que compete com os sítios de ligação e reduz a absorção inespecífica de conjugados da peroxidase.

Em seguida, a membrana de nitrocelulose foi incubada com o anticorpo primário que se liga à proteína que se pretende detectar, formando um complexo anticorpo-proteína. Depois de lavar a membrana para remover o anticorpo não ligado, ela foi exposta ao anticorpo secundário conjugado a *horseadish* peroxidase (HRP), direcionado a porções espécies-específicas do anticorpo primário.

Foram utilizados como anticorpos primários o VEGF (Rabbit polyclonal, 1:1000, Santa Cruz, CA, EUA), VEGFR1 (Rabbit polyclonal, 1:1000, Santa Cruz, CA, EUA), VEGFR2 (Rabbit polyclonal, 1:1000, Santa Cruz, CA, EUA), eNOS (Rabbit polyclonal, 1:1000, Santa Cruz, CA, EUA), iNOS (Mouse polyclonal, 1:1000, Santa Cruz, CA, EUA), Bcl-x (Rabbit polyclonal, 1:1000, Cell Signaling Tech., MA, EUA),

Bcl-2 (Rabbit polyclonal, 1:1000, Cell Signaling Tech., MA, EUA), Bad (Rabbit polyclonal, 1:1000, Cell Signaling Tech., MA, EUA) e p-Bad_{ser112} (Rabbit polyclonal, 1:1000, Cell Signaling Tech., MA, EUA). Em seguida as mesmas foram lavadas 3x10 min com TBS-T, incubadas por 2 horas com os respectivos anticorpos secundários (IgG anti-rabbit, anti-rabbit, anti-rabbit, anti-rabbit, anti-mouse, anti-rabbit, anti-rabbit, anti-rabbit e anti-rabbit; Amersham Biosciences, NJ, EUA) conjugados à peroxidase. Posteriormente o complexo foi detectado mediante reação de quimiluminescência (ECL) e os blots foram visualizados e quantificados (número de *pixels*) pelo sistema *Scion Image*, fornecido gratuitamente pela NIH (EUA) via internet. O gliceroldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizado como normalizador.

5.18 Análise Estatística

Inicialmente a distribuição dos dados foi testada por meio do teste de *Shapiro-Wilk* e a homoscedasticidade por meio do teste de *Levene*. Como os dados são independentes, devem apresentar distribuição normal e variâncias homogêneas, os pressupostos para o alcance de análises paramétricas.

Os dados foram analisados utilizando a análise de variância ANOVA de duas vias (TF e HA como fatores independentes), para comparar os valores dos grupos e teste de *Tukey* como post-hoc (Statistica software, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EUA). Para análise de correlação entre as variáveis foi utilizada a análise de regressão linear. Foi adotado para todos os experimentos um $p < 0,05$ de significância. Todos os resultados foram apresentados na forma de média ± erro padrão da média (EPM).

6 RESULTADOS

A seguir descreveremos os resultados obtidos nesse estudo. Em um primeiro momento optamos por mostrar a caracterização fenotípica do SHR, implicado no estabelecimento do dano vascular, permeando alterações das CPE à microcirculação. Em seguida, mostraremos o efeito do TF como tratamento sobre a rarefação vascular associada à HA, particularmente sobre os níveis e as propriedades funcionais das CPE em SHR, e os possíveis mecanismos envolvidos.

6.1 Caracterização Fenotípica de Ratos Espontaneamente Hipertensos.

Uma vez que optamos pelo modelo de HA desenvolvido por SHR decidimos realizar, a priori, uma caracterização fenotípica do modelo, com intuito de averiguar se, de fato, os animais apresentavam as alterações de um hipertenso. Para isso, analisamos parâmetros hemodinâmicos, estruturais e metabólicos. Essa análise inicial é fundamental para termos a certeza de que os animais utilizados apresentavam às alterações clínicas inerentes a patologia para que em seguida pudéssemos utilizar o TF como tratamento não farmacológico como alternativa para correção desses parâmetros.

6.1.1 Alterações Hemodinâmicas e Estruturais de Ratos Espontaneamente Hipertensos.

A cepa de SHR desenvolvida por OKAMOTO & AOKI (1963) é um modelo de HA crônica, determinada geneticamente e com grandes semelhanças ao curso de desenvolvimento da hipertensão essencial humana, razão pela qual têm sido um modelo amplamente utilizado na avaliação da hipertensão essencial.

A FIGURA 20 ilustra uma elevada PAS, PAD e PAM (A) em animais SHR comparados aos controles WKY, acompanhada de rarefação capilar na musculatura esquelética (B) e mudanças na proporção dos tipos de fibra dessa musculatura com aumento na proporção de fibras tipo II com predomínio do metabolismo glicolítico (C); porém sem afetar a área de secção transversa muscular (D), a tolerância ao esforço (E) e o consumo de oxigênio pico (F).

Esses dados sugerem que similar ao que ocorre na HA essencial no homem, os SHR apresentam um aumento da PA. Este desajuste crônico no controle da PA somada a rarefação microvascular repercute num aumento da resistência vascular periférica, consequentemente na progressão e manutenção da HA (FEIHL, LIAUDET, WAEBER & LEVY, 2006). A rarefação microvascular é um dos primeiros sinais que promove o rearranjo nas proporções dos tipos de fibra, mudando proporcionalmente o metabolismo requerido para a região. Embora existam estas alterações morfofuncionais, não houve intolerância ao esforço e atrofia muscular.

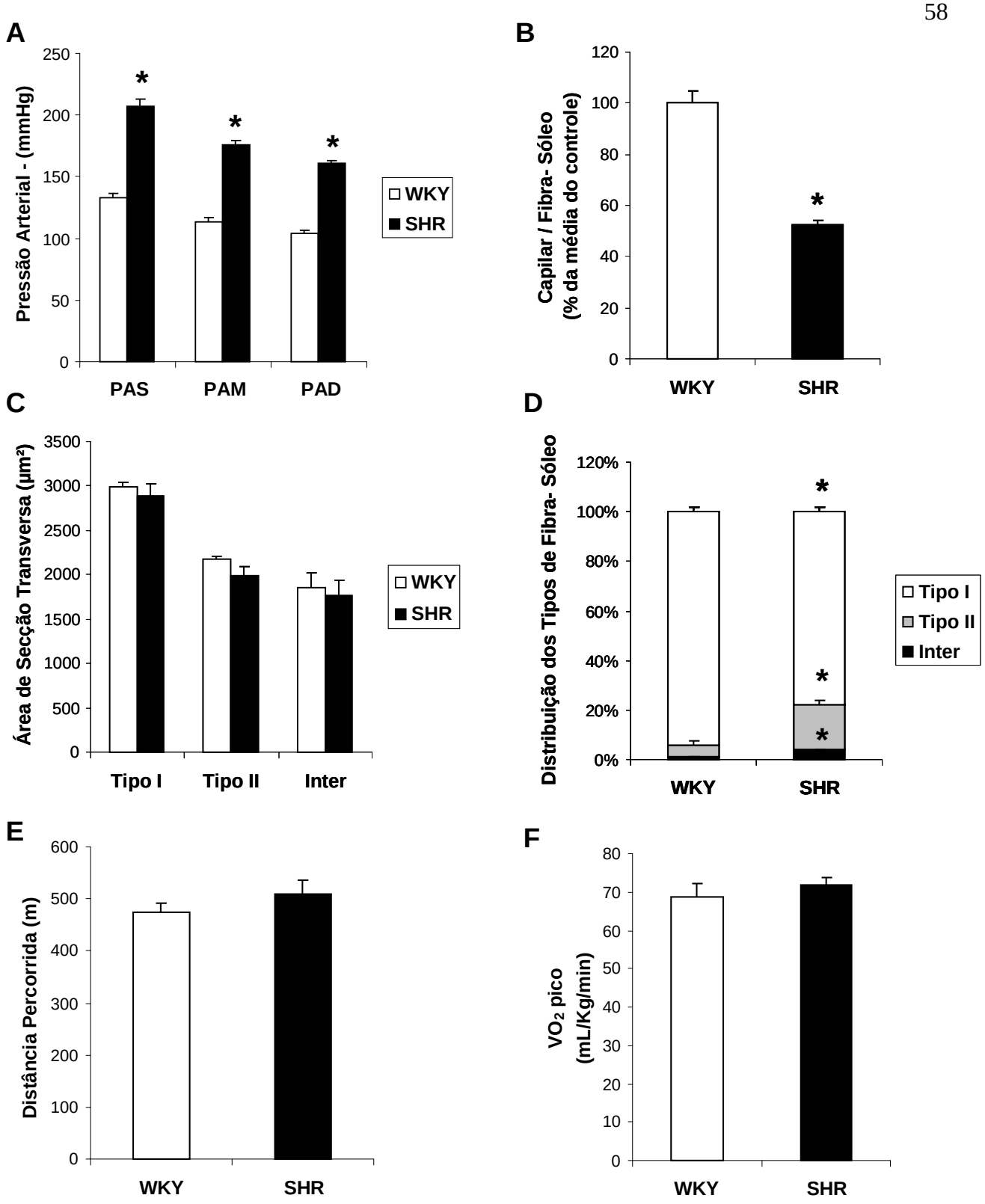


FIGURA 20 – Caracterização fenotípica de SHR. Pressão Arterial Sistólica (PAS), Média (PAM) e Diastólica (PAD) (A); razão capilar por fibra no músculo sóleo (B); área de secção transversa do sóleo (C); proporção de tipos de fibra no sóleo (D); tolerância à realização de esforços

físicos (E) e consumo máximo de oxigênio (F) em ratos WKY e SHR. Os dados estão representados na forma de média ± EPM. * vs. WKY, p< 0,001. Inter = Intermediária.

6.1.2 Caracterização das Células Progenitoras Endoteliais em Ratos Espontaneamente Hipertensos.

Para verificar se há prejuízo do número e disfunção das CPE da medula óssea (MO) e sangue periférico (SP) de SHR e se estas ocorrem simultaneamente com o dano vascular periférico mostrado anteriormente, em um primeiro experimento realizado na MO, analisou-se o número das CPE por meio de células duplamente marcadas para Di-acLDL e Lectina-FITC. Em seguida, foi avaliada a senescência destas pela atividade da enzima β- galactosidase e por último avaliou-se a capacidade funcional das CPE através dos ensaios de unidades formadoras de colônia e formação de tubos como capilares sobre matrigel. Em seguida, foi quantificado o número percentual de CPE no SP por citometria de fluxo e sua função pela capacidade de formação de unidades formadoras de colônia.

Como observado na FIGURA 21, o número (A) e a capacidade funcional (C e D) das CPE estava significantemente reduzida na MO dos SHR, quando comparados aos do grupo WKY, enquanto foi observado um aumento significante no número de células senescentes medulares (B) no grupo SHR comparado ao controle WKY. Além disso, também foi observado uma redução do número (E) e piora da função (F) das CPE no SP de SHR em comparação ao seu controle.

Os resultados do prejuízo no número e na função das CPE auxiliam na idéia de que esta população celular corrobora para o início, manutenção e progressão do dano vascular induzido por fatores de risco cardiovascular, no caso, o que demonstra que as CPE podem estar envolvidas no estabelecimento da rarefação microvascular na HA, como sugerido em modelos induzidos pelos fatores de risco cardiovascular, principalmente a HA (IMANISHI, KOBAYASHI, HANO & NISHIO, 2005a; IMANISHI, MORIWAKI, HANO & NISHIO, 2005b; VAN ZONNEVELD & RABELINK, 2006; GIANNOTTI, DOERRIES, MOCHARLA, MUELLER, BAHLMANN, HORVÀTH, SORRENTINO, STEENKEN, MANES, MARZILLI, RUDOLPH, LÜSCHER, DREXLER & LANDMESSER, 2010).

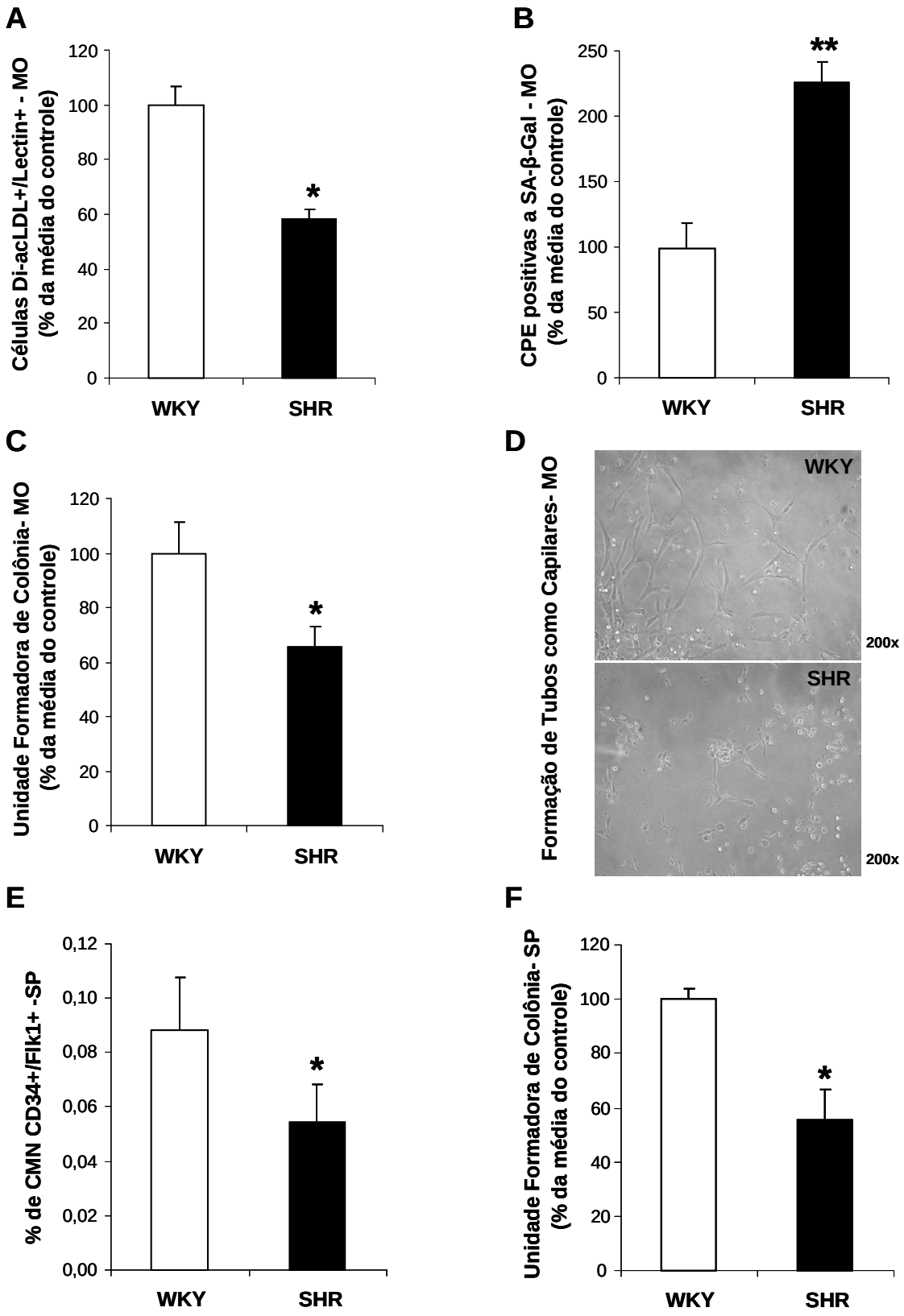


FIGURA 21 – Caracterização das CPE em SHR. Número das CPE na medula óssea (MO) através da dupla marcação para Di-acLDL e Lectina-FITC (A), senescência celular associada a β- galactosidase (SA-β-Gal) na MO

(B), ensaio funcional de unidade formadora de colônia na MO (C), formação de tubos como capilares sobre matrigel na MO (D), porcentagem de CMN positivas para CD34+/Flk1+ no sangue periférico (SP) (E) e ensaio funcional de unidades formadoras de colônia no SP (F) em WKY e SHR. Os dados estão representados na forma de média ± EPM. * p<0,01 e ** p<0,001.

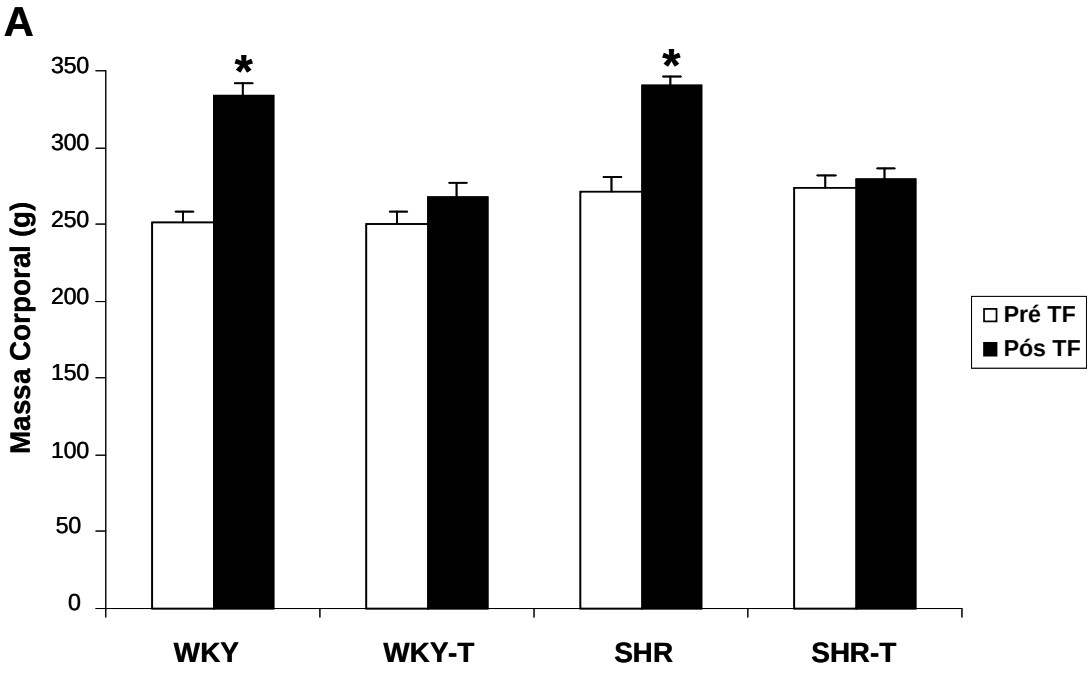
6.2 Massa Corporal

A FIGURA 22A mostra a massa corporal (MC) dos quatro grupos pré e pós período de 10 semanas com protocolo de TF aeróbio. Não houve diferença da MC no início do protocolo entre os grupos (Pré TF - WKY: 251 ± 8, WKY-T: 251 ± 9, SHR: 271 ± 6, SHR-T: 273 ± 7 g). Entretanto, foi observado uma manutenção da MC nos grupos treinados (WKY-T e SHR-T) ao final do protocolo em comparação aos grupos sedentários (WKY e SHR), em que apresentaram um aumento de maneira significativa e semelhante ao final do protocolo experimental (Pós TF - WKY: 334 ± 7, WKY-T: 268 ± 8, SHR: 340 ± 9, SHR-T: 279 ± 8 g).

Os dados encontrados na literatura com relação à alteração na MC em resposta ao TF aeróbio são em sua maioria realizados com humanos e animais de experimentação e mostram resultados bem diversos, devido aos diferentes protocolos de treinamento que são utilizados com modificações em freqüência, intensidade, duração e tipo de exercício. Porém, estudos que utilizaram o mesmo modelo de animal genético, SHR e WKY, vão ao encontro com os dados obtidos neste estudo, em que os grupos treinados chegam ao final do protocolo com um menor ganho de MC comparado aos grupos sedentários (SILVA, MATTOS, GAVA, BRUM, NEGRÃO & KRIEGER, 1997; MELO, JR MARTINHO & MICHELINI, 2003).

Os estudos que mostram diminuição da MC ou menor ganho pós TF aeróbio atribuem esses resultados ao fato do exercício elevar o metabolismo basal devido a um aumento do gasto calórico com uso predominante do metabolismo oxidativo. Esse aumento do gasto calórico somado ao longo de semanas ou meses pode explicar essa diferença em relação aos indivíduos sedentários, principalmente por uma redução do tecido adiposo (TOTH & POCHLMAN, 1996). Portanto, após o sacrifício foi feita a remoção da gordura reto peritoneal dos animais sendo pesada e

corrigida pelo comprimento da tíbia, conforme ilustrado na FIGURA 22B. Foi observado uma reduzida quantidade de tecido adiposo nos animais treinados comparados aos sedentários, explicando em parte esse menor ganho da MC ao final do período experimental (Pós TF - WKY: 0,018 ± 0,0011, WKY-T: 0,009 ± 0,0006, SHR: 0,014 ± 0,0007, SHR-T: 0,007 ± 0,0008 g/mm).



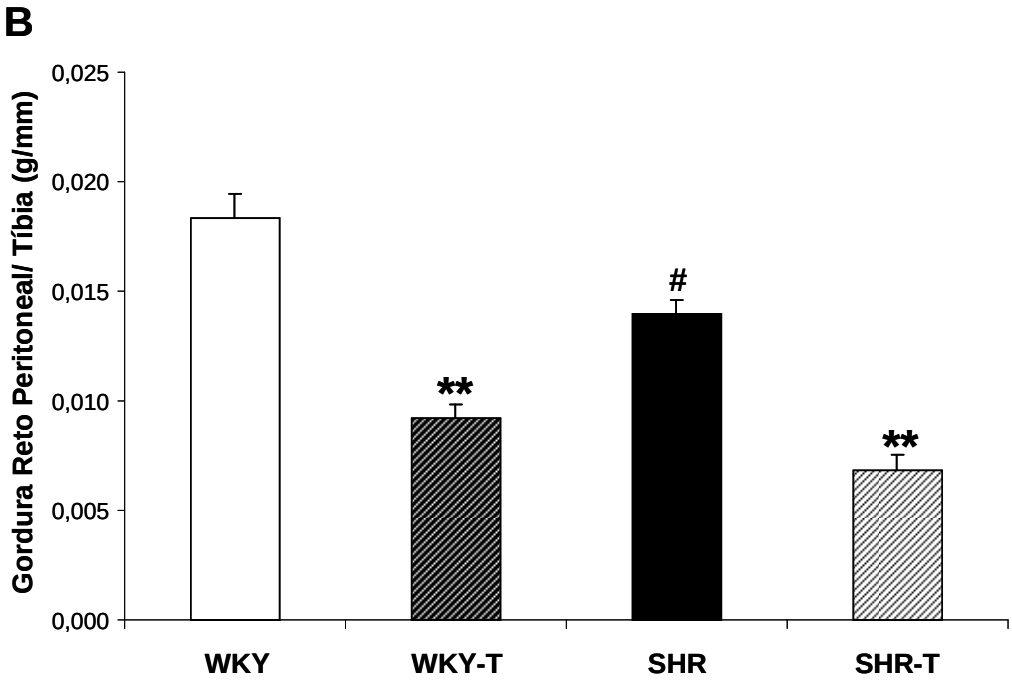


FIGURA 22 - Massa corporal e gordura reto peritoneal. Resultados da massa corporal pré e pós TF de natação (A) representado em gramas (g) e da medida da gordura reto peritoneal pós período de TF (B) representado em gramas corrigido pelo comprimento da tíbia (g/mm). Os dados estão representados na forma de média ± EPM. * vs. Pré-TF e WKY-T e SHR-T Pós-TF, p< 0,01; ** vs. WKY e SHR, p< 0,01 e # vs. WKY, p< 0,05.

6.3 Parâmetros Hemodinâmicos: Pressão Arterial e Freqüência Cardíaca

Os valores de PA expressos em milímetros de mercúrio (mmHg) e da frequência cardíaca (FC) expressos em batimentos por minuto (bpm) pré e pós TF estão representados na FIGURA 23.

Na FIGURA 23A, pré TF, podemos observar que os grupos de SHR apresentavam níveis elevados de PAS (184 ± 3,9 mmHg), PAD (150 ± 4,7 mmHg) e PAM (167 ± 5,3 mmHg) comparados aos grupos controle, WKY (127 ± 3; 99 ± 2,4; 110 ± 3,2 mmHg, respectivamente), indicando que a HA estava estabelecida. Não foi encontrado alterações da FC entre os grupos pré TF (WKY: 390 ± 12; WKY-T: 393 ± 8; SHR: 409 ± 8; SHR-T: 416 ± 6 bpm).

Pós TF, representado pela FIGURA 23B, observa-se que o TF de natação de baixa intensidade e longa duração foi eficaz em reduzir a PAS, PAD e a PAM do grupo SHR-T (162 ± 4,4; 131 ± 2; 147 ± 7,8 mmHg, respectivamente) comparado ao grupo SHR (207 ± 5,5; 160 ± 2,5; 175 ± 3,6 mmHg, respectivamente), sem nenhuma alteração da PAS, PAD e PAM nos grupos de animais controle, WKY (133 ± 4; 104 ± 3; 114 ± 2,5 mmHg, respectivamente) e WKY-T (132 ± 3,7; 104 ± 4,4; 116 ± 5,6 mmHg, respectivamente). Embora reduzida a PA no grupo SHR-T, constatamos que o TF não conseguiu normalizar a pressão para valores similares aos normotensos WKY. Além disso, observamos uma bradicardia de repouso nos grupos de animais treinado, portanto, reduzindo os valores de FC destes grupos quando comparado aos grupos mantidos sedentário no mesmo período experimental (Pós TF- WKY: 393 ± 12; WKY-T: 322 ± 14; SHR: 407 ± 11; SHR-T: 338 ± 8 bpm).

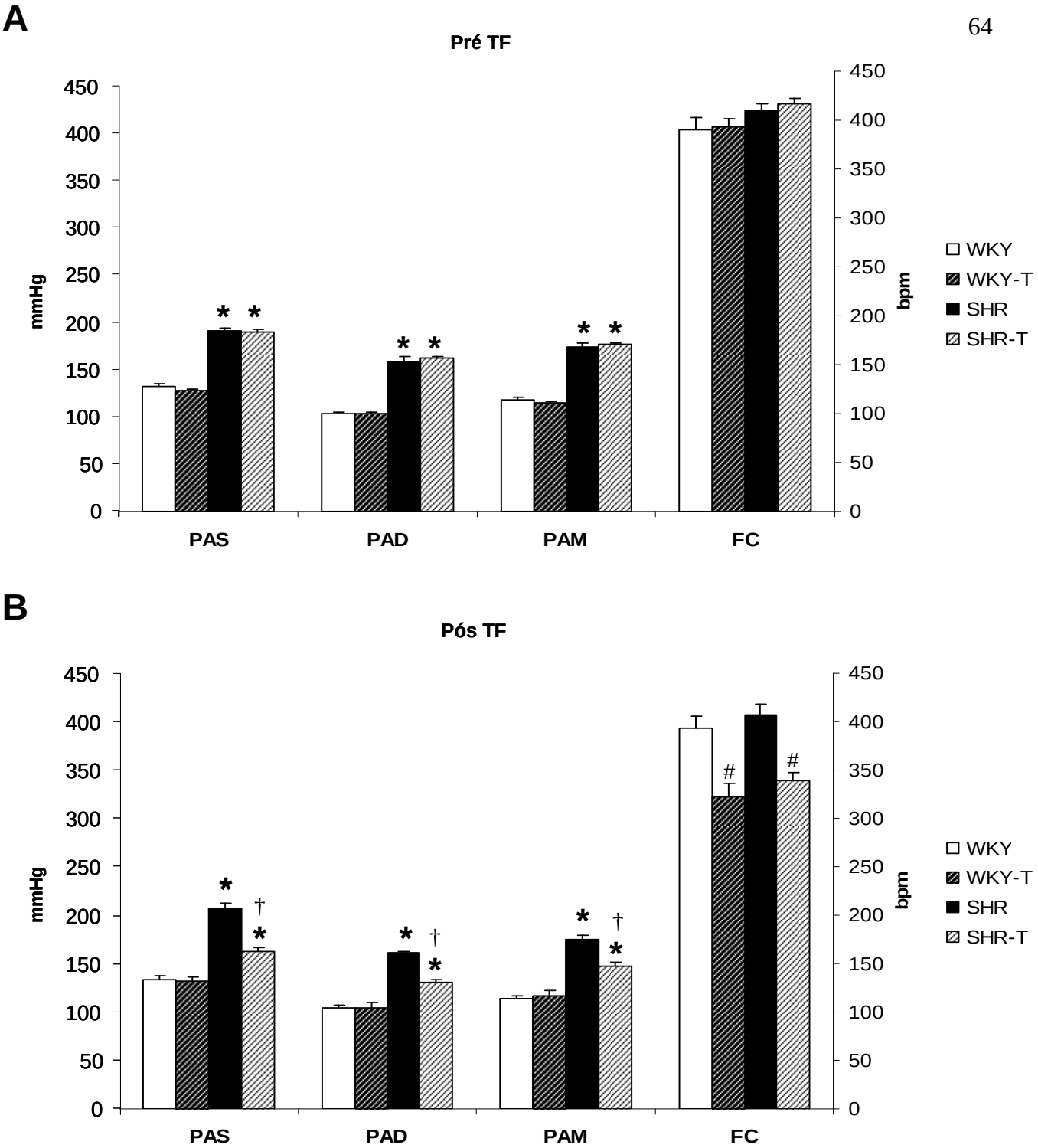


FIGURA 23 – Parâmetros Hemodinâmicos. Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Diastólica (PAD), Pressão Arterial Média (PAM) e Freqüência Cardíaca (FC) de repouso Pré TF (A) e Pós TF (B) de ratos WKY e SHR submetidos ao protocolo experimental. Os resultados estão expressos como média ± EPM. * $p < 0,001$ vs. WKY e WKY-T; # $p < 0,01$ vs. WKY e SHR; † $p < 0,001$ vs. SHR.

6.4 Teste de Esforço Físico Máximo

O teste de tolerância ao esforço foi um dos parâmetros avaliados para comprovarmos a eficácia do treinamento físico. Os animais foram submetidos ao teste em esteira rolante até a exaustão pré e pós o período de TF de natação. Foram avaliadas as variáveis distância percorrida (m), tempo (min) e velocidade ($m.min^{-1}$).

Os resultados do teste realizado antes e após as 10 semanas de protocolo experimental estão representados na FIGURA 24. As Figuras 24A, 24B e 24C mostram que os valores de velocidade (WKY: 30 ± 1,5; WKY-T: 30,5 ± 0,9; SHR: 31,8 ± 0,7; SHR-T: 31,5 ± 1 $m.min^{-1}$), tempo (WKY: 27 ± 0,5; WKY-T: 27 ± 0,6; SHR: 28 ± 0,6; SHR-T: 27 ± 0,3 min) e distância percorrida (WKY: 475 ± 17,5; WKY-T: 467 ± 22; SHR: 508 ± 28; SHR-T: 478 ± 10 m), respectivamente, foram semelhantes entre os grupos Pré TF. Entretanto, os animais treinados aumentaram significativamente a velocidade (WKY: 28,5 ± 0,7; WKY-T: 37 ± 1; SHR: 31 ± 1,2; SHR-T: 39,5 ± 0,9 $m.min^{-1}$), o tempo (WKY: 24 ± 0,4; WKY-T: 31 ± 0,9; SHR: 26 ± 1; SHR-T: 35 ± 0,6 min) e a distância percorrida (WKY: 381 ± 15; WKY-T: 601 ± 3,5; SHR: 449 ± 32; SHR-T: 739 ± 36,8 m) no teste Pós TF.

É importante ressaltar que embora o teste não tenha sido modalidade específica ao tipo de treinamento realizado, o mesmo pode proporcionar bons indícios da melhora da capacidade máxima de realização de esforço físico aeróbio, tais como, melhora do metabolismo oxidativo e cardiopulmonar.

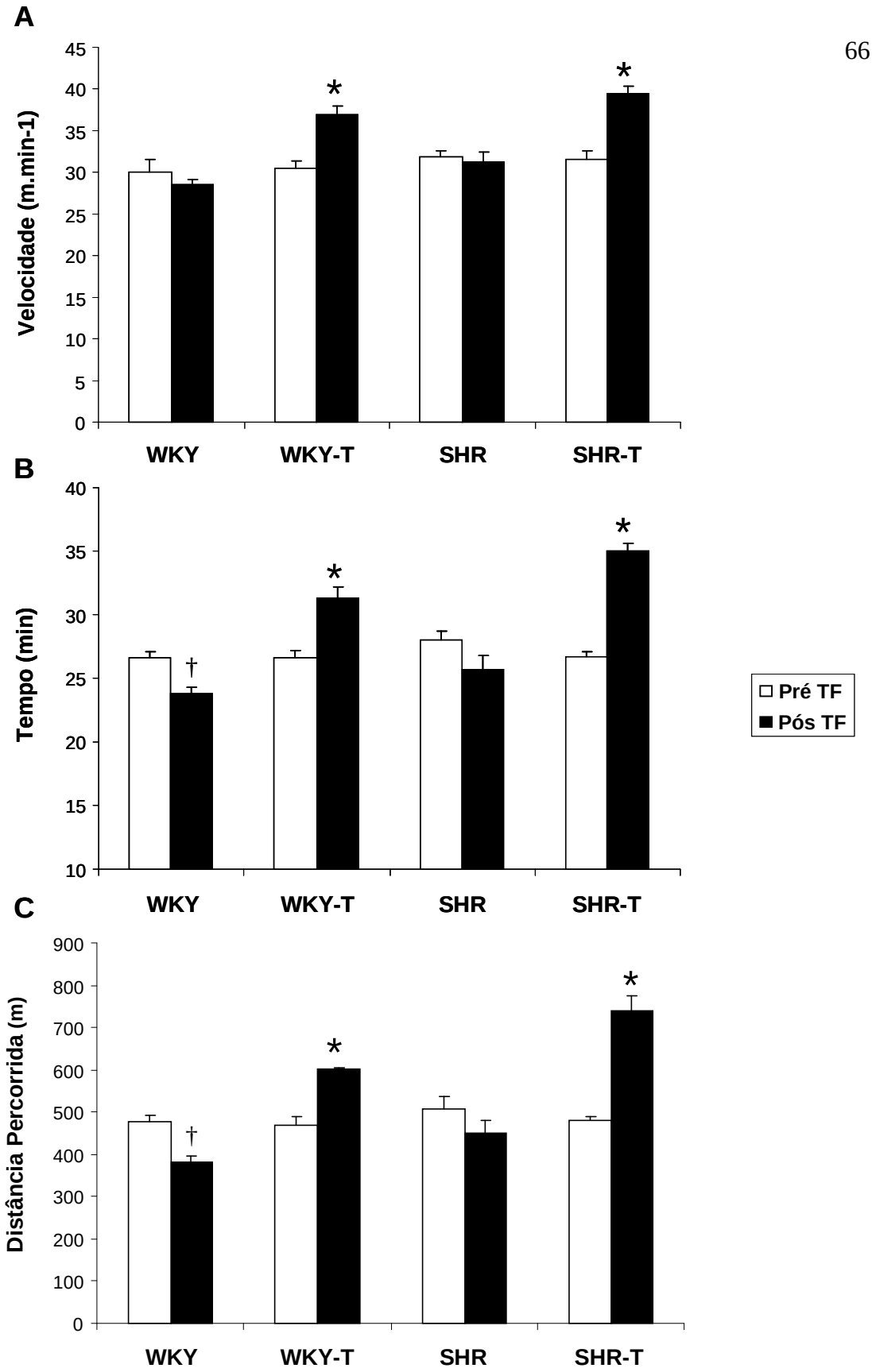


FIGURA 24 – Teste de esforço físico máximo. Velocidade (A), Tempo (B) e Distância Percorrida (C) Pré e Pós TF. Os resultados estão expressos como

média ± EPM. * p <0,05 comparado com o Pré TF e WKY e SHR Pós TF; † p<0,05 comparado ao Pré TF e WKY-T e SHR-T Pós TF.

6.5 Medida do Consumo de Oxigênio

O VO_2 retrata a capacidade máxima do organismo de extrair oxigênio. Esta é a medida que melhor avalia a potência aeróbia, ou seja, a quantidade máxima de energia que pode ser transformada em trabalho aeróbio das fibras musculares por unidade de tempo (DENADAI, ORTIZ & MELO, 2004).

A FIGURA 25 mostra o VO_2 pico dos animais pré e pós o protocolo experimental. No período Pré TF observa-se que todos os grupos tinham o mesmo nível médio de VO_2 pico (Pré TF- WKY: 69 ± 3,5; WKY-T: 69 ± 2,5; SHR: 72 ± 2; SHR-T: 73 ± 36 mL. kg^{-1}. min^{-1}), entretanto Pós TF observa-se a eficácia do treinamento com uma resposta maior de VO_2 para os grupos que treinaram (WKY-T e SHR-T) e uma redução para os grupos controle (WKY e SHR) (Pós TF- WKY: 58 ± 2,5; WKY-T: 78 ± 4; SHR: 61 ± 2; SHR-T: 84,5 ± 2 mL. kg^{-1}. min^{-1}).

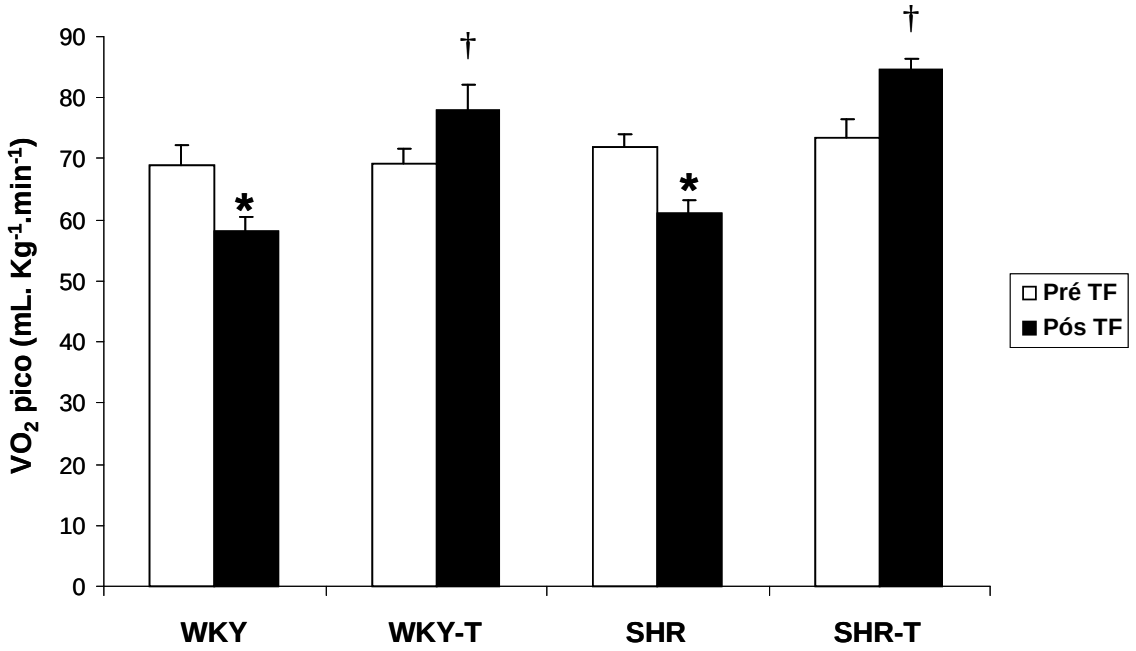


FIGURA 25 – Consumo de oxigênio pico pré e pós TF. Os resultados estão expressos como média ± EPM. * p< 0,05 comparado Pré TF e WKY-T e SHR-T Pós TF; † p< 0,05 comparado Pré TF e WKY e SHR Pós TF.

6.6 Atividade da Enzima Citrato Sintase

O aumento da atividade das enzimas oxidativas presentes na mitocôndria é um indicativo da otimização do metabolismo aeróbio, por isso este parâmetro também foi analisado para comprovarmos a eficiência do TF. A FIGURA 26 demonstra que houve um aumento da atividade da enzima citrato sintase no músculo sóleo de ratos do grupo controle e hipertenso treinado em relação aos grupos controles que se mantiveram sedentários (WKY: 86 ± 12, WKY-T: 120± 11, SHR: 76 ± 9 e SHR-T: 144 ± 15 nmol. min^{-1}. mg $proteína^{-1}$).

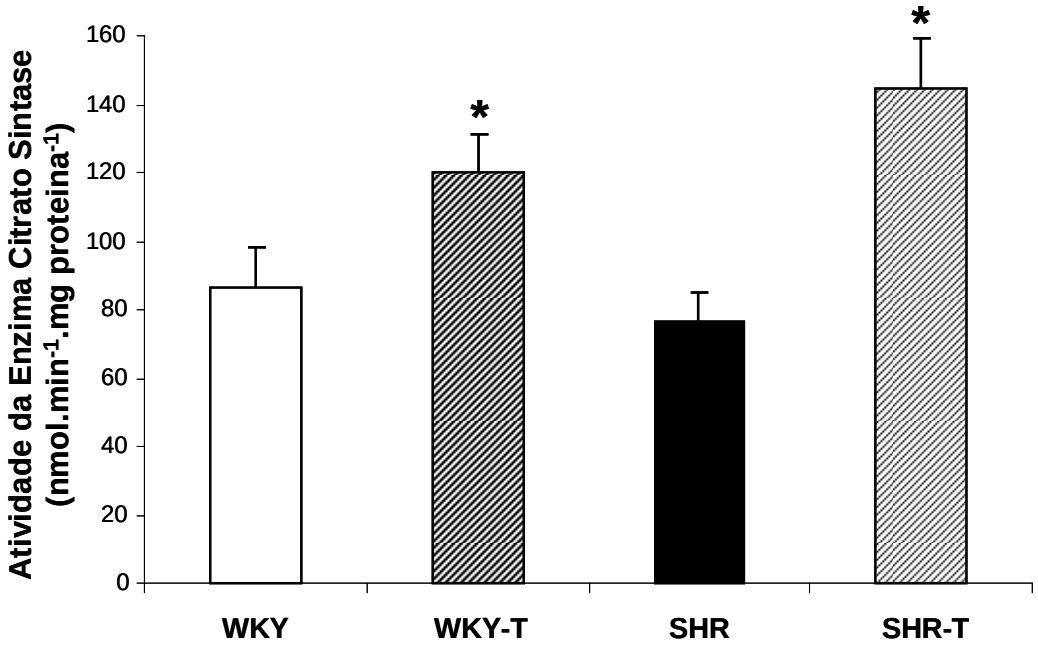


FIGURA 26 – Atividade da enzima citrato sintase no músculo sóleo representada em valores de nmol. min^{-1}. mg de $proteína^{-1}$. Resultados expressos como média ± EPM. * $p < 0,05$ comparado WKY e SHR.

6.7 Determinação da Área de Secção Transversa, Tipos de Fibra e Razão Capilar por Fibra Muscular Esquelética

Análises morfológicas após processamento histológico revelaram importantes mudanças na microcirculação muscular esquelética induzida pelo TF em ratos normotensos e hipertensos. A FIGURA 27 mostra os resultados obtidos através da avaliação histoquímica do músculo esquelético sóleo por meio da reação da ATPase miosínica.

Como esperado, a rarefação capilar foi observada no grupo SHR comparado ao grupo WKY. Por outro lado, o TF foi efetivo em aumentar 47% o número de capilares pela análise da razão capilar por fibra no grupo WKY-T e corrigiu a rarefação capilar no grupo SHR-T quando comparados ao grupo WKY (WKY: 1,2 ± 0,06; WKY-T: 1,8 ± 0,04; SHR: 0,7 ± 0,02 e SHR-T: 1,1 ± 0,04 nº de capilares/ fibra muscular) (FIGURA 27A).

Não foi observado alteração da área de secção transversa nos diferentes tipos de fibra, como as do tipo I (WKY: 2987 ± 52, WKY-T: 3053 ± 152, SHR: 2884 ± 145 e SHR-T: 2939 ± 109 μm^2), tipo II (WKY: 2171 ± 44, WKY-T: 2167 ± 20, SHR: 1982 ± 107 e SHR-T: 2149 ± 47 μm^2) e intermediárias (WKY: 1846 ± 169, WKY-T: 1851 ± 65, SHR: 1770 ± 160 e SHR-T: 1731 ± 144 μm^2) no músculo sóleo dos 4 grupos estudos (FIGURA 27B). Entretanto, o TF foi efetivo em recuperar a proporção na distribuição dos tipos de fibras no grupo SHR-T, reduzindo a porcentagem de fibras do tipo II (Tipo II - WKY: 4,8 ± 1,5; WKY-T: 2,7 ± 1; SHR: 18,5 ± 1,4 e SHR-T: 11 ± 0,9 %) e intermediárias (Inter - WKY: 1,1 ± 0,2; WKY-T: 0,88 ± 0,1; SHR: 3,9 ± 0,4 e SHR-T: 1,9 ± 0,5 %) em detrimento ao aumento na porcentagem de fibras do tipo I (Tipo I - WKY: 92,7 ± 1,5; WKY-T: 96,5 ± 1,1; SHR: 77,5 ± 1,8 e SHR-T: 87,2 ± 1,3 %), se equiparando ao animal controle (FIGURA 27C).

É possível observar essas alterações na FIGURA 27D pelas imagens representativas dos cortes histológicos do músculo sóleo para cada grupo estudado, pela caracterização histoquímica da atividade da ATPase miosínica.

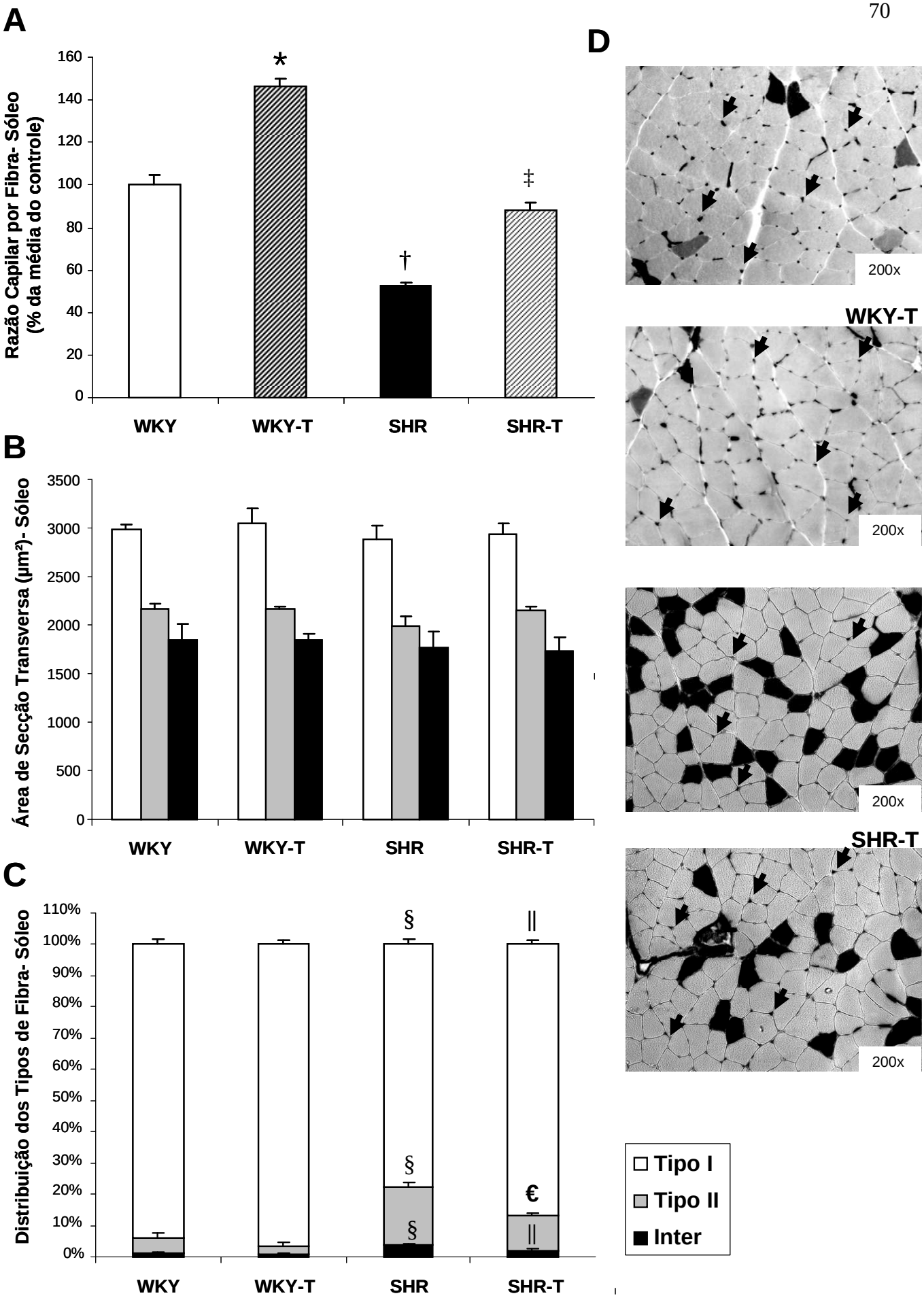

A
Razão Capilar por Fibra- Sóleo
(% da média do controle)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
*
†
‡
WKY
WKY-T
SHR
SHR-T
B
Área de Secção Transversa (µm²)- Sóleo
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
WKY
WKY-T
SHR
SHR-T
C
Distribuição dos Tipos de Fibra- Sóleo
110%
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
§
||
€
WKY
WKY-T
SHR
SHR-T
D
200x
WKY-T
200x
200x
SHR-T
200x
Tipo I
Tipo II
Inter

FIGURA 27 – Caracterização histoquímica do sóleo pela reação ATPase miosínica. Razão capilar por fibra (A), área de secção transversa das fibras musculares do tipo I, II e intermediárias (B), distribuição dos tipos de fibra (D) e imagens representativas dos cortes histológicos de secções transversas do músculo. Os dados estão representados na forma de média ± EPM. * p< 0,05 vs. WKY, SHR e SHR-T; † p< 0,05 vs. WKY, WKY-T e SHR-T, ‡ p< 0,05 vs. WKY-T e SHR; § p< 0,001 vs. WKT, WKY-T e SHR-T; □ p< 0,01 vs. WKY-T, € p<0,01 vs. WKY, WKY-T, SHR.

6.8 Quantificação das Células Progenitoras Endoteliais da Medula Óssea

Sabe-se que a quase totalidade das CPE originam da MO, por isso a importância de se estudar a bioatividade das CPE dentro do seu compartimento de produção. As células tronco da MO usualmente se apresentam no estado quiescente e sinais específicos estimulam estas células em diferenciarem ou não em CPE (URBICH & DIMMELER, 2004; MILLER-KASPRZAK & JAGODZINSKI, 2007).

A FIGURA 28 mostra o efeito do TF sobre o número das CPE na MO em ratos WKY e SHR. As CPE foram caracterizadas como células duplamente positivas para Di-acLDL e Lectina-FITC. O número de CPE derivadas de SHR foram significantemente menores do que de WKY. Em contraste, o TF aumentou significativamente o número de CPE medulares no grupo WKY-T e restabeleceu os níveis no grupo SHR-T comparados ao número do grupo controle (WKY: 111 ± 8,7; WKY-T: 239 ± 23,4; SHR: 64,5 ± 4,3 e SHR-T: 136,7 ± 6,7 Di-acLDL/Lectina-FITC células positivas).

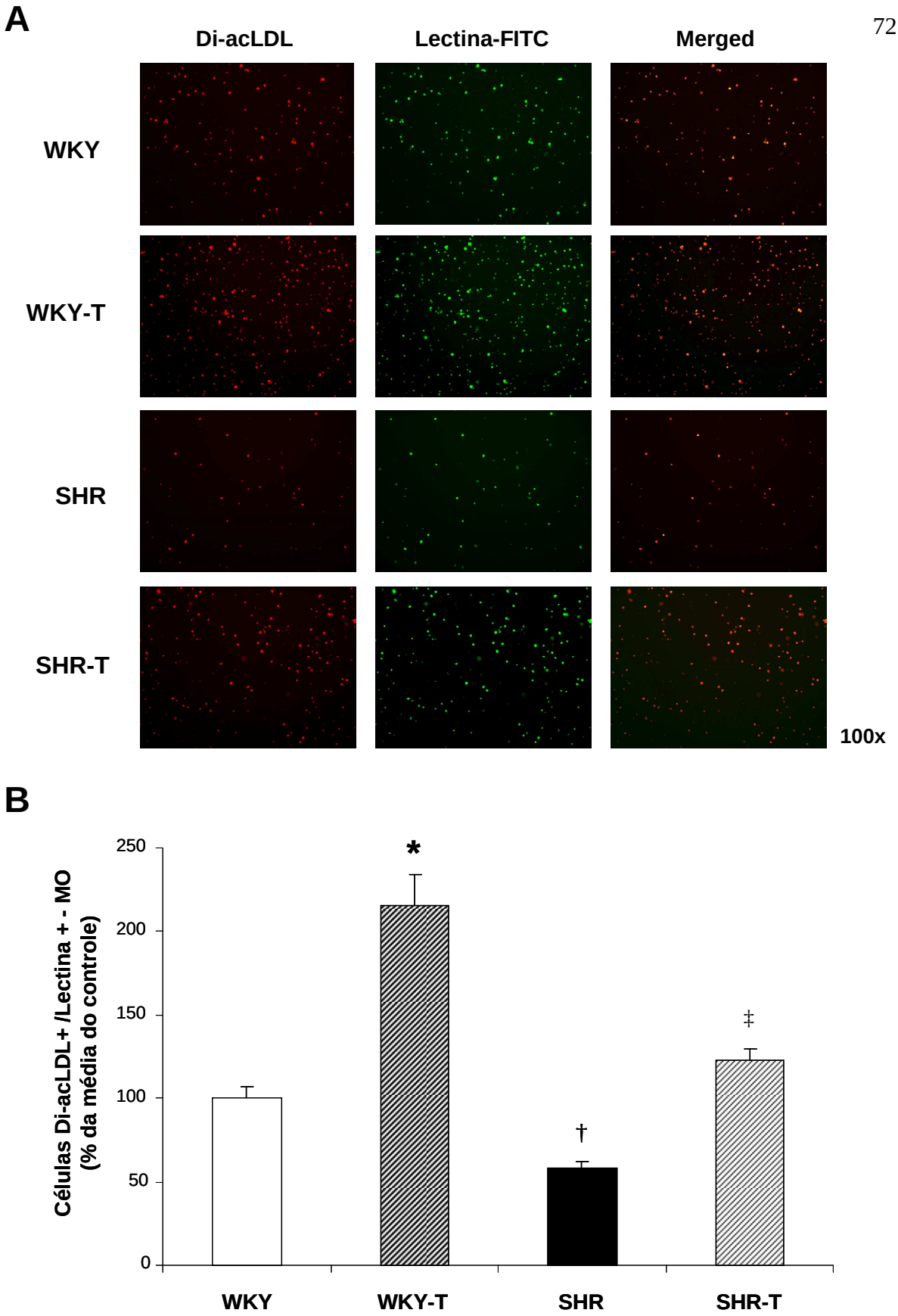


FIGURA 28 – Efeito do TF aeróbio sobre o número de CPE da medula óssea na HA. Fotos representativas da fluorescência para Di-acLDL e Lectina-FITC

e as células duplamente positivas identificando as CPE (A). Análise quantitativa das CPE (B). Os resultados estão expressos como média ± EPM. * p< 0,05 vs. WKY, SHR e SHR-T; † p< 0,05 vs. WKY, WKY-T e SHR-T; ‡ p< 0,05 vs. WKY-T e SHR.

6.9 Senescência das Células Progenitoras Endoteliais da Medula Óssea

A senescência das CPE é vista como uma causa potencial da alteração da função das CPE e relacionada ao aumento de fatores de risco para DCV (HILL, ZALOS, HALCOX, SCHENKE, WACLAWIW, QUYYUMI & FINKEL, 2003; IMANISHI, MORIWAKI, HANO & NISHIO, 2005b).

Como um marcador de senescência das CPE, células positivas para β-galactosidase (SA- β-Gal) foram analisadas (FIGURA 29). Não existiu diferença significante no número de células senescentes entre os grupos WKY e WKY-T. Entretanto, o número de células senescentes foi atenuado pelo TF no grupo SHR-T comparado ao grupo WKY, porém não normalizou (WKY: 99 ± 18,7; WKY-T: 70 ± 8,2; SHR: 225,9 ± 15,3 e SHR-T: 153,5 ± 7,8 razão de células senescentes associadas a β-galactosidase (SA- β-Gal) por número de células totais).

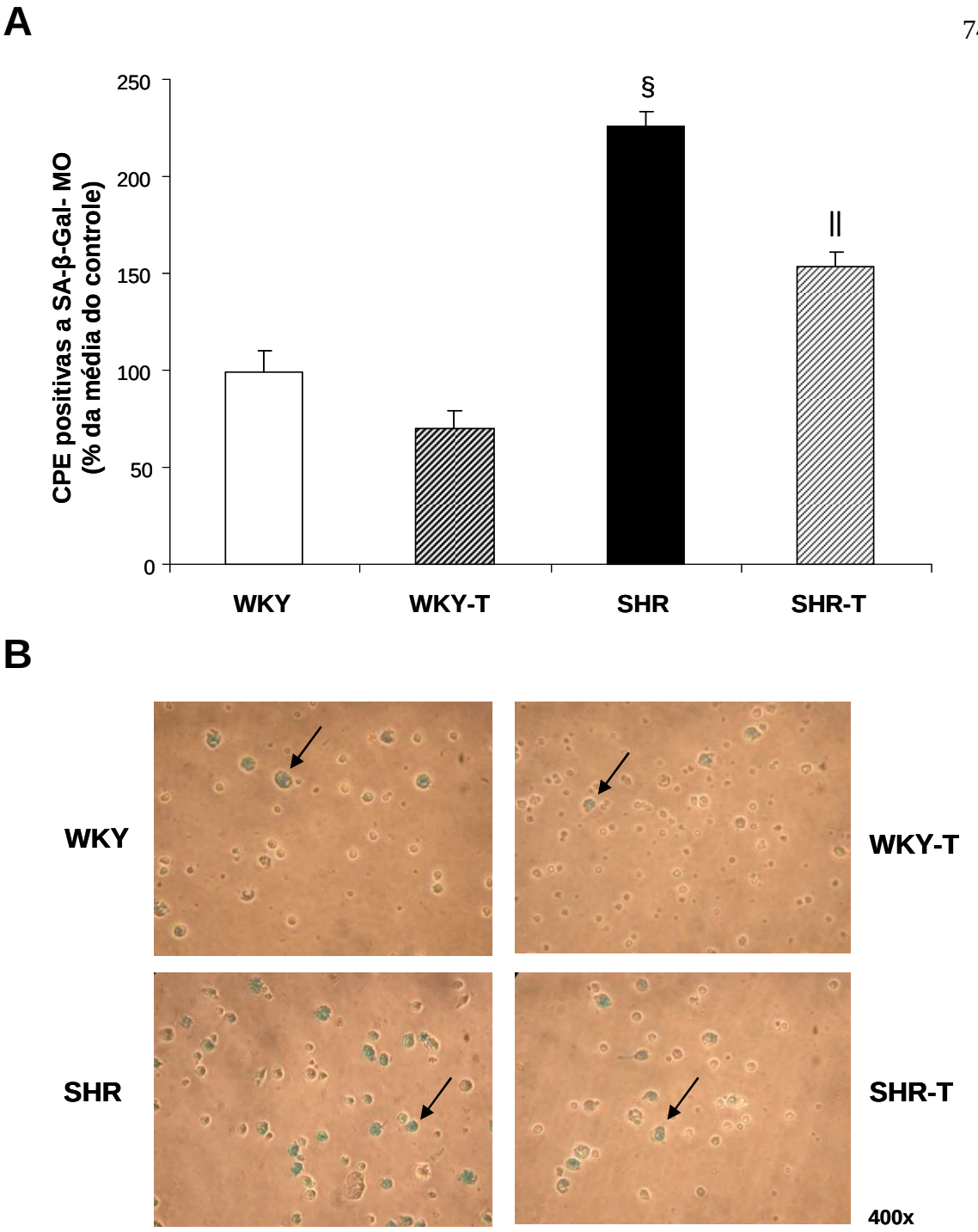


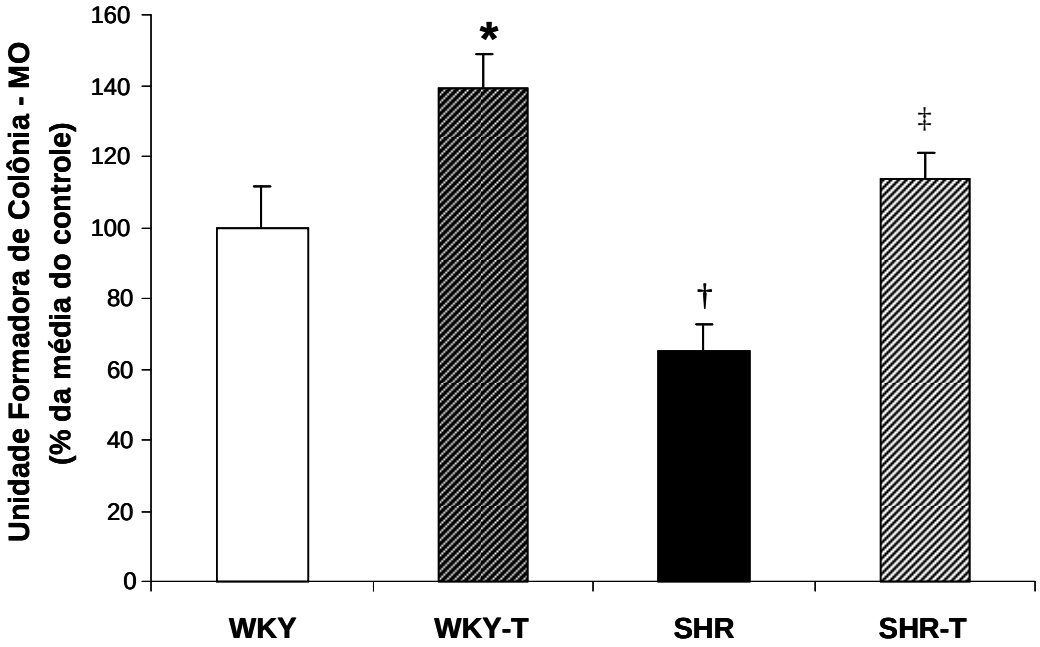
FIGURA 29 – Efeito do TF aeróbio sobre a senescência das CPE da medula óssea na HA. A senescência foi avaliada pela atividade da β-galactosidase (SA- β-Gal) (A). Fotos representativas do ensaio de SA- β-Gal de cada grupo estudado. As setas indicam as células senescentes marcadas em azul (B). Os resultados estão expressos como média ± EPM. * $p < 0,05$ vs. WKY, SHR e SHR-T; † $p < 0,05$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T; ‡ $p < 0,05$ vs. WKY-T e SHR.

6.10 Ensaio Funcional das Células Progenitoras Endoteliais da Medula Óssea pela Formação de Unidade Formadora de Colônia

A capacidade clonogênica das CPE tem sido utilizada como um índice de análise funcional e é negativamente correlacionada com fatores de risco cardiovascular, e positivamente correlacionada com o reparo e função vascular (HILL, ZALOS, HALCOX, SCHENKE, WACLAWIW, QUYYUMI & FINKEL, 2003).

O número de colônias de CPE da MO foi significantemente menor no grupo SHR do que no grupo WKY. Interessantemente, como demonstrado pela FIGURA 30A, o TF foi capaz de corrigir esta disfunção das CPE representada pela recuperação do número de colônias formadas no grupo SHR-T comparado ao grupo controle WKY. Além disso, o TF aumentou o número de colônias no grupo WKY-T comparado ao grupo WKY (WKY: 35 ± 4,4; WKY-T: 49 ± 3,8; SHR: 22,8 ± 2,6 e SHR-T: 39,8 ± 3,1 número de unidades formadoras de colônia por 10^6 células plaqueadas). As unidades formadoras de colônia são mostradas em todos os grupos estudados na FIGURA 30B.

A


Unidade Formadora de Colônia - MO
(% da média do controle)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
*
†
‡
WKY
WKY-T
SHR
SHR-T

B

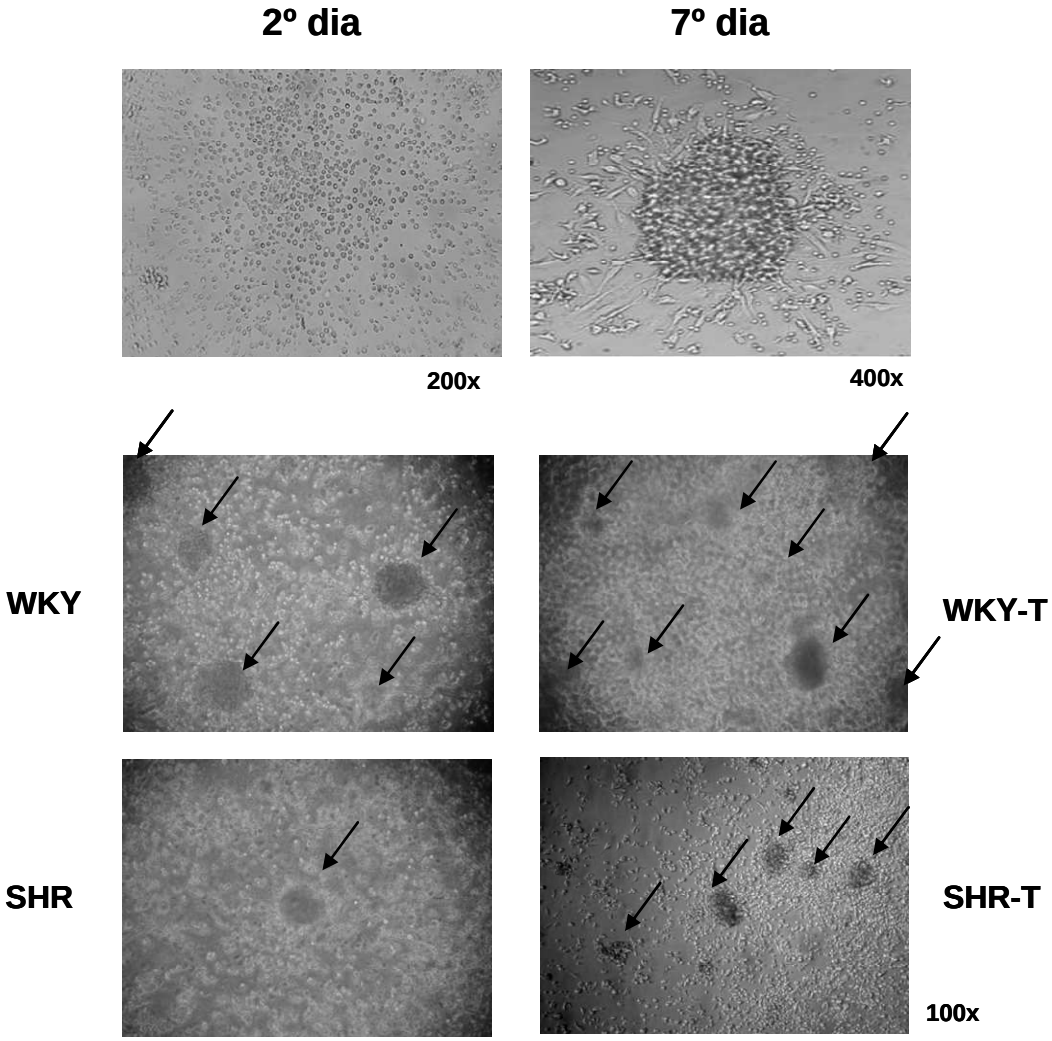

2º dia
7º dia
200x
400x
WKY
WKY-T
SHR
SHR-T
100x

FIGURA 30 – Efeito do TF aeróbio sobre as unidades formadoras de colônia das CPE da medula óssea na HA. A função das CPE foi avaliada pela capacidade de formação de unidade formadora de colônia (A). Foto representativa do 2º dia do plaqueamento das CPE e ao 7º dia já contendo a colônia de células, além das fotos da formação de colônias de cada grupo estudado. As setas indicam as colônias (B). Os resultados estão expressos como média ± EPM. * $p < 0,05$ vs. WKY, SHR e SHR-T; † $p < 0,05$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T; ‡ $p < 0,05$ vs. WKY-T e SHR.

6.11 Ensaio Funcional das Células Progenitoras Endoteliais da Medula Óssea pela Formação de Tubos como Capilares

O ensaio de diferenciação das CPE é um dos mais utilizados para avaliação da capacidade funcional das CPE. Como podemos observar na FIGURA 31 por meio de uma análise qualitativa, a HA reduziu a capacidade de diferenciação das CPE em tubos como capilares sobre matrigel quando comparado ao grupo normotenso. Entretanto, o TF restaurou este prejuízo de formação de tubos como capilares no grupo SHR-T e aumentou ainda mais esta capacidade no grupo WKY-T.

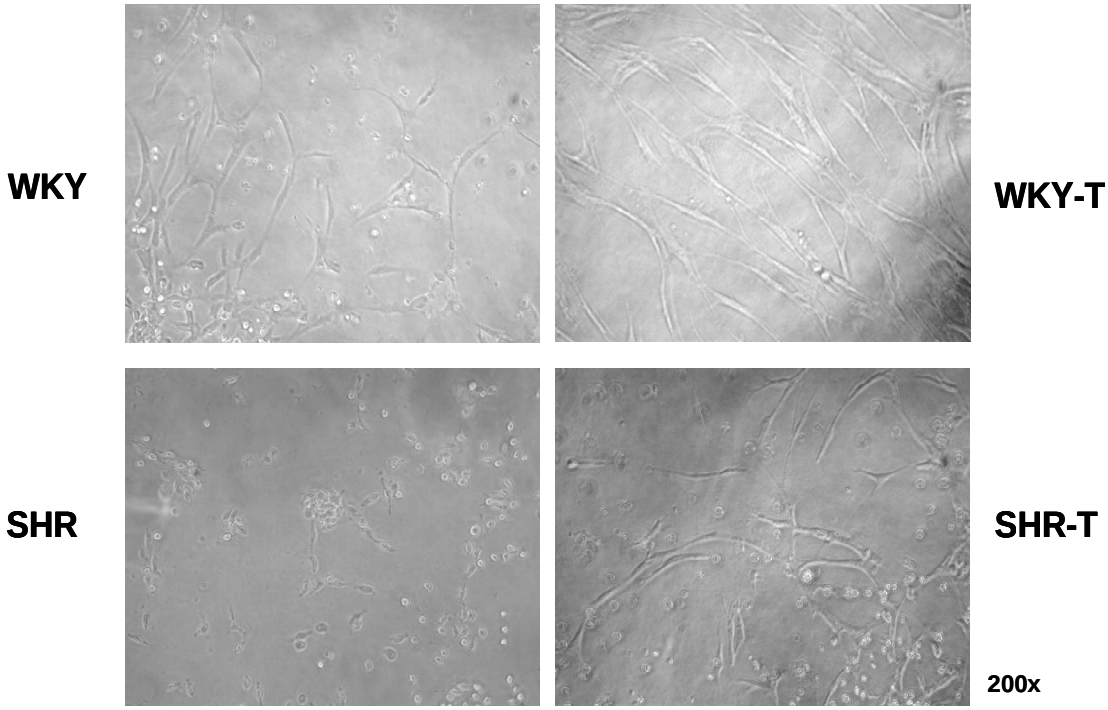


FIGURA 31 – Efeito do TF aeróbio sobre a formação de tubos como capilares das CPE da medula óssea na HA. Fotos representativas do ensaio funcional das CPE pela análise qualitativa da capacidade de formação de tubo como capilar sobre matrigel.

6.12 Quantificação das Células Progenitoras Endoteliais do Sangue Periférico

Após o processo de diferenciação no compartimento medular, as CPE são mobilizadas para a circulação periférica por meio de sinais específicos para promover a reendotelização e neovascularização (URBICH & DIMMELER, 2004; VAN ZONNEVELD & RABELINK, 2006; MILLER-KASPRZAK & JAGODZINSKI, 2007).

Como podemos observar na FIGURA 32A, o número de CPE do SP, definidas pelo número de células duplamente marcadas para CD34+/Flk1+, foi significantemente menor no grupo SHR comparado ao grupo WKY. Em contraste, os níveis periféricos de CPE foram significantemente maior no grupo WKY-T e o TF notavelmente restaurou os níveis no grupo SHR-T, trazendo para valores semelhantes aos do grupo WKY (WKY: 0,088 ± 0,01; WKY-T: 0,189 ± 0,01; SHR: 0,054 ± 0,01 e SHR-T: 0,094 ± 0,01 células duplamente marcadas para CD34+/Flk1+).

Interessantemente, o VO_2 foi positivamente correlacionado com os níveis periféricos de CMN CD34+/Flk1+ ($r=0,50$; $P<0,05$; FIGURA 32B), sugerindo que uma maior capacidade aeróbia induzida pelo TF está diretamente relacionada ao aumento do número de CPE no SP. Além disso, as CMN CD34+/Flk1+ também foram positivamente correlacionadas à razão capilar por fibra muscular ($r=0,89$; $P<0.001$, FIGURA 32C), sugerindo que o aumento nos níveis de CPE periférica está relacionado à angiogênese muscular esquelética induzida pelo TF.

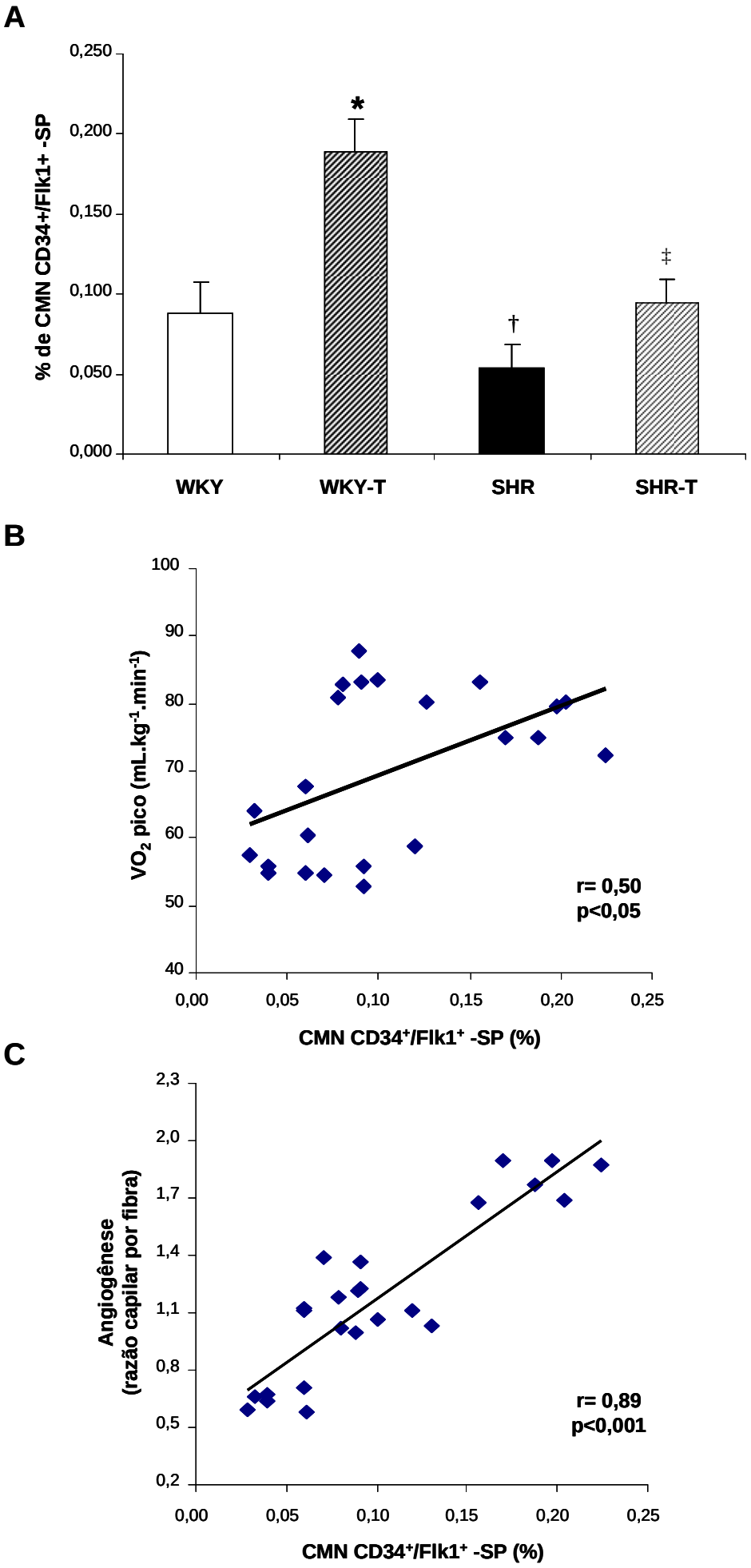

A
% de CMN CD34+/Flk1+ -SP
0,250
0,200
0,150
0,100
0,050
0,000
*
†
‡
WKY
WKY-T
SHR
SHR-T
B
VO2 pico (mL.kg-1.min-1)
100
90
80
70
60
50
40
r= 0,50
p<0,05
0,00
0,05
0,10
0,15
0,20
0,25
CMN CD34+/Flk1+ -SP (%)
C
Angiogênese
(razão capilar por fibra)
2,3
2,0
1,7
1,4
1,1
0,8
0,5
0,2
r= 0,89
p<0,001
0,00
0,05
0,10
0,15
0,20
0,25
CMN CD34+/Flk1+ -SP (%)

FIGURA 32 – Efeito do TF aeróbio sobre o número de CPE do sangue periférico na HA. Porcentagem de CMN $CD34^+/Flk1^+$ do sangue periférico analisadas por citometria de fluxo (A). Correlação entre o VO_2 e os níveis de CMN $CD34^+/Flk1^+$ (B). Correlação entre a razão capilar por fibra muscular esquelética e os níveis de CMN $CD34^+/Flk1^+$ (C). Os resultados estão expressos como média ± EPM. * $p< 0,05$ vs. WKY, SHR e SHR-T; † $p< 0,05$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T; ‡ $p< 0,05$ vs. WKY-T e SHR.

6.13 Análise Funcional das Células Progenitoras Endoteliais do Sangue Periférico pela Formação de Unidade Formadora de Colônia

A FIGURA 33 mostra o ensaio de função das CPE do SP mensurada pela capacidade de formação de unidade formadora de colônia e sua relação com o VO_2 e a angiogênese muscular esquelética.

Como observado na FIGURA 33A, às unidades formadoras de colônia das CPE do SP foram significantemente menores no grupo SHR comparado ao grupo WKY. Por outro lado, o TF restabeleceu a função das CPE circulantes, uma vez que ele recuperou o número de unidade formadora de colônia de CPE no grupo SHR-T. Além disso, o TF aumentou o número de colônias no grupo WKY-T comparado ao grupo WKY (WKY: 13 ± 0,5; WKY-T: 23 ± 2; SHR: 7,5 ± 1,5 e SHR-T: 16 ± 1 número de unidades formadoras de colônia por 10^6 células plaqueadas).

Notavelmente, existiu uma correlação positiva significante entre o VO_2 e o número de unidade formadora de colônia de CPE no SP ($r=0,70$; $P<0,01$; FIGURA 33B), indicando que uma maior capacidade aeróbia está associada com uma melhora da função das CPE circulantes. Além disso, a angiogênese foi correlacionada positivamente com o número de unidades formadoras de colônia ($r=0,86$; $P<0,001$; FIGURA 33C), revelando claramente que a formação de novos capilares pode ser dependente de uma melhora da função das CPE do SP induzidas pelo TF.

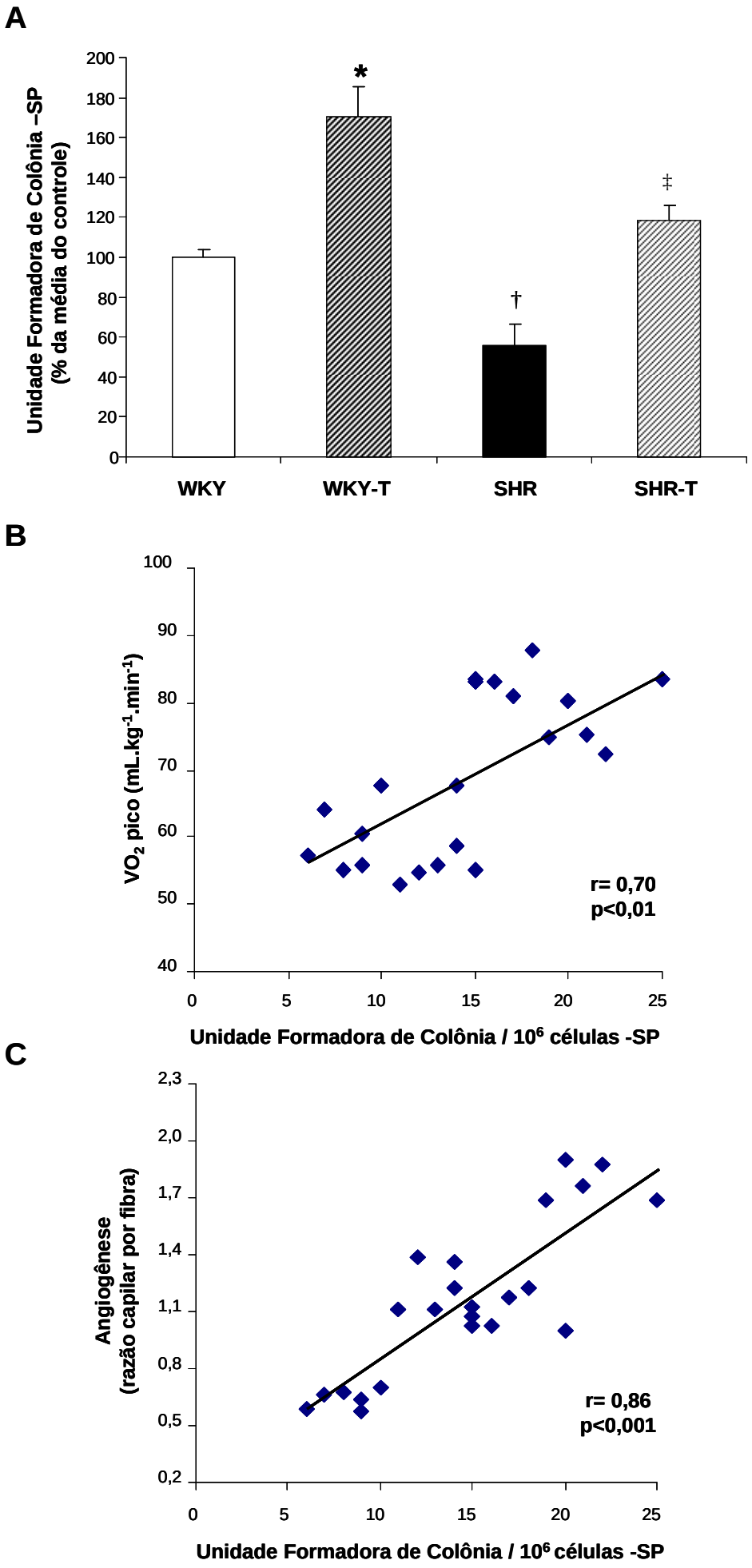

A
Unidade Formadora de Colônia –SP
(% da média do controle)
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
*
†
‡
WKY
WKY-T
SHR
SHR-T
B
VO2 pico (mL.kg-1.min-1)
100
90
80
70
60
50
40
r= 0,70
p<0,01
0
5
10
15
20
25
Unidade Formadora de Colônia / 10⁶ células -SP
C
Angiogênese
(razão capilar por fibra)
2,3
2,0
1,7
1,4
1,1
0,8
0,5
0,2
r= 0,86
p<0,001
0
5
10
15
20
25
Unidade Formadora de Colônia / 10⁶ células -SP

FIGURA 33 – Efeito do TF aeróbio sobre as unidades formadoras de colônia das CPE do sangue periférico na HA. A função das CPE foi avaliada pela capacidade de formação de unidade formadora de colônia (A). Correlação entre o VO_2 e as unidades formadoras de colônia (B). Correlação entre a razão capilar por fibra muscular esquelética e as unidades formadoras de colônia (C). Os resultados estão expressos como média ± EPM. * $p< 0,05$ vs. WKY, SHR e SHR-T; † $p< 0,05$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T; ‡ $p< 0,05$ vs. WKY-T e SHR.

6.14 Quantificação dos Fatores Angiogênicos e Mobilizadores de Células Progenitoras Endoteliais

O VEGF e a eNOS tem sido considerados como mediadores cruciais no processo angiogênico e regulação das CPE (LAUFS, WERNER, LINK, ENDRES, WASSMANN, JURGENS, MICHE, BOHM & NICKENIG, 2004; URBICH & DIMMELER, 2004; MILLER-KASPRZAK & JAGODZINSKI, 2007).

A FIGURA 34 mostra os níveis de VEGF sistêmico avaliados no soro por ELISA. Observa-se que os grupos de animais treinados apresentaram aumento nos níveis de VEGF circulantes quando comparados aos grupos sedentários (WKY: 2±0,4; WKY-T: 16±2,6; SHR: 9±0,5; SHR-T: 18±2,6 pg/ml). Estes resultados sugerem um aumento do número de CPE circulantes mediados pelo VEGF quando induzidos pelo TF. Além disso, observa-se um aumento de VEGF no grupo SHR quando comparado ao grupo WKY, o que indica uma tentativa de contrabalançar os níveis reduzidos de CPE sistêmico. Como demostrado nos resultados anteriores, além dos baixos números dessas células na MO, as mesmas se apresentam mais senescentes o que indica uma redução de seu tempo de vida na HA. Dessa forma acredita-se que há uma tentativa insessante na HA de compensar este dano, porém como o perfil das CPE se encontra comprometido já dentro do compartimento medular, não se observa uma melhora desses parâmetros sistêmicos.

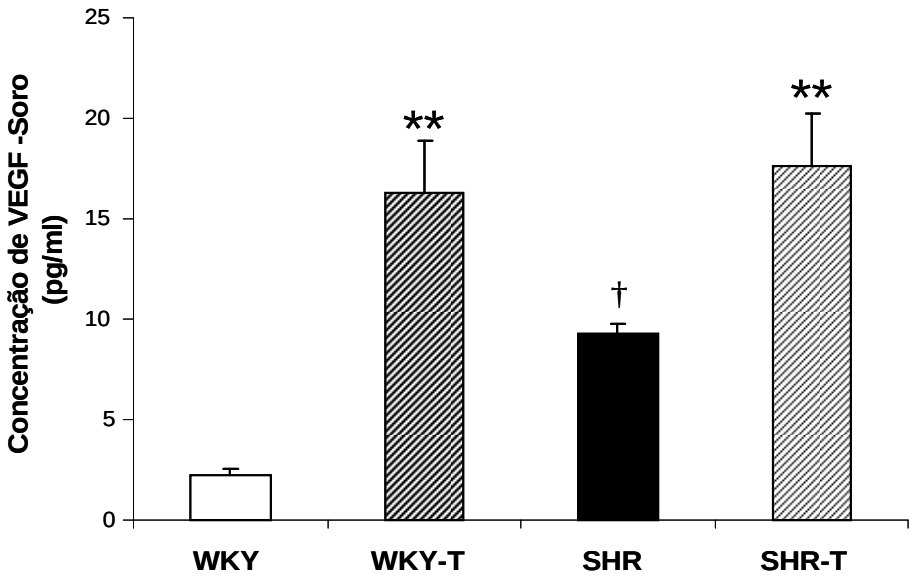


FIGURA 34 – Efeito do TF aeróbio sobre os níveis de VEGF circulante na HA. Os resultados estão expressos como média ± EPM. ** p< 0,001 vs. WKY; † p< 0,01 vs. WKY, WKY-T e SHR-T.

A FIGURA 35 mostra os níveis protéicos avaliados por *western blot* de VEGF, VEGFR1, VEGFR2, eNOS e iNOS no músculo sóleo. Comparado ao grupo WKY sedentário, o TF aumentou os níveis protéicos periféricos de VEGF e VEGFR2 no grupo WKY-T (FIGURA 35B e C, respectivamente). Por outro lado, no grupo SHR os níveis protéicos de VEGF foram significantemente menores comparado aos níveis protéicos do grupo WKY, porém o TF conseguiu restaurar os níveis de VEGF no grupo SHR-T (FIGURA 35B). Além disso, a recuperação de VEGF no grupo SHR-T foi acompanhado por um aumento nos níveis protéicos do VEGFR2 (FIGURA 35C). Entretando, não existiu nenhuma diferença significante nos níveis protéicos do VEGFR1 entre todos os grupos estudados (FIGURA 35D).

Interessantemente, como mostrado na FIGURA 35E, e similar ao comportamento dos níveis protéicos de VEGF, foram os resultados obtidos para os níveis protéicos para eNOS, indicando que VEGF e eNOS poderiam atuar sinergicamente para um apropriado crescimento vascular assim como para mobilização de CPE. Como um fator inflamatório, os níveis protéicos de iNOS foram aumentados no grupo SHR comparado ao grupo WKY, porém o TF reduziu este níveis protéicos tanto para o grupo SHR-T como para o WKY-T (FIGURA 35F).

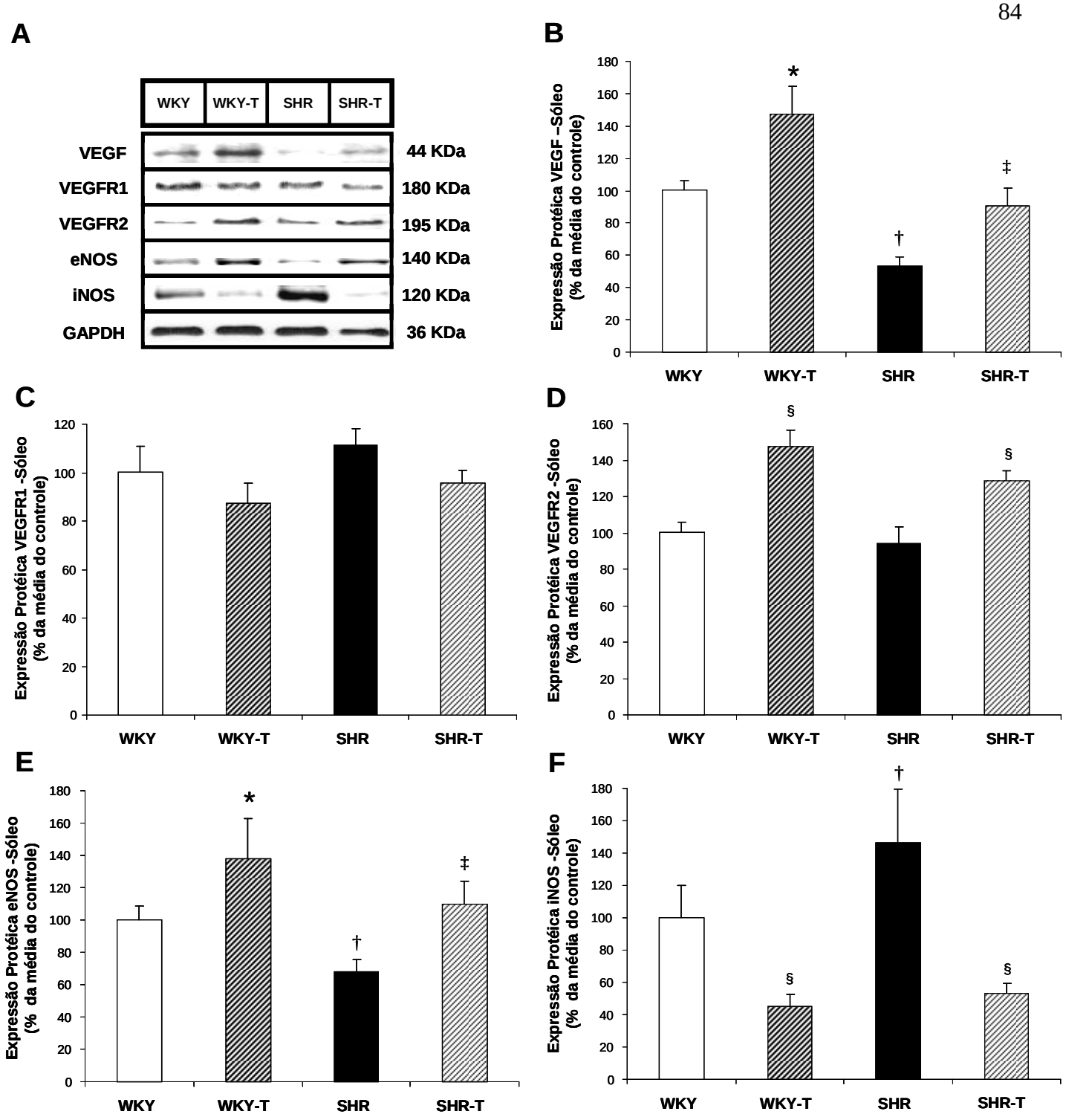


FIGURA 35 – Efeito do TF aeróbio sobre os fatores angiogênicos e mobilizadores de CPE na HA. Blots representativos de VEGF, VEGFR1, VEGFR2, eNOS, iNOS e GAPDH de WKY, WKY-T, SHR, SHR-T (A). Níveis protéicos de VEGF, VEGFR1, VEGFR2, eNOS e iNOS no músculo sóleo analisados por western blot, respectivamente (B-F). As bandas alvo foram normalizadas pela proteína GAPDH muscular esquelética.

Os resultados estão expressos como média ± EPM. * p< 0,05 vs. WKY, SHR e SHR-T; † p< 0,05 vs. WKY, WKY-T e SHR-T; ‡ p< 0,05 vs. WKY-T e SHR; § p< 0.05 vs. WKY e SHR.

6.15 Quantificação de Fatores Anti e Pró- Apoptóticos na Microcirculação

Recentes estudos têm demonstrado que os mecanismos envolvidos na inibição do processo angiogênico estão associados com um aumento na expressão de vários genes relacionados a apoptose, considerando um significante aumento na morte de células endoteliais e suas progenitoras no músculo esquelético (DE RESENDE, AMARAL, MUNZENMAIER & GREENE, 2006).

Nós investigamos vias regulatórias chave que controlam a resposta molecular para apoptose, principalmente a família Bcl-2. Essas proteínas interagem funcionalmente por atuarem uma sobre as outras no controle do pocesso apoptótico. Sabe-se, principalmente, que as proteínas Bcl-2 e Bcl-x suprimem e as proteínas Bad e p-Bad_{ser112} promovem apoptose (ROSSÉ, OLIVIER, MONNEY, RAGER, CONUS, FELLAY, JANSEN & BORNER, 1998; HENGARTNER, 2000; BORNER, 2003).

A FIGURA 36 mostra os níveis protéicos avaliados por *western blot* de Bcl-2, Bcl-x, Bad e p-Bad_{ser112} no músculo sóleo. Os níveis protéicos das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-x foram similares entre os grupos WKY e WKY-T (FIGURA 36B e C, respectivamente). Além disso, nenhuma mudança nos níveis protéicos da proteína pró-apoptótica Bad assim como no seu sítio de fosforilação na Serina 112 foram observadas no grupo WKY-T comparado ao seu controle sedentário WKY (FIGURA 36D e E, respectivamente). Em contraste, o grupo SHR apresentou um pronunciado aumento nos níveis protéicos da proteína pró-apoptótica Bad e diminuição desses níveis no seu sítio de fosforilação Serina 112, bem como da razão p-Bad_{ser112}/Bad comparados ao grupo WKY (FIGURA 36D, E e F, respectivamente), acompanhados por uma redução dos níveis protéicos das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-x (FIGURA 36B e C, respectivamente). Interessantemente, como mostrado pelas FIGURAS 36A-F, o TF restaurou os níveis protéicos das proteínas anti e pró-apoptóticas no grupo SHR-T, trazendo para valores similares ao grupo controle.

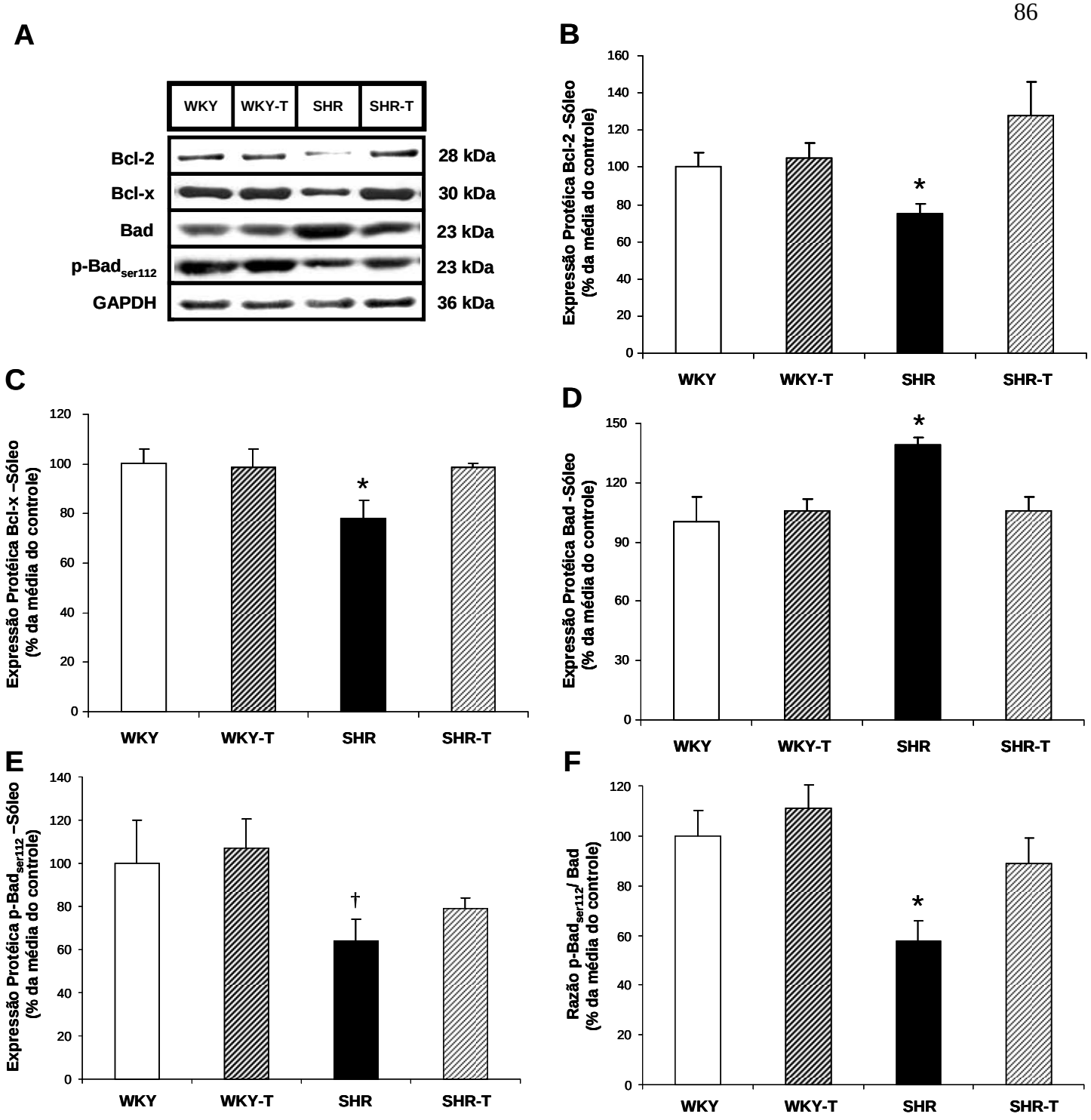


FIGURA 36 – Efeito do TF aeróbio sobre as proteínas regulatórias da apoptose no músculo esquelético na HA. Blots representativos de Bcl-2, Bcl-x, Bad, p-Bad$_{ser112}$ e GAPDH de WKY, WKY-T, SHR, SHR-T (A). Níveis protéicos de Bcl-2, Bcl-x, Bad e p-Bad$_{ser112}$ no músculo sóleo analisados por western blot, respectivamente (B-F). As bandas alvo foram normalizadas pela proteína GAPDH muscular esquelética. Os

resultados estão expressos como média ± EPM. * p< 0,05 vs. WKY, WKY-T e SHR-T; † p< 0,05 vs. WKY e WKY-T.

7 DISCUSSÃO

Extensivos achados no âmbito experimental e clínico mostram que o desequilíbrio do tônus vasomotor e anormalidades da estrutura microvascular fortemente suportam a hipótese da doença vascular como um importante e primário processo na patogênese da HA (GREENE, TONELLATO, LUI, LOMBARD & COWLEY, 1989; ANTONIOS, SINGER & MARKANDU, 1999; LÉVY, AMBROSIO, PRIES & STRUIJKER-BOUDIER, 2001; FEIHL, LIAUDET, WAEBER & LÉVY, 2006). Em acordo, um crítico mecanismo de início, manutenção e progressão da hipertensão parece envolver a inativação das CPE, responsáveis pelos processos de reparo e formação de vasos sanguíneos (LOOMANS, DAO, VAN ZOMMEVELD & RABELINK, 2004; VAN ZONNEVELD & RABELINK, 2006; GIANNOTTI, DOERRIES, MOCHARLA, MUELLER, BAHLMANN, HORVÀTH, JIANG, SORRENTINO, STEENKEN, MANES, MARZILLI, RUDOLPH, LÜSCHER, DREXLER & LANDMESSER, 2010).

Considerando as alternativas e uma maior efetividade de tratamento para HA, o TF aeróbio tem sido intensivamente investigado. Modificações no estilo de vida, tais como, a introdução da prática regular de exercício físico aeróbio tem se mostrado efetiva como medida não-farmacológica no tratamento da HA, prevenindo e reduzindo os níveis tensionais elevados, além de auxiliar no controle de outros fatores de risco, como o peso corporal, a dislipidemia, a resistência à insulina e o estresse (NELSON, JENNINGS, ESLER & KORNER, 1986; AMARAL, ZORN & MICHELINI, 2000; HAGBERG, PARK & BROWN, 2000; AMARAL, SILVEIRA, ZORN & MICHELINI, 2001; MELO, MARTINHO & MICHELINI, 2003; FAGARD, 2005; BRUM, RONDON, DA SILVA & KRIEGER, 2006; VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2010).

Os diversos benefícios promovidos pelo efeito do TF aeróbio no sistema cardiovascular (NEGRÃO, SANTOS & ALVES, 2005) conduziram este estudo a

avaliar se esta medida não-farmacológica é capaz de reverter alterações vasculares induzidas pela hipertensão permeando desde suas células progenitoras aos vasos já constituídos, que promovem um incremento da resistência vascular periférica, considerada a principal causa do desenvolvimento da HA essencial (INTENGAN & SCHIFFRIN, 2000; CORNELISSEN & FAGARD, 2005).

No presente estudo, foi utilizado o modelo de SHR e seus controles WKY para estudar a influência da HA essencial sobre a cinética das CPE e as mudanças na microcirculação muscular esquelética. Além disso, fomos os primeiros na literatura a availar o efeito do TF na correção do número e da disfunção das CPE, bem como sobre a rarefação capilar e os possíveis mecanismos envolvidos nessas alterações favorecendo a regressão da doença.

Os principais resultados do estudo mostram que o TF aeróbio sobre a HA: 1) aumentou os marcadores de TF aeróbio, 2) reduziu a PA, 3) corrigiu a rarefação capilar e as mudanças na distribuição dos tipos de fibra muscular, 4) restaurou o número e a função das CPE da MO, 5) reduziu a senescência das CPE da MO, 6) normalizou o número e a função das CPE do SP, 7) restaurou os fatores angiogênicos e mobilizadores de CPE e 8) desativou as vias apoptóticas periféricas.

7.1 Marcadores de Treinamento Físico Aeróbio e Efeito Sobre as Respostas Hemodinâmicas

Para determinar se o protocolo de TF utilizado foi efetivo em produzir adaptações aeróbias nos grupos de animais treinados nós mensuramos os principais marcadores fisiológicos de treinamento. A melhora na capacidade de trabalho aeróbio representada pela maior tolerância à realização de esforço físico e maior VO_2, concomitante com o aumento da atividade oxidativa muscular esquelética e a presença de bradicardia de repouso são as mais legítimas adapatações muscular esquelética e cardíaca do condicionamento aeróbio (WIBOM, HULTMAN, JOHANSSON, MATHEREI, CONSTANTIN-TEODOSIU & SCHANTZ, 1992; EVANGELISTA, BRUM & KRIEGER, 2003; MEDEIROS, OLIVEIRA, GIANOLLA, CASARINI, NEGRÃO & BRUM, 2004; EVANGELISTA & KRIEGER, 2006; OLIVEIRA, SASAKI, CERÊNCIO, BARAÚNA & KRIEGER, 2009).

7.1.1 Teste de Tolerância ao Esforço Físico Máximo

O teste de esforço físico máximo é utilizado como uma ferramenta para avaliar o desempenho físico após um período de TF aeróbio. Sendo assim, visando testar a eficácia do treinamento, conseqüentemente, uma maior tolerância a realização de um exercício aeróbio. Os animais foram submetidos ao teste em esteira rolante até a exaustão pré e pós o período de TF de natação. A caracterização da incapacidade de correr dos animais pode ser quantificado por parâmetros obtidos no teste como a distância percorrida, tempo e velocidade máxima de execução do teste (BERNSTEIN, 2003).

Os resultados de velocidade, tempo e distância percorrida máxima atingida no teste de esforço realizado pré TF demonstram que os ratos dos quatro grupos experimentais estudados atingiram valores similares nos parâmetos mencionados no teste de esforço progressivo. Entretanto, ao final do protocolo experimental os resultados demonstram que os ratos do grupo submetido ao TF de natação (WKY-T e SHR-T), em um período de 10 semanas, foram capazes de alcançar uma maior velocidade, tempo e distância máxima percorrida que os animais que foram mantidos sedentários. Dessa forma, esses resultados mostram o efeito do TF aeróbio sobre a melhora da capacidade de execução de exercícios aeróbio, confirmando a relação entre a melhora na capacidade máxima de realização de esforço físico e TF.

Assim, corroborando com os nossos resultados, estudos vêm demonstrando uma relação direta entre o TF e uma melhora na capacidade de tolerância ao esforço através da mensuração das variáveis acima apontadas. Desta forma, o teste em esteira até a exaustão vem sendo bastante utilizado para a verificação da capacidade aeróbia em animais de experimentação, incluso para o modelo de HA proposto, o SHR (KOCH & BRITTON, 2001; MELO, JR MARTINHO & MICHELINI, 2003; EVANGELISTA & KRIEGER, 2006).

Embora pouco questionado, o teste de capacidade de esforço máximo recebe críticas na literatura por ser subjetivo e não oferecer medida real da resposta fisiológica ao TF aeróbio (BERNSTEIN, 2003). Dessa forma, o VO_2 máximo frequentemente é mais utilizado por fornecer uma medida eficiente e reprodutível da função cardiopulmonar e desempenho no exercício físico.

7.1.2 Consumo de Oxigênio (VO_2)

Depois da análise do teste de tolerância ao esforço físico realizamos em conjunto a medida do VO_2 pico dos animais com intuito de melhor determinar a capacidade de trabalho aeróbio.

O VO_2 máximo retrata a capacidade máxima do organismo de extrair oxigênio. Esta é a medida que melhor avalia a potência aeróbia, ou seja, a quantidade máxima de energia que pode ser transformada em trabalho aeróbio das fibras musculares por unidade de tempo (DENADAI, ORTIZ & MELO, 2004).

Similar aos resultados obtidos com o teste de esforço físico máximo foi obtido com a análise de VO_2 pico. Os resultados de VO_2 pico atingido no teste realizado no início do protocolo experimental demonstram que os ratos dos quatro grupos estudados atingiram valores semelhantes. Entretanto, ao final do protocolo experimental os resultados demonstram que os ratos do grupo submetido ao TF de natação (WKY-T e SHR-T), em um período de 10 semanas, foram capazes de atingir valores maiores de VO_2 pico que os animais que foram mantidos sedentários (WKY e SHR). Além disso, pode-se observar que os animais mantidos sedentários apresentaram uma redução no nível médio de VO_2 pico quando comparados aos seus valores pré TF. Isto pode ser explicado pelo fato do consumo de oxigênio máximo/ pico reduzir com o avançar da idade, além de ser influenciado pelo sedentarismo (PATERSON & CUNNINGHAM, 1992; HEPPLE, HAGEN, KRAUSE & JACKSON, 2003). Dessa forma, esses resultados mostram o efeito do TF aeróbio sobre a melhora da capacidade de execução de exercícios aeróbio, confirmando a forte relação existente entre o aumento do VO_2 pico e o TF.

Assim, o resultado está compatível ao encontrado na literatura, em que ratos treinados aerobicamente apresentaram uma manutenção e/ou aumento dos valores do VO_2 pico e uma redução desses valores nos animais controle pós perído experimental, quando comparados ao início do protocolo (MELO, JR MARTINHO & MICHELINI, 2003; EVANGELISTA, MARTUCHI, NEGRÃO & BRUM, 2005).

7.1.3 Atividade da Enzima Citrato Sintase Muscular Esquelética

As adaptações fisiológicas resultantes do TF aeróbio proporcionam uma maior habilidade do sistema cardiorespiratório em ofertar oxigênio e sustratos

energéticos para o tecido muscular, e este por sua vez, utilizá-los mais eficientemente durante o TF. No músculo esquelético, a melhora do rendimento está associada á alta densidade mitocondrial, a capacidade oxidativa e a angiogênese (HOLLOSZY & COYLE, 1984; HOPPELER, HOWALD, CONLEY, LINDSTEDT, CLAASSEN, VOCK & WEIBEL, 1985; AMARAL, ZORN & MICHELINI, 2000; AMARAL, SILVEIRA, ZORN & MICHELINI, 2001; SOCI, REDONDO, FERNANDES, DE ANGELIS, IRIGOYEN, COELHO & OLIVEIRA, 2009).

Nesse sentido, um indicativo importante que demonstra a otimização do metabolismo aeróbio é o aumento da capacidade do sistema oxidativo. Esta adaptação metabólica pode ser identificada através de diversas enzimas oxidativas, as quais têm sido utilizadas na literatura como marcadores de TF aeróbio. A enzima citrato sintase é uma das mais importantes para regulação das vias metabólicas de geração de energia, pois catalisa a primeira reação do ciclo de Krebs e consequentemente gera energia via metabolismo aeróbio (LEHNINGER, 1991; SIU, DONLEY, BRYNER & ALWAYS, 2003). Neste estudo a atividade da enzima oxidativa citrato sintase no músculo sóleo aumentou 39,5% no grupo WKY-T e 67,5% no grupo SHR-T em relação ao grupo normotenso controle, demonstrando a efetividade do programa de TF utilizado neste estudo.

Confirmando os dados obtidos, estudos prévios da literatura mostram que tanto o treinamento em esteira (SIU, DONLEY, BRYNER & ALWAYS, 2003) quanto o de natação (VIHKO, SALMINEN & RANTAMAKI, 1978) aumentam a atividade da enzima citrato sintase muscular. Estudos realizados no nosso laboratório demonstram um aumento significativo na atividade da enzima no músculo sóleo induzido pelo TF de natação, próximo aos encontrados em nosso presente estudo, o que denota uma medida eficiente e reprodutível como marcador de treinamento aeróbio (EVANGELISTA, BRUM & KRIEGER, 2003; MEDEIROS, OLIVEIRA, GIANOLLA, CASARINI, NEGRÃO & BRUM, 2004; OLIVEIRA, SASAKI, CERÊNCIO, BARAÚNA & KRIEGER, 2009).

7.1.4 Pressão Arterial e Frequência Cardíaca

Além das adaptações periféricas já descritas, o exercício físico aeróbio realizado regularmente promove importantes adaptações autonômicas e

hemodinâmicas que vão influenciar o sistema cardiovascular (RONDON & BRUM, 2003). Dentre elas, o comportamento da freqüência cardíaca de repouso, também denominada de bradicardia de repouso, consiste em um bom parâmetro funcional para verificação de adaptação e eficácia do TF aeróbio, portanto, também considerada um marcador fisiológico do TF aeróbio. Esta adaptação é observada tanto em animais de experimentação (NEGRÃO, MOREIRA, BRUM, DENADAI & KRIEGER, 1992; EVANGELISTA, BRUM & KRIEGER, 2003; MEDEIROS, OLIVEIRA, GIANOLLA, CASARINI, NEGRÃO & BRUM, 2004; OLIVEIRA, SASAKI, CERÊNCIO, BARAÚNA & KRIEGER, 2009) como no homem (KATONA, McLEAN, DIGHTON & GUZ, 1982; PUIG, FREITAS, CARVALHO, PUGA, RAMOS, FERNANDES, COSTA & FREITAS, 1993; AZEVEDO, BRUM, ROSEMBLATT, PERLINGEIRO, BARRETTO, NEGRÃO & MATOS, 2007).

Estudos prévios demonstram que a magnitude da bradicardia de repouso é dependente do tipo, intensidade e espécie submetida ao TF aeróbio. Como podemos observar, estudos mostram uma maior bradicardia de repouso em animais treinados em natação (MEDEIROS, OLIVEIRA, GIANOLLA, CASARINI, NEGRÃO & BRUM, 2004), do que em esteira rolante (NEGRÃO, MOREIRA, SANTOS, FARAH & KRIEGER, 1992). De fato, SCHAIBLE & SCHEUER (1979) comprovaram as adaptações cardiovasculares ao TF de natação e esteira durante 8 semanas e mostraram que os animais treinados em natação tinham uma badicardia de repouso maior do que os treinados em esteira na mesma intensidade de treino (75% do VO_2 máx). Entretanto, existem trabalhos controversos na literatura, em que demonstram que o TF em esteira pode apresentar maior bradicardia (WISLOFF, HELGERUD, KEMI & ELLINGSEN, 2001), sugerindo que a intensidade do exercício adequada ao animal pode contribuir para uma maior bradicardia.

Neste estudo observamos que os grupos submetidos ao protocolo de TF apresentaram redução significante na frequência cardíaca de repouso após o final do protocolo experimental quando comparado a sua frequência cardíaca inicial, o que não foi observado nos outros grupos que foram mantidos sedentários. Os mecanismos pelo qual esta bradicardia ocorre parecem ser fortemente influenciados pelo tipo de TF e também por DCV, como a HA (BRUM, FORJAZ, TINUCCI & NEGRÃO, 2004). Em ratos normotensos, esta bradicardia de repouso resultante do

TF aeróbio em esteira está associada a uma redução na frequência cardíaca intrínseca (NEGRÃO, MOREIRA, SANTOS, FARAH & KRIEGER, 1992; EVANGELISTA, MARTUCHI, NEGRÃO & BRUM, 2005), entretanto, animais submetidos ao protocolo de natação parecem apresentar bradicardia de repouso por um aumento do tônus vagal (MEDEIROS, OLIVEIRA, GIANOLLA, CASARINI, NEGRÃO & BRUM, 2004). Além disso, em ratos hipertensos esta bradicardia parece estar associada a uma redução do tônus simpático cardíaco (GAVA, VÉRAS-SILVA, NEGRÃO & KRIEGER, 1995).

Já a adaptação da PA pelo TF parece depender da presença da HA. De fato, estudos mostraram que a resposta de PA permanece inalterada em humanos e animais normotensos submetidos ao TF aeróbio (NEGRÃO, IRIGOYEN, MOREIRA, BRUM, FREIRE & KRIEGER, 1993; SILVA, BRUM, NEGRÃO & KRIEGER, 1997; DESAI, SATO, SCHAUBLE, BARSH, KOBILKA & BERNSTEIN, 1997; EVANGELISTA, BRUM & KRIEGER, 2003; BRUM, RONDON, DA SILVA & KRIEGER, 2006; LATERZA, DE MATOS, TROMBETTA, BRAGA, ROVEDA, ALVES, KRIEGER, NEGRÃO & RONDON, 2007). No presente estudo, consistente com os outros estudos acima mencionados, não houve diferença significante da PA entre os grupos normotensos treinado e sedentário, mostrando que o TF com natação não modifica a PA em repouso. Além disso, este efeito não parece ser inerente ao tipo de TF empregado quando comparado a modalidade em esteira com a natação, nem espécie dependente. No entanto, pode ser condicionada ao nível inicial de PA, já que populações hipertensas são beneficiadas com o TF aeróbio no que concerne a redução da mesma (BRUM, RONDON, DA SILVA & KRIEGER, 2006).

Estudos epidemiológicos vêm demonstrando nas últimas décadas a relação inversa existente entre o nível de condição física e o desenvolvimento de DCV (PAFFENBARGER, HYDE, WING, LEE, JUNG & KAMPERT, 1993; MYERS, PRAKASH, FROELICHER, DO, PARTINGTON & ATWOOD, 2002). Assim, a inatividade física está associada com maior risco de desenvolvimento de HA, sendo considerado o exercício físico regular um componente chave na prevenção e tratamento da HA, contribuindo, contudo, para à melhora dos outros fatores de risco cardiovascular.

Foram realizados na década de 60 os primeiros estudos que constataram o potencial efeito preventivo do TF aeróbio no controle e tratamento da PA, surgindo às primeiras evidências de redução na PA em indivíduos hipertensos que faziam exercício físico regular (HAMER, 1967; HANSON & NEDDE, 1970; BOYER, 1970).

Como esperado, observamos que os grupos hipertensos apresentavam níveis elevados de PA comparados aos grupos normotensos no início do protocolo experimental. Entretanto, ao término de 10 semanas de TF comprovamos a eficácia do treinamento de baixa intensidade e longa duração em reduzir a PAS, a PAD e a PAM do grupo SHR-T comparado ao grupo SHR. Estes resultados estão de acordo com os encontrados na literatura, confirmando a eficácia do TF aeróbio em reduzir a PA tanto de animais geneticamente hipertensos quanto de humanos hipertensos (SILVA, MATTOS, GAVA, BRUM, NEGRÃO & KRIEGER, 1997; VÉRAS-SILVA, MATTOS, GAVA, BRUM, NEGRÃO & KRIEGER, 1997; AMARAL, ZORN & MICHELINI, 2000; AMARAL, SILVEIRA, ZORN & MICHELINI, 2001; MELO, JR MARTINHO & MICHELINI, 2003; FAGARD, 2005; LATERZA, DE MATOS, TROMBETTA, BRAGA, ROVEDA, ALVES, KRIEGER, NEGRÃO & RONDON, 2007; ZAMO, LACCHINI, MOSTARDA, CHIAVEGATTO, SILVA, OLIVEIRA & IRIGOYEN, 2010).

A partir do estabelecimento da HA, todos os fatores causais são alterados e torna-se difícil indicar qual deles foram desencadeadores ou mantenedores da disfunção estabelecida. O mecanismo hemodinâmico envolvido na atenuação da HA pelo TF é a redução do débito cardíaco associado à bradicardia de repouso e redução da atividade nervosa simpática cardíaca (NEGRÃO, MOREIRA, SANTOS, FARAH & KRIEGER, 1992; GAVA, VÉRAS-SILVA, NEGRÃO & KRIEGER, 1995). Além disso, o TF restaura a diminuída sensibilidade barorreflexa induzida pela hipertensão, que são importantes para a regulação momento-a-momento da PA (SILVA, BRUM, NEGRÃO & KRIEGER, 1997; LATERZA, DE MATOS, TROMBETTA, BRAGA, ROVEDA, ALVES, KRIEGER, NEGRÃO & RONDON, 2007). Em humanos, um estudo de meta-análise realizado por CORNELISSEN & FAGARD (2005) demonstrou que o TF aeróbio diminui a PA através de uma redução na resistência vascular periférica, no qual o sistema nervoso simpático e o sistema renina angiotensina parecem estar envolvidos. De fato, estudo recente realizado em

indivíduos hipertensos demonstrou uma redução da atividade nervosa simpática muscular basal que foi positivamente correlacionada com a diminuição da PAM (LATERZA, DE MATOS, TROMBETTA, BRAGA, ROVEDA, ALVES, KRIEGER, NEGRÃO & RONDON, 2007). Dessa forma, qualquer alteração no sentido de potencializar a função vasoconstritora tem forte relação com o estabelecimento da hipertensão. Além disso, estudos com SHR demonstraram que a normalização da resistência vascular periférica mediada pela normalização da razão parede/luz vascular e da rarefação microvascular são cruciais para a redução da HA (AMARAL, ZORN & MICHELINI, 2000; AMARAL, SILVEIRA, ZORN & MICHELINI, 2001; MELO, JR MARTINHO & MICHELINI, 2003). Atualmente, um dos mecanismos que se tem discutido ser responsável pela HA é a alteração na bioatividade da CPE, o qual discutiremos em maior profundidade a seguir.

7.2 Efeito do Treinamento Físico Aeróbio Sobre as Alterações Estruturais e Metabólicas da Musculatura Esquelética Associadas à Hipertensão

O aumento da resistência vascular periférica, a responsável pela manutenção dos níveis pressóricos elevados na HA essencial, é conseqüência de alterações estruturais e funcionais na microcirculação que regulam o fluxo sanguíneo e a pressão. Estudos mostram que a redução da PA induzida pelo TF em SHR foi correlacionada com a normalização de ambos, razão parede/luz vascular e um maior aumento da razão capilar por fibra no músculo esquelético (AMARAL, ZORN & MICHELINI, 2000; AMARAL, SILVEIRA, ZORN & MICHELINI, 2001; MELO, JR MARTINHO & MICHELINI, 2003). De acordo, os resultados do presente estudo confirmam que o TF de natação normaliza a rarefação capilar no músculo esquelético de SHR, o qual contribui para a redução da elevada resistência periférica total, por promover o aumento da condutância paralela da microcirculação, ou seja, facilita a passagem do fluxo sanguíneo em decorrência do aumento do número de vasos da musculatura esquelética. Além disso, o TF aumenta a razão capilar por fibra no músculo esquelético de ratos normotensos treinados como demonstrado em vários estudos (AMARAL, ZORN & MICHELINI, 2000; AMARAL, SILVEIRA, ZORN & MICHELINI, 2001; MELO, JR MARTINHO & MICHELINI, 2003; SUZUKI, 2004).

Sabidamente, a angiogênese representa uma resposta adaptativa essencial do músculo esquelético ao TF aeróbio, contribuindo para a melhora da capacidade aeróbia muscular (transporte, fornecimento e extração de oxigênio) (AMARAL, PAPENEK & GREENE, 2001; LAUFS, WERNER, LINK, ENDRES, WASSMANN, JURGENS, MICHE, BOHM & NICKENIG, 2004; WAHL, BLOCK & SHMIDT, 2007). Por outro lado, músculos esqueléticos com alteração do suporte capilar e consequentemente prejuízo na oferta de oxigênio e nutrientes, sob várias condições, tais como, fatores de risco cardiovascular e DCV, estão relacionados a exibir uma mudança na distribuição dos tipos de fibra muscular em direção ao aumento de fibras do tipo II. A origem da transição de fibras do tipo I para II em músculo sóleo de SHR ainda permanece pouco conhecida, porém estudos demonstram estar relacionadas com a rarefação capilar acompanhada de mudanças nas propriedades metabólicas (NAGATOMO, GU, FUJINO, TAKEDA, TSUDA & ISHIHARA, 2009; BACURAU, JARDIM, FERREIRA, BECHARA, BUENO JÚNIOR, ALBA, NEGRÃO, CASARINI, CURI, RAMIRES, MORISCOT & BRUM, 2009).

Confirmando com os pressupostos acima, estudos mostram que quando ocorre à transição das fibras do músculo esquelético, as diferentes propriedades morfológicas da fibra muscular são transformadas em uma típica sequência temporal: a densidade capilar e as atividades das enzimas do metabolismo energético são alteradas precocemente durante a transformação e precedem a mudança na atividade da ATPase miofibrilar e as características contráteis do músculo (BROWN, COTTER, HUDLICKA & VRBOVA, 1976; BENBACHIR-LAMRINI, SEMPORE, MAYET & FAVIER, 1990).

Em mamíferos, as fibras do músculo esquelético são geralmente classificadas em fibras do tipo I e tipo II de acordo com as diferentes atividades da ATPase miosínica, após pré incubação em diferentes pH, podendo as do tipo II ser subclassificadas em IIA, IIX/D e IIB. As fibras do tipo II são caracterizadas por serem fibras de contração rápida com predominância do metabolismo glicolítico, ao passo que as fibras do tipo I são caracterizadas por serem fibras de contração lenta com predominância do metabolismo oxidativo (ARMSTRONG & PHELPS, 1984; HORI, ISHIHARA, KOBAYASHI & IBATA, 1998; NAKATANI, NAKASHIMA, KITA & ISHIHARA, 2003).

Acúmulo de evidências na literatura mostra que o músculo esquelético de indivíduos hipertensos, assim como de SHR contêm uma maior porcentagem de fibras de contração rápida e glicolítica, ou seja, as do tipo II comparados aos seus controles normotensos (BENBACHIR-LAMRINI, SEMPORE, MAYET & FAVIER, 1990; LEWIS, LEVI, BROOKSBY & JONES, 1994; BORTOLOTTO, STEPHENSON & STEPHENSON, 1999; NAGATOMO, GU, FUJINO, TAKEDA, TSUDA & ISHIHARA, 2009). Interessantemente, os resultados obtidos na composição dos tipos de fibra do músculo esquelético sóleo, músculo este utilizado neste estudo, que apresenta em média 90% de fibras do tipo I e 10% de fibras do tipo II, realizado tanto pela técnica de histoquímica pela reação da ATPase miosínica quando pela técnica de eletroforese em gel SDS-PAGE para detecção das miosinas de cadeia pesada (MHC) para cada tipo de fibra foram positivamente correlacionadas independente da técnica empregada (BORTOLOTTO, STEPHENSON & STEPHENSON,1999).

Segundo BORTOLOTTO, STEPHENSON & STEPHENSON (1999), o principal resultado obtido em seu estudo é que em todos os estágios de hipertensão (4, 16 e 24 semanas), o músculo sóleo de SHR continha estatisticamente significante uma maior proporção de fibras do tipo II do que o músculo sóleo de ratos WKY, bem como de fibras híbridas, fibras estas que contêm dois tipos de MHC em uma mesma fibra muscular isolada, no caso do SHR maior proporção de fibras híbridas IIA+IIX. A presença de maior proporção de fibras híbridas é um indicador de transição do tipo de fibra muscular no músculo em questão.

Similar aos resultados dos estudos expostos acima, no presente estudo, nós observamos no músculo sóleo de SHR comparado ao seu controle WKY uma significante alteração na distribuição dos tipos de fibra com uma diminuição de fibras de contração lenta e oxidativa, fibras do tipo I, e um simultâneo aumento na porcentagem de fibras do tipo II em paralelo com uma redução da razão capilar por fibra dessa musculatura, assim como uma pequena diminuição (12%) da atividade da citrato sintase. Notavelmente, nós mostramos pela primeira vez a evidênvia de que o TF aeróbio corrigiu as mudanças na composição dos tipos de fibra no músculo sóleo de SHR, uma vez que a capilarização e um aumento da atividade da enzima citrato sintase são importantes adaptações ao TF aeróbio, atuando na manutenção do metabolismo oxidativo e do perfil de fibra do músculo.

7.3 Efeito do Treinamento Físico Aeróbio Sobre as Alterações dos Fatores Angiogênicos e Apoptóticos da Musculatura Esquelética Associadas à Hipertensão

Como previamente elencado, vários mecanismos têm sido propostos para explicar a redução da PA induzida pelo TF na HA (ARAKAWA, 1993). A liberação de NO pelas células endotéliais tem um importante papel na manutenção do tônus basal do vaso, portanto na regulação da PA e distribuição do fluxo sanguíneo, contribuindo de maneira importante para as propriedades vasodilatadoras e para a manutenção da estrutura microvascular. A disfunção endotelial refere-se à redução nas propriedades vasoativas, anti-inflamatórias, anti-aterogênicas e anti-coagulantes derivadas do endotélio, sendo principalmente detectada por uma perda na biodisponibilidade de NO, constantemente observada na HA (GKALIAGKOUSI, DOUMA, ZAMBOULIS & FERRO, 2009).

O desequilíbrio no controle do tônus vascular observado na microcirculação na HA pode ser o resultado da excessiva vasoconstrição causando a oclusão de arteríolas de resistência e a não perfusão de capilares, induzindo a rarefação microvascular e a diminuição da condutância em paralelo da microcirculação muscular esquelética (GREENE, TONELLATO, LUI, LOMBARD & COWLEY, 1989; ANTONIOS, SINGER & MARKANDU, 1999; LÉVY, AMBROSIO, PRIES & STRUIJKER-BOUDIER, 2001; FEIHL, LIAUDET, WAEBER & LÉVY, 2006). Além disso, estudos demonstram que o *shear stress* endotelial conduz para uma sustentada liberação de eNOS e a ausência de fluxo sanguíneo, e portanto de NO, poderia conduzir a disfunção endotelial acompanhada por apoptose periférica e posteriormente perda de vasos não perfundidos na hipertensão, promovendo assim o quadro de rarefação microvascular. Dessa forma, a angiogênese é, sem dúvida, um essencial atributo para indivíduos hipertensos, visto que melhora o aporte sanguíneo para os tecidos reduzindo a PA, que está prejudicada pela alta resistência vascular periférica (GOBE, BROWNING, HOWARD, HOGG, WINTERFORD & CROSS, 1997; LÉVY, AMBROSIO, PRIES & STRUIJKER-BOUDIER, 2001; MELO, JR MARTINHO & MICHELINI, 2003; SUZUKI, 2004; FEIHL, LIAUDET, WAEBER & LÉVY, 2006).

Considerando as evidências, estudos mostraram que episódios de aumento do *shear stress* induzidos pelo TF aeróbio são progressivamente regulados

pelo remodelamento vascular dependente de NO, possibilitando tanto a melhora da função endotelial como a angiogênese (GREEN, MAIORANA, O'DRISCOLL & TAYLOR, 2004; VAN CRAENENBROECK, BECKERS, POSSEMIERS, WUYTS, FREDERIX, HOYMANS, WUYTS, PAELINCK, VRINTS & CONRAADS, 2010). De fato, a inibição da síntese de NO endotelial reduz a angiogênese em hipertensão experimental (STRUIJKER BOUDIER, LE NOBLE, MESSING, HUIJBERTS, LE NOBLE & VAN ESSEN, 1992; LEE, SALYAPONGSE, BRAGDONGA, SERÁS, WATKINS, EDINGTON & BILLIAR, 1999; KUBIS, RICHER, DOMERGUE, GIUDICELLI & LÉVY, 2002; KRIEFER, MISTELI, KALAK, TSCHUDIN, FINGERLE, KOOIJI, STUMM, SUMANOVSCKI, SIEBER & BATTEGAY, 2002), assim como estudos demonstram que a eNOS estimula a expressão de VEGF (DULAK, JOZKOWICZ, DEMBINSKA-KIEC, GUEVARA, ZDZIENICK, ZMUDZINSA-GROCHOT, FLOREK, WOJTOWICZ, SZUBA & COOKE, 2000), o que denota uma ação sinérgica entre os 2 fatores requerido para um apropriado crescimento vascular.

Não surpreendentemente, o VEGF é considerado o mais importante regulador da angiogênese, quimiotaxia e sobrevivência da célula endotelial, impossibilitando a ativação das vias de sinalização de apoptose, consequentemente a perda do capilar (NEUFELD, COHEN, GENGRINOVITCH & POLTORAK, 1999; FERRARA, 1999; AMARAL, PAPANEK & GREENE, 2001; FERRARA, GERBER & Le COUTER, 2003; BYRNE, BOUCHIER-HAYES & HARMEY, 2005). De fato, a deleção ou inibição do VEGF na musculatura esquelética de camundongos adultos tem mostrado efeitos nocivos, principalmente uma redução significante na densidade capilar com apoptose das células endoteliais tecidual (TANG, BREEN, GERBER, FERRARA & WAGNER, 2004).

Sabe-se que a resposta angiogênica mediada pela prática do exercício físico aeróbio regular envolve diversos mecanismos, tais como, o aumento do fluxo sanguíneo desencadeando o aumento do *shear stress* e da tensão na parede dos capilares, a hipóxia ativando o fator induzido pela hipóxia (HIF-1α), o sistema renina angiotensina, entre outros, os quais são responsáveis pela indução de fatores de crescimento vascular, principalmente o VEGF e o NO (AMARAL, PAPENEK & GREENE, 2001; PRIOR, YANG & TERJUNG, 2004). Apesar de a literatura mostrar que diversos fatores atuam como potenciais precursores de angiogênese no músculo

esquelético, o VEGF juntamente com a eNOS foram descritos como os mais importantes na promoção de formação de capilares com o TF aeróbio (LAUFS, WERNER, LINK, ENDRES, WASSMANN, JURGENS, MICHE, BOHM & NICKENIG, 2004; WAHL, BLOCK & SHMIDT, 2007; SOCI, REDONDO, FERNANDES, DE ANGELIS, IRIGOYEN, COELHO & OLIVEIRA, 2009). Além disso, a interação de VEGF com seu principal receptor angiogênico, o VEGFR2, receptor do tipo tirosina quinase, promove ativação de uma cascata de sinalização intracelular mediada principalmente pela via da PI3K/AKT que estimula a expressão de genes, como a eNOS, comprometidos principalmente com a vasodilatação, angiogênese e sobrevivência das células endoteliais (NEUFELD, COHEN, GENGRINOVITCH & POLTORAK, 1999; FERRARA, 1999; AMARAL, PAPANEK & GREENE, 2001; FERRARA, GERBER & Le COUTER, 2003; PRIOR, YANG & TERJUNG, 2004; BYRNE, BOUCHIER-HAYES & HARMEY, 2005).

Interessantemente, o VEGFR2 é mostrado ter baixa expressão em SHR e a utilização de terapia gênica como forma de tratamento da HA com o uso de transferência gênica de VEGF foi efetivo em melhorar o prejuízo da angiogênse e a proliferação endotelial em SHR (WANG, OLSZEWSKI, ROSEBURY, WANG, ROBERTSON & KEISER, 2004).

De fato, um prejuízo dos fatores angiogênicos periféricos no grupo SHR observado neste trabalho confirmam os dados demonstrados pela literatura supracitada, uma vez que nossos resultados apontam os níveis protéicos de eNOS e VEGF na microcirculação de SHR marcadamente reduzidos comparados aos do WKY, ocorrendo em paralelo a rarefação capilar. Dessa forma, parece concebível que as anormalidades da estrutura vascular seguida da perda de capilares são uma clara evidência do distúrbio do processo angiogênico que impossibilita a regeneração de microvasos funcionais no músculo esquelético de hipertensos.

Sabidamente, a rarefação capilar ocorre em paralelo à ativação da via apoptótica que repercute prejudicialmente sobre a angiogênese e a sobrevivência celular endotelial no músculo esquelético (DE RESENDE, AMARAL, MUNZENMAIER & GREENE, 2006). As proteínas Bcl-2/Bcl-x e Bad são importantes reguladores apoptóticos que atuam inibindo ou promovendo a apoptose, respectivamente

(ROSSÉ, OLIVIER, MONNEY, RAGER, CONUS, FELLAY, JANSEN & BORNER, 1998; HENGARTNER, 2000; BORNER, 2003; QUADRILATERO & RUSH, 2006).

Como mencionado, os sinais de sobrevivência endotelial envolvidos pela interação VEGF/VEGFR2 são predominantemente mediados pela via PI3K/AKT/eNOS implicados no aumento de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 e Bcl-x (NOR, CHRISTENSEN, MOONEY & POLVERINI, 1999), inibindo assim a ativação das caspases, conseqüentemente a apoptose, bem como favorecendo a angiogênese. Por outro lado, esta cascata de ativação pode inibir a atividade pró-apoptótica de Bad (DATTA, DUDEK, TAO, MASTERS, FU, GOTOH & GREENBERG, 1997). Entretanto, como observamos uma redução nos níveis de VEGF e eNOS em SHR, este controle dos mecanismos indutores e repressores de apoptose ficam prejudicados, culminando em uma redução da sobrevivência da célula endotelial e na promoção da rarefação microvascular na HA.

De fato, estudos da literatura evidenciam uma aumentada sinalização apoptótica do músculo sóleo em SHR comparado ao WKY, com aumento da expressão da proteína pró-apoptótica Bax, da atividade da caspase 3 e da fragmentação do DNA assim como redução nos níveis protéicos de Bcl-2 (QUADRILATERO & RUSH, 2006).

Consistente com os dados da literatura em mostrar maior expressão de proteínas pró-apoptóticas e redução das anti-apoptóticas na HA, nossos resultados indicam que o músculo sóleo de SHR apresenta um aumento na expressão de Bad e uma redução de Bcl-2 e Bcl-x. Sabe-se que a atividade pró-apoptótica de Bad é dependente da sua defosforilação, por outro lado inibir a atividade de Bad representa manter o peptídeo em forma inativa, ou seja, fosforilado (DATTA, DUDEK, TAO, MASTERS, FU, GOTOH & GREENBERG, 1997). De fato, comprovamos o aumento da atividade pró-ápoptótica de Bad em SHR, uma vez que verificamos uma diminuição da Bad fosforilada na Ser112 e da razão p-Bad_{ser112}/Bad. Além disso, nossos resultados mostraram que uma redução da síntese de NO endotelial acompanhada por um aumento na expressão protéica de iNOS poderia contribuir para uma moderada troca da homeostase redox em direção a um estado pró-oxidante corroborando para a ativação da via de sinalização pró-apoptótica microvascular, uma vez que o estresse oxidativo mediado pela HA promove prejuízo

da resposta vasodilatadora e apoptose da célula endotelial associada com a perda de microvasos (GOBE, BROWNING, HOWARD, HOGG, WINTERFORD & CROSS, 1997; KOBAYASHI, DELANO & SCHMID-SCHONBEIN, 2005; VANHOUTTE, SHIMOKAWA, TANG & FELETOU, 2009).

O estresse oxidativo, definido como o aumento na produção de oxidantes e uma redução na capacidade do sistema antioxidante, tem sido identificado como um denominador comum no desenvolvimento de diversas DCV, incluindo a HA. Dentre as espécies reativas de oxigênio o ânion superóxido ($O_2^{\cdot}$) é um dos principais radicais produzidos, e na hipertensão a reduzida disponibilidade de NO pode ocorrer devido à maior presença deste radical (KOBAYASHI, DELANO & SCHMID-SCHONBEIN, 2005; VANHOUTTE, SHIMOKAWA, TANG & FELETOU, 2009).

Importante corpo de conhecimento no campo do exercício físico nos mostra que os principais fatores que colaboram para o efeito do TF na HA compreendem a melhora da disfunção endotelial e da rarefação microvascular. Dentre as diversas alterações produzidas pelo efeito do TF, podemos citar a maior síntese e disponibilidade de NO, como um dos fatores que mais colaboram para a melhora do quadro observado na HA, sendo que a redução no estresse oxidativo principalmente por aumento do sistema antioxidante participa de maneira importante na maior disponibilidade de NO observado como efeito do TF (GREEN, MAIORANA, O'DRISCOLL & TAYLOR, 2004; HIGASHI & YOSHIZUMI, 2004).

Consistentes aos dados na literatura e de maneira notável foi o fato de o TF restaurar os níveis de VEGF, eNOS e iNOS acompanhado por um aumento na expressão de VEGFR2. Além disso, pela primeira vez na literatura, mostramos que os níveis dos fatores anti-apoptóticos Bcl-2 e Bcl-x foram normalizados na HA quando induzidos pelo TF, trazendo para valores semelhantes aos do WKY, ao passo que a sinalização pró-apoptótica foi reduzida com uma normalização dos níveis de Bad. Sabemos que Bad se transloca para a mitocôndria e forma uma um complexo pró-apoptótico com Bcl-x. A heterodimerização de Bad com Bcl-x previne o efeito anti-apoptótico de Bcl-x. Dessa forma, observamos que esta translocação é inibida pelo aumento dos fatores de sobrevivência como VEGF e VEGFR2 pelo TF que induz a fosforilação de Bad, conduzindo para seu sequestramento citosólico, consequentemente impedindo a sinalização apoptótica (FIGURA 37).

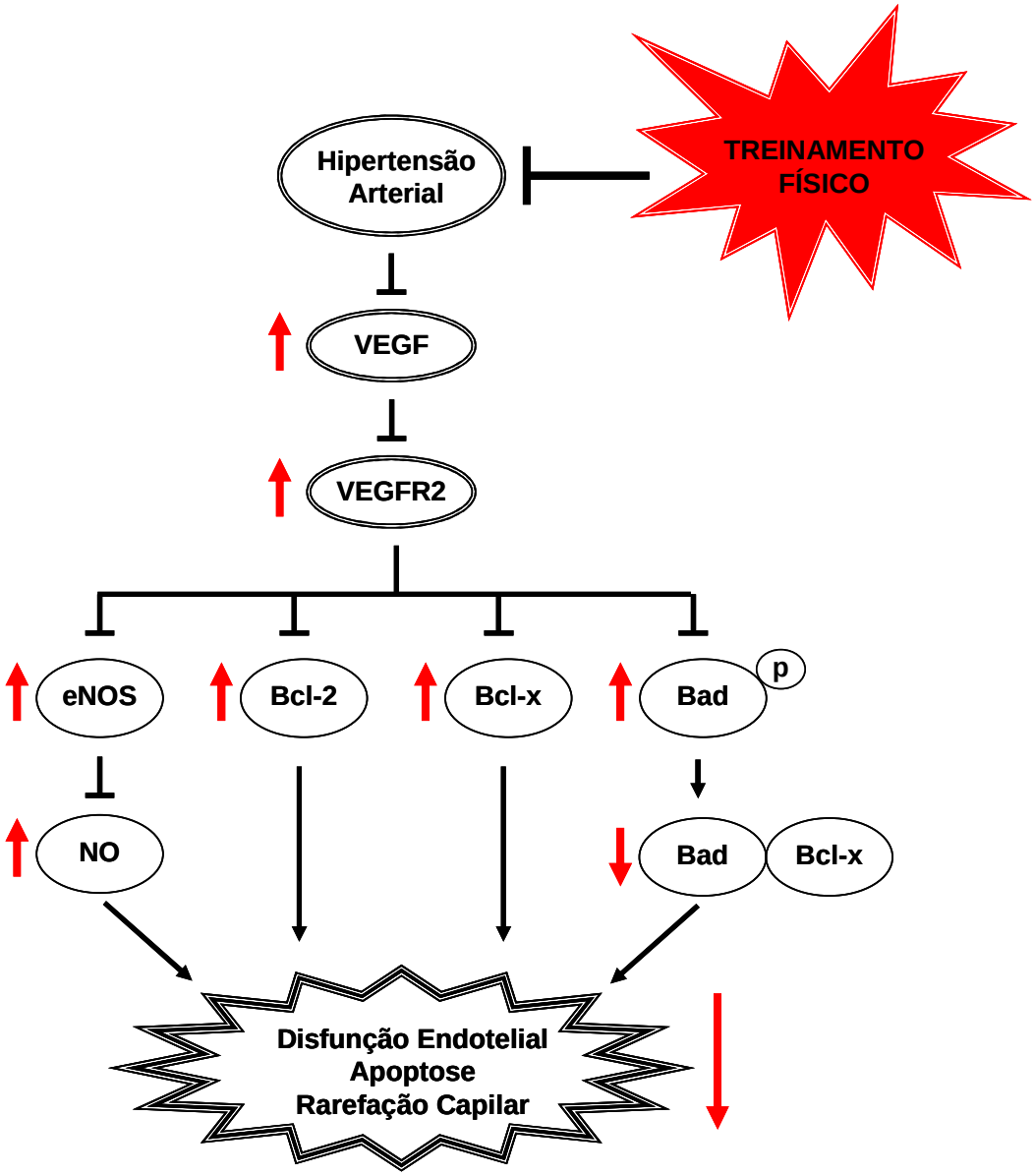


FIGURA 37- Mecanismo hipotetizado de sinalização de sobrevivência celular e angiogênese mediado pela interação VEGF-VEGFR2: prejuízo na HA e correção pós TF. A HA diminuiu os níveis de VEGF comprometendo, portanto, a sinalização mediada por sua interação com o VEGFR2, conduzindo para uma redução de eNOS e da biodisponibilidade de NO, assim como alteração da sinalização de sobrevivência com redução das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-x e aumentando a atividade pró-apoptótica pela defosforilação de Bad e maior interação Bad-Bcl-x. Interessantemente, sinalizado pelas setas em vermelho, o TF corrigiu estes parâmetros mediados pela HA, regredindo a doença.

Assim, os resultados obtidos sugerem que a permanência e a formação de novos capilares podem ser dependentes do balanço entre os fatores angiogênicos e apoptóticos, uma vez que interagem de maneira sinérgica para prevenir anormalidades microvasculares e manter a homeostase vascular. Além disso, um aumento dos níveis protéicos de eNOS, VEGF e VEGFR2 sem significante mudanças na sinalização apoptótica microvascular no grupo WKY-T comparado ao controle WKY pode representar uma potencial via de sinalização de angiogênese induzida pelo TF aeróbio.

Embora grandes avanços tenham sido feitos no entendimento da HA essencial, os mecanismos da disfunção endotelial e da rarefação microvascular permanecem não completamente elucidados; entretando estes parecem envolver cinética defeituosa das CPE derivadas da MO implicadas em promover uma reendotelização e a neovascularização (LOOMANS, DAO, VAN ZOMMEVELD & RABELINK, 2004; URBICH & DIMMELER, 2004; VAN ZONNEVELD & RABELINK, 2006, MILLER-KASPRZAK & JAGODZINSKI, 2007).

7.4 Efeito do Treinamento Físico Aeróbio Sobre as Alterações de Número, Senescência e Função das Células Progenitoras Endoteliais da Medula Óssea e Sangue Periférico Associadas à Hipertensão

Nos últimos anos o papel das CPE na manutenção e reparo vascular tem sido extensivamente investigado. Estudos mostram que as CPE são reduzidas em número e função em pacientes com fatores de risco para DCV, uma vez que alterações na bioatividade das CPE estão fortemente associdadas com a disfunção endotelial e alterações da estrutura vascular. Uma vez que a HA essencial também está atrelada a estas disfunções vasculares, é cabível inferir que um prejuízo no número, senescência e função das CPE poderiam contribuir para o desenvolvimento de anormalidades microvascular que conduziria para o aumento da resistência vascular periférica na HA essencial (LOOMANS, DAO, VAN ZOMMEVELD & RABELINK, 2004; URBICH & DIMMELER, 2004; VAN ZONNEVELD & RABELINK, 2006, MILLER-KASPRZAK & JAGODZINSKI, 2007; DIAS DA SILVA, MACHADO & VOLTARELLI, 2009).

Considerando as evidências, estudos mostram que, de fato, o número e a capacidade funcional das CPE são claramente alteradas pela HA essencial (LOOMANS, DAO, VAN ZOMMEVELD & RABELINK, 2004; VAN ZONNEVELD & RABELINK, 2006; DIAS DA SILVA, MACHADO & VOLTARELLI, 2009). Interessantemente, autores revelam que as CPE podem ser prejudicadas pela HA já dentro do compartimento da MO (IMANISHI, KOBAYASHI, HANO & NISHIO, 2005). Em recentes publicações, estudos com animais e humanos comprovam reduzidos níveis circulantes, prejudicada função e acelerada senescência das CPE na hipertensão (VASA, FICHTLSCHERER, AICHER, ADLER, URBICH, MARTIN, ZEIHER & DIMMELER, 2001; IMANISHI, KOBAYASHI, HANO & NISHIO, 2005; IMANISHI, MORIWAKI, HANO & NISHIO, 2005; PIRRO, SCHILLACI, MENECALI, BAGAGLIA, PALTRICCIA, VAUDO, MANNARINO & MANNARINO, 2007; OLIVERAS, SOLER, MARTINEZ-ESTRADA, VAZQUEZ, MARCO-FELIU, VILA, VILARO & LLOVERAS, 2008; GIANNOTTI, DOERRIES, MOCHARLA, MUELLER, BAHLMANN, HORVÀTH, JIANG, SORRENTINO, STEENKEN, MANES, MARZILLI, RUDOLPH, LÜSCHER, DREXLER & LANDMESSER, 2010).

Pela primeira vez na literatura, autores mostraram que a capacidade de reparo endotelial das CPE estava reduzida em pacientes pré-hipertensos, sendo este prejuízo mais exarcebado em pacientes com HA estabelida, os quais mostraram que esta disfunção das CPE estava positivamente correlacionada com a senescência das CPE e a disfunção endotelial. Com base nos resultados, os investigadores concluíram que as alterações das CPE em indivíduos pré-hipertensos representam um marcador precoce no desenvolvimento da HA, com significante papel na patogênese da disfunção endotelial e rarefação microvascular associados à HA (GIANNOTTI, DOERRIES, MOCHARLA, MUELLER, BAHLMANN, HORVÀTH, JIANG, SORRENTINO, STEENKEN, MANES, MARZILLI, RUDOLPH, LÜSCHER, DREXLER & LANDMESSER, 2010).

De acordo com estes achados e juntamento com os resultados obtidos no presente estudo, confirmamos os baixos números e disfunção das CPE da MO e SP em SHR.

Na tentativa de reversão do quadro patológico com base na melhora dos parâmetros das CPE na HA, o uso de drogas antihipertensivas, principalmente

inibidores do sistema renina angiotensina e hormônios parecem corrigir os efeitos deletérios sobre as CPE, reduzindo o acelerado processo de senescência, com melhora da função e desativação da sinalização pró-apoptótica nas CPE (IMANISHI, KOBAYASHI, HANO & NISHIO, 2005; YU, FUKUDA, YAO, MATSUMOTO, KOBAYASHI, SUZUKI, TAHIRA, UENO & MATSUMOTO, 2008). Similarmente, a terapia não farmacológica representada pelo TF restaurou os parâmetros das CPE promovendo uma melhora da função e capacidade de reparo vascular como a angiogênese tanto em indivíduos saudáveis (WAHL, BLOCK & SHMIDT, 2007; YANG, WANG, CHEN, LUO, TANG & TAO, 2007; WITKOWSHI & HAGBERG, 2007; HOETZER, VAN GUILDER, IRMIGER, KEITH, STAUFFER & DESOUZA, 2007; MOBIUS-WINKLER, HILBERG, MENZEL, GOLLA, BURMAN, SCHULER, ADAMS, 2009; SHANTSILA & LIP, 2009), quanto em portadores de doença da artéria coronária (LAUFS, WERNER, LINK, ENDRES, WASSMANN, JURGENS, MICHE, BOHM & NICKENIG, 2004; ADAMS, LENK, LINKE, LENZ, ERBS, SANDRI, TARNOK, GIELEN, EMMRICH, SCHULER & HAMBRECHT, 2004; STEINER, NIESSNER, ZIEGLER, RICHTER, SEIDINGER, PLEINER, PENKA, WOLZT, HUBER, WOJTA, MINAR & KOPP, 2005), insuficiência cardíaca (SARTO, BALDUCCI, BALCONI, FIORDALISO, MERLO, TUZZATO, PAPPAGALLO, FRIGATO, ZANOCCO, FORESTIERI, AZZARELLO, MAZZUCCO, VALENTI, ALBORINO, NOVENTA, VINANTE, PASCOTTO, SARTORE, DEJANA & LATINI, 2007), doença arterial periférica (SHAFFER, GREENE, ARSHI, SUPPLE, BANTLY, MOORE, PARMACEK & MOHLER, 2007), hemodiálise (MANFREDINI, RIGOLIN, SOFFRITTI, BOARI, CONCONI, CASTOLDI, CATIZONE, ZAMBONI & MANFREDINI, 2007) e a obesidade (WALTHER, GAEDE, ADAMS, GELBRICH, LEICHTLE, ERBS, SONNABEND, FIKENZER, KÖRNER, KIESS, BRUEGEL, THIERY & SCHULER, 2009).

Nós mostramos pela primeira vez aqui o efeito do TF sobre as CPE na hipertensão. Achados do presente estudo revelam que o TF não somente melhora os níveis e a capacidade funcional das CPE da MO e SP na HA, mas, de fato, restaura-os para valores similares aos animais controle normotensos. O aumento do número de CPE no SP induzido pelo TF na HA poderia ser associado com uma aumentada produção destas células dentro da MO. Além disso, como observado, um reduzido

processo de senescência das CPE na MO é sugerido como um possível pivô para a sobrevivência e restabelecimento da função das CPE (IMANISHI, MORIWAKI, HANO & NISHIO, 2005; VAN ZONNEVELD & RABELINK, 2006; GIANNOTTI, DOERRIES, MOCHARLA, MUELLER, BAHLMANN, HORVÀTH, JIANG, SORRENTINO, STEENKEN, MANES, MARZILLI, RUDOLPH, LÜSCHER, DREXLER & LANDMESSER, 2010), uma vez que o TF pode aumentar o número de CPE por um maior prolongamento de sua sobrevida (LAUFS, WERNER, LINK, ENDRES, WASSMANN, JURGENS, MICHE, BOHM & NICKENIG, 2004).

O acentuado nível observado de CPE na MO e a maior mobilização endógena das CPE da MO para o SP, ocorre em resposta a uma necessidade fisiológica para neovascularização que pode ser implicada com os maiores níveis de VEGF circulante e local, assim como de eNOS, mediados pelo TF.

De fato, vários estudos na literatura demonstram que o VEGF e a eNOS são uma das mais potentes moléculas desencadeadoras de liberação, *homing* e diferenciação das CPE (URBICH & DIMMELER, 2004; LAUFS, WERNER, LINK, ENDRES, WASSMANN, JURGENS, MICHE, BOHM & NICKENIG, 2004; ADAMS, LENK, LINKE, LENZ, ERBS, SANDRI, TARNOK, GIELEN, EMMRICH, SCHULER & HAMBRECHT, 2004; AICHER, ZEIHER & DIMMELER, 2005; STEINER, NIESSNER, ZIEGLER, RICHTER, SEIDINGER, PLEINER, PENKA, WOLZT, HUBER, WOJTA, MINAR & KOPP, 2005; SANDRI, ADAMS, GIELEN, LINKE, LENK, KRÄNKEL, LENZ, ERBS, SCHEINERT, MOHR, SCHULER & HAMBRECHT, 2005; WAHL, BLOCK & SHMIDT, 2007; WALTHER, GAEDE, ADAMS, GELBRICH, LEICHTLE, ERBS, SONNABEND, FIKENZER, KÖRNER, KIESS, BRUEGEL, THIERY & SCHULER, 2009). O VEGF contribui para neovascularização por aumentar a proliferação, mobilização, adesão e formação de tubo como capilar de CPE. Estes efeitos de VEGF sobre as CPE têm sido observados em camundongos após injeção intraperitoneal de VEGF humano recombinante (KALKA, MASUDA, TAKAHASHI, GORDON, TEPPER, GRAVEREAUX, PIECZEK, IWAGURO, HAYASHI, ISNER & ASAHARA, 2000) e em pacientes com isquemia periférica (ASAHARA, TAKAHASHI, MASUDA, KALKA, CHEN, IWAGURO, INAI, SILVER & ISNER, 1999). Em analogia, AICHER, HEESCHEN, MILDNER-RIHM, URBICH, IHLING, TECHNAU-IHLING,

ZEIHER & DIMMELER (2003) mostraram que camundongos eNOS$^{-/-}$ exibiam reduzida capacidade de mobilização das CPE.

Em suporte a importância de um aumento de eNOS e VEGF pelo TF para mobilização de CPE da MO para o SP, LAUFS, WERNER, LINK, ENDRES, WASSMANN, JURGENS, MICHE, BOHM & NICKENIG (2004) foram os primeiros a comprovarem que os efeitos benéficos do TF aeróbio sobre as CPE foram marcadamente reduzidas após inibição ou deleção gênica de eNOS, o qual sugere um aumento de CPE na MO e SP dependente de NO em resposta ao exercício aeróbio. Além disso, os mesmos autores mostraram que concomitante ao tratamento com o inibidor de NO, foi sufiente para abolir o aumento observado nos níveis de VEGF, sugerindo, mais uma vez, a interação sinérgica entre estes dois fatores na promoção de um apropriado crescimento vascular que permeia controlar desde as CPE à formação do capilar *in locu*. Interessantemente, pacientes com fatores de risco cardiovascular e DCV confirmaram o papel terapêutico do TF em recuperar a bioatividade das CPE por um aumento dependente de VEGF e NO (LAUFS, WERNER, LINK, ENDRES, WASSMANN, JURGENS, MICHE, BOHM & NICKENIG, 2004; ADAMS, LENK, LINKE, LENZ, ERBS, SANDRI, TARNOK, GIELEN, EMMRICH, SCHULER & HAMBRECHT, 2004; AICHER, ZEIHER & DIMMELER, 2005; STEINER, NIESSNER, ZIEGLER, RICHTER, SEIDINGER, PLEINER, PENKA, WOLZT, HUBER, WOJTA, MINAR & KOPP, 2005; SANDRI, ADAMS, GIELEN, LINKE, LENK, KRÄNKEL, LENZ, ERBS, SCHEINERT, MOHR, SCHULER & HAMBRECHT, 2005; WAHL, BLOCK & SHMIDT, 2007; WALTHER, GAEDE, ADAMS, GELBRICH, LEICHTLE, ERBS, SONNABEND, FIKENZER, KÖRNER, KIESS, BRUEGEL, THIERY & SCHULER, 2009).

Considerando todos os prévios achados, o uso do TF para doenças vasculares, como a HA, parece ser uma atrativa forma de terapia, uma vez que o mesmo promove aumento do VO_2 e fluxo sanguíneo no músculo esquelético, gerando adaptações benéficas relacionadas a uma elevada produção de VEGF e NO. Aumento nos níveis circulantes de VEGF e periféricos de VEGF/VEGFR2 e eNOS induzidos pelo TF na HA parece um dos prováveis mecanismos pelo restabelecimento dos parâmetros cinéticos e funcionais das CPE por criarem um ambiente de gradiente quimiotático ordenando respostas direcionadas de aumento

do número, recrutamento e diferenciação de CPE, promovendo o reparo do vaso, consequentemente melhorando a função endotelial, assim como a revascularização muscular; evideciando um papel no controle de anormalidades microvascular na HA, consequentemente de redução da PA.

Interessantemente, nós observamos que um aumento de VO_2 e da razão capilar por fibra muscular foram positivamente correlacionada com o aumento do número de CPE circulantes, sugerindo que a angiogênese muscular está diretamente relacionada com o aumento nos níveis de CPE induzidos pelo TF em SHR. Similarmente, observamos também uma correlação direta entre o VO_2 e a razão capilar por fibra muscular com a função das CPE avaliada pela capacidade de formação de unidades formadoras de colônia, revelando claramente que a formação de novos capilares pode ser dependente de uma melhora da função das CPE circulantes.

Corroborando com os achados prévios, as CPE mobilizadas pelo TF não somente atuam promovendo o reparo de vasos danificados e se incorporando dentro de vasos sanguíneos funcionais dando origem a novos vasos, mas também fornecem a liberação de uma gama de fatores de crescimento (KAMIHATA, MATSUBARA, NISHIUE, FUJIYAMA, TSUTSUMI, OZONO, MASAKI, MORI, TATEISHI, KOSAKI, SHINTANI, MUROHARA, IMAIZUMI & IWASAKA, 2001; GNECCHI, ZHANG, NI & DZAU, 2008), seria presumidamente providenciar sinais parácrinos às células endoteliais adjacentes, estimulando a angiogênese e a vasculogênese simultaneamente, demonstrando um adicional significado pelo qual as CPE derivadas da MO contribuem para o processo de revascularização e reendotelização; consequentemente na redução da PA na HA quando induzidas pelo TF.

Embora o mecanismo causal de normalização das CPE induzidas pelo TF em nosso estudo não aparece ainda diretamente esclarecido, a regulação dos fatores angiogênicos e de sobrevivência celular descritos e a interação entre eles suportam uma via em potencial para os resultos encontrados. Estudos adicionais alvejando a regulação das CPE pelo TF em doenças são necessários para o endendimento do multifatorial e coordenado processo de revascularização com foco

para a incorporação e diferenciação das CPE na estrutura vascular *in vivo* (FIGURA 38).

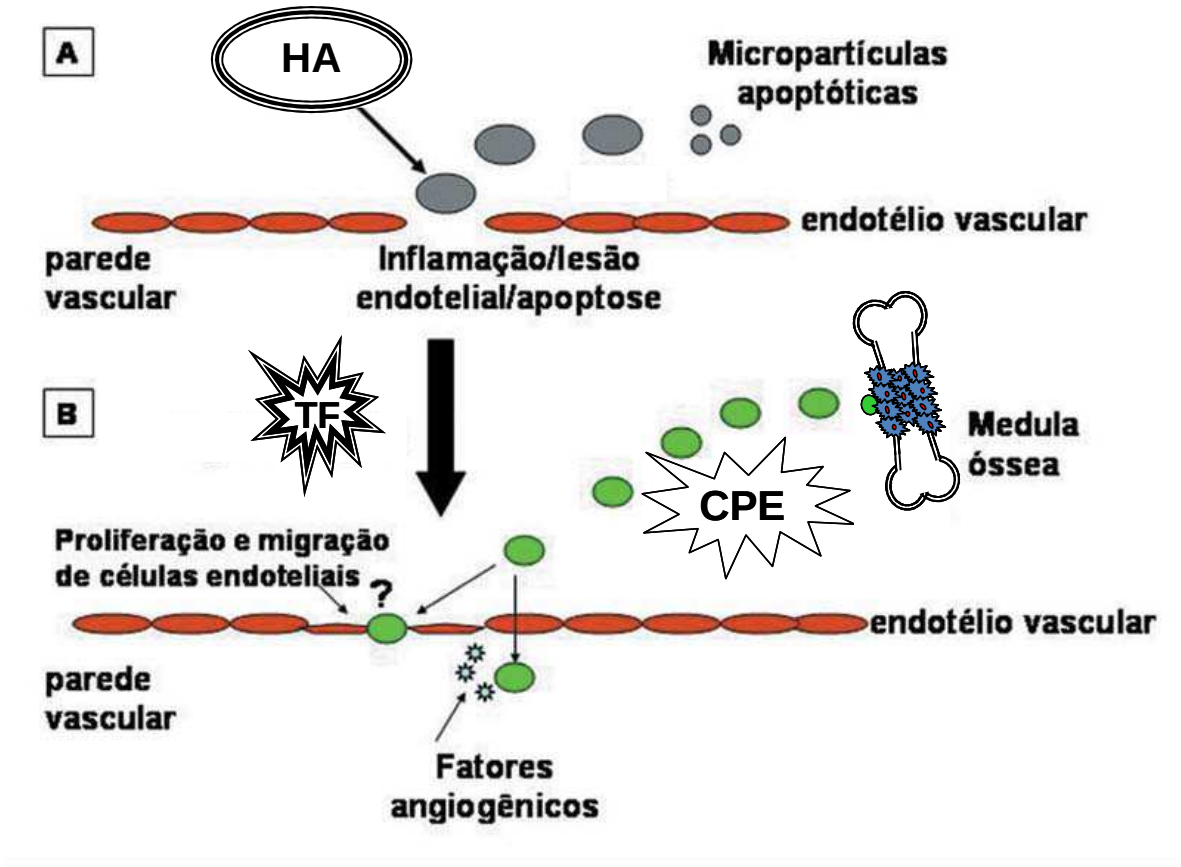


FIGURA 38 - Regeneração da microcirculação muscular esquelética induzida pelo TF após lesão vascular pela HA. A) A HA lesa o endotélio e, como conseqüência, causa apoptose e descamação de células endoteliais, contribuindo para a rarefação microvascular. B) O processo regenerativo endotelial mediado pelo TF pode ocorrer por duas vias: pela proliferação e migração de células endoteliais maduras localizadas na vizinhança da célula endotelial lesada por meio de liberação de fatores de crescimento vascular (VEGF e NO) e pela migração de CPE da medula óssea na parede vascular, liberando também fatores angiogênicos, ou pela incorporação direta das CPE no endotélio.

8 CONCLUSÃO

Este estudo revela alguns dos mecanismos celulares e moleculares do TF aeróbio sobre a revascularização muscular esquelética na HA. Estes incluem a normalização do número e função das CPE na MO e SP de SHR comparado a seus controles WKY. Estes achados ocorreram em sinergia com a correção da rarefação microvascular e a redução da PA. Os mesmos parecem ser associados com aumento nos níveis circulantes de VEGF e a restauração periférica de VEGF e eNOS acompanhada por uma reduzida inflamação e desativação das vias de apoptose marcadas pela aumento de Bcl-2, Bcl-x e p-Bad_{ser112} e uma redução de Bad. Em conclusão, todos os resultados, em conjunto, participam de um importante papel na revascularização, de modo que estão interligados por múltiplas vias culminando na manutenção da homeostase vascular. Assim, o TF pode recuperar o equilíbrio entre os processos de dano e reparo vascular conduzinho para regressão da HA.

9 PERSPECTIVAS

Nos últimos anos, um primoroso arsenal terapêutico dotado de grande eficácia para o tratamento da HA está disponível com grande impacto positivo na sobrevida dos pacientes. O TF tem sido reconhecido como uma importante ferramenta na prevenção e tratamento da HA, uma vez que melhora os fatores de risco e a qualidade de vida dos pacientes. Há poucos estudos na literatura que correlacionam a angiogênese e a função endotelial com a cinética das CPE sob qualquer intervenção não farmacológica na hipertensão; claramente um mecanismo crucial para o entendimento da homeostase vascular. Para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo sobre o efeifo do TF na HA sobre o perfil das CPE da MO e SP, mostrando uma melhora de seus parâmetros atrelados ao aumento dos fatores angiogênicos e mobilizadores de CPE com reduzido processo apoptótico. Estes achados indicam que a maior mobilização endógena das CPE em resposta ao TF pode caracterizar uma resposta atrativa por estimular a capacidade de reparo endotelial acompanhado por revascularização tecidual e correção da disfunção endotelial em doenças associadas com o dano vascular, como a HA.

REFERÊNCIAS

ADAMS, V.; LENK, K.; LINKE, A.; LENZ, D.; ERBS, S.; SANDRI, M.; TARNOK, A.; GIELEN, S.; EMMRICH, F.; SCHULER, G.; HAMBRECHT, R. Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 24: 684-690, 2004.

AICHER, A.; HEESCHEN, C.; MILDNER-RIHM, C.; URBICH, C.; IHLING, C.; TECHNAU-IHLING, K.; ZEIHER, AM.; DIMMELER, S. Essentinal role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. Nature Medicine. 09: 1370-1376, 2003.

AICHER, A.; HEESCHEN, C.; DIMMELER, S. The role of NOS3 in stem cell mobilization. Trends in Molecular Medicine. 10: 421-425, 2004.

AICHER, A.; ZEIHER, A.M.; DIMMELER, S. Mobilizing endothelial progenitor cells. Hypertension. 45: 321-325, 2005.

ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. The Biochemical Journal. 357: 593-615, 2001.

AMARAL, S.L.; SILVEIRA, N.P.; ZORN, T.M.; MICHELINI, L.C. Exercise training causes skeletal muscle venular growth and alters hemodynamic responses in spontaneously hypertensive rats. Journal of Hypertension. 19: 931-940, 2001.

AMARAL, S.L.; PAPANEK, P.E.; GREENE, A.S. Angiotensin II and VEGF are involved in angiogenesis induced by short-term exercise training. American Journal Physiology - Heart and Circulatory Physiology. 281: H1163-1169, 2001.

AMARAL, S.L.; ZORN, T.M.; MICHELINI, L.C. Exercise training normalizes wall-to-lumen ratio of the gracilis muscle arterioles and reduces pressure in spontaneously hypertensive rats. Journal of Hypertension. 18: 1563-1572, 2000.

AMBROSIO, G.; CARLUCCIO, E.; BENTIVOGLIO, M. Microcirculation in hypertension. In: Schmitd-Schonbein, G.H.; Granger, D.N. Molecular Basis for Microcirculatory Disorders. Paris: France, 607-618, 2003.

AMEISEN, J.C. On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. Cell Death & Differentiation. 9: 367-93, 2002.

ANTONIOS, T.F.; SINGER, D.R.J.; MARKANDU, N.D. Rarefaction of skin capillaries in borderline essential hypertension suggests an early structural abnormality. Hypertension. 34: 655-658, 1999.

ALP, P.R.; NEWSHOLME, E.A.; ZAMMIT, V.A. Activities of citrate synthase and NAD+-linked and NADP+-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. The Biochemical Journal. 154: 689-700, 1976.

ANVERSA, P.; KAJSTURA, J.; NADAL-GINARD, B.; LERI A. Primitive cells and tissue regeneration. Circulation Research. 92: 579–582, 2003.

ARAKAWA, K. Antihypertensive mechanism of exercise. Journal of Hypertension. 11:223-229, 1993.

ARMSTRONG, R.B.; PHELPS, R.O. Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. American Journal of Anatomy. 171: 259-272, 1984.

ASHKENAZI, A. Targeting death and decoy receptors of the tumor –necrosis factor superfamily. Nature Reviews Cancer. 2: 420-30, 2002.

ASAHARA, T.; MASUDA, H.; TAKAHASHI, T.; KALKA, C.; PASTORE, C.; SILVER, M.; KEARNEY, M.; MAGNER, M. & ISNER, J.M. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. Circulation Research. 85: 221-228, 1999.

ASAHARA, T.; MUROHARA, T.; SULLIVAN, A.; SILVER, M.; van der ZEE, R.; LI, T.; WITZENBICHLER, B.; SCHATTEMAN, G.; ISNER, J.M. Isolation of putative progenitor endothelial cell for angiogenesis. Science. 275: 964-967, 1997.

ASAHARA, T.; TAKAHASHI, T.; MASUDA, H.; KALKA, C.; CHEN, D.; IWAGURO, H.; INAI, Y.; SILVER, M.; ISNER, J.M. VEGF contributes to postanal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. The EMBO Journal. 18: 3964-3972, 1999.

AZEVEDO, L.F.; BRUM, P.C. ; ROSEMBLATT, D.; PERLINGEIRO, P.S; BARRETTO A.C.P.; NEGRÃO, C.E.; MATOS, L.D.N.J. Cardiac and Metabolic Characteristics of Long Distance Runners of the Sport and Exercise Cardiology Outpatient Facility of a Tertiary Hospital. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. 88: 16-23, 2007.

BACURAU, A.V.N.; JARDIM, M.A.; FERREIRA, J.C.B.; BECHARA, L.R.G.; BUENO JÚNIOR, C.; ALBA-LOUREIRO, T.C.; NEGRÃO, C.E.; CASARINI, D.E.; CURI, R.; RAMIRES, P.R.; MORISCOT, A.S.; BRUM, P.C. Sympathetic hyperactivity differentially affects skeletal muscle mass in developing heart failure: role of exercise training. Journal of Applied Physiology. 106: 1631-1640, 2009.

BEN BACHIR-LAMRINI, L.; SEMPORE, B.; MAYET, M.H.; FAVIER, R.J. Evidence of a slow-to-fast fiber type transition in skeletal muscle from spontaneously hypertensive rats. American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 258: 352-357, 1990.

BIROT, O.J. Exercise-iduced expression of vascular endothelial growth factor RNAm in rat skeletal muscle is dependent on fibre type. Journal of Physiology. 552: 213-221, 2003.

BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. Molecular Immunology. 39:615-47; 2003.

BORTOLOTTO, S.K.; STEPHENSON, D.G.; STEPHENSON, G.M.M. Fiber type populations and Ca2+activation properties of single fibers in soleus muscles from SHR and WKY rats. American Journal of Physiology - Cell Physiology. 276: 628-637, 1999.

BOYER, J.L. Exercise therapy in hypertensive men. The Journal of the American Medical Association. 211: 1668–1671, 1970.

BRANDAO, M.U.; WAJNGARTEN, M.; RONDON, E.; GIORGI, M.C.; HIRONAKA, F.; NEGRAO, C.E. Left ventricular function during dynamic exercise in untrained and moderately trained subjects. Journal of Applied Physiology. 75:1989-1995, 1993.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254, 1976.

BRITTEN, M.B.; ABOLMAALI, N.D.; ASSMUS, B.; LEHMANN, R.; HONOLD, J.; SCHMITT, J.; VOGL,T.J.; MARTIN, H.; SCHACHINGER, V.; DIMMELER, S.; ZEIHER, A.M. Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. Circulation. 108: 2212-2218, 2003.

BERNSTEIN, D. Exercise assessment of transgenic models of human cardiovascular disease. Physiological Genomics. 13: 217-226, 2003.

BROOKE, M.H.; KAISER, K.K. Muscle fiber types: how many and what kind?. Archives of Neurology. 23: 369-379, 1970.

BROOKS, G.A.; WHITE, T.P. Determination of metabolic and rate response of rats to treadmill exercise. American Journal of Physiology. 45: 1009-1014, 1978.

BROWN, M.D.; COTTER, M.A.; HUDLICKA, O.; VRBOVA, G. The effects of different patterns of muscle activity on capillary density, mechanical properties and structure of slow a fast rabbit muscle. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology. 361: 241-250, 1976.

BRUM, P.C.; FORJAZ, C.L.M.; TINUCCI, T.; NEGRÃO, C.E. Adaptações agudas e crônicas do exercício físico no sistema cardiovascular. Revista Paulista de Educação Física. 18: 21-31, 2004.

BRUM, P.C.; RONDON, M.U.P.B.; DA SILVA, G.J.J.; KRIEGER, E.M. Hipertensão arterial e exercício físico aeróbio. In: NEGRAO, C.E.; BARRETO, A.C.P. Cardiologia do exercício: do atleta ao cardiopata. Editora Manole (2ªed), p.167-78, 2006.

BRUM, P.C.; SILVA, G.J.J.; MOREIRA, E.D.; IDA, F.; NEGRAO, C.E.; KRIEGER, E.M. Exercise training increases baroreceptor gain sensitivity in normal and hypertensive rats. Hypertension. 36: 1018 –1022, 2000.

BYRNE, A.M.; BOUCHIER-HAYES, D.J.; HARMEY, J.H. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). Journal of Cellular and Molecular Medicine. 9: 777-794, 2005.

CHEN, J.; ZHANG, Z.G.; LI, Y.; WANG, L.; XU, Y.X.; GAUTAM, S.C.; LU, M.; ZHU, Z.; CHOPP, M. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. Circulation Research. 92: 692-699, 2003.

CHOI, K.; KENNEDY, M.; KAZAROV, A.; PAPADIMITRIOU, J.C.; KELLER, G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. Development. 125: 725-732, 1998.

CHOBANIAN, A.V.; BAKRIS, G.L.; BLACK, H.R.; CUSHMAN, W.C.; GREEN, L.A.; IZZO, J.L. JR, JONES, D.W.; MATERSON, B.J.; OPARIL, S.; WRIGHT, J.T. JR; ROCCELLA, E.J. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. Hypertension. 2003; 42: 1206-1252.

CHRISTENSEN, K.L.; MULVANY, M.J. Location of resistance arteries. Journal of Vascular Research. 38: 1-12, 2001.

COHEN, R.A.; SHEPHERD, J.T.; VANHOUTTE, P.M. Inhibitory role of the endothelium in the response of isolated coronary arteries to platelets. Science. 221: 273-274, 1983.

CORNELISSEN, V.A.; FAGARD, R.H. Effects of endurance training on blood pressure, blood pressure-regulating mechanisms, and cardiovascular risk factors. Hypertension. 46: 667-75, 2005.

DAHER, Z.; BOULAY, P.L.; DESJARDINS, F.; GRATTON, J.P.; CLAING, A. Vascular endothelial growth factor receptor-2 activates ADP-ribosylation factor 1 to promote endothelial nitric-oxide synthase activation and nitric oxide release from endothelial cells. The Journal of Biological Chemistry. 285: 24591-24599, 2010.

DAMIANI, D. Mecanismos da Apoptose. Manual de Patologia e Citopatologia Oncológica. 2004.

DATTA, S.R.; DUDEK, H.; TAO, X.; MASTERS, S.; FU, H.; GOTOH, Y.; GREENBERG, M.E. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. Cell. 91:231-241, 1997.

DE RESENDE, M.M.; AMARAL, S.L.; MUNZENMAIER, D.H.; GREENE, A.S. Role of endothelial cell apoptosis in regulation of skeletal muscle angiogenesis during high and low salt intake. Physiological Genomics. 25: 325-335, 2006.

DEBBABI, H.; UZAN, L.; MOURAD, J.J.; SAFAR, M.; LEVY, B.I.; TIBIRICA, E. Increased skin capillary density in treated essential hypertensive patients. American Journal of Hypertension. 19: 477-483, 2006.

DENADAI, B.S.; ORTIZ, M.J.; MELO, M.T. Índices fisiológicos associados com a performance aeróbica em corredores de endurance: efeitos da duração da prova. Revista Brasileira de Medicina do Esporte. 10: 401-404, 2004.

DIAS DA SILVA, V.J.; MACHADO, M.P.R.; VOLTARELLI, J.C. Current status of cell therapy for systemic arterial hypertension. Expert Review of Cardiovascular Therapy. 7:1307-1311, 2009.

DIMMELER, S.; AICHER, A.; VASA, M.; MILDNER-RIHM, C.; ADLER, K.; TIEMANN, M.; RÜTTEN, H.; FICHTLSCHERER, S.; MARTIN, H. & ZEIHER, A. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase / Akt pathway. The Journal of Clinical Investigation. 108: 391-397, 2001.

DIMRI, G.P.; LEE, X.; BASILE, G.; ACOSTA, M. ; SCOTT, G.; ROSKELLEY, C.; MEDRANO, E.E. ; LINSKENS, M. ; RUBEJ, I. ; PEREIRA-SMITH, O. ; PEACOCKE, M. ; CAMPISI, J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vitro. Proceedings of the National Academy of Sciences. 92: 9363-9367, 1995.

DUBEY, R.K.; OVERBECK, H.W. Culture of rat mesenteric arteriolar smooth muscle cells: effects of platelet-derived growth factor, angiotensin, and nitric oxide on growth. Cell and Tissue Research. 275: 133-141,1994.

DULAK, J.; JOZKOWICZ, A.; DEMBINSKA-KIEC, A.; GUEVARA, I.; ZDZIENICK, A.; ZMUDZINSA-GROCHOT, D.; FLOREK, I.; WOJTOWICZ, A.; SZUBA, A.; COOKE, J.P. Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 20: 659-666, 2000.

EARNSHAW, W.C.; MARTINS, L.M.; KAUFMANN, S.H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. Annual Review of Biochemistry. 68: 383-424, 1999.

EGUCHI, M.; MASUDA, H.; ASAHARA T. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. Clinical and Experimental Nephrology. 11: 18-25, 2007.

EVANGELISTA, F.S.; BRUM, P.C.; KRIEGER, J.E Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 36: 1751-1759, 2003.

EVANGELISTA, F.S.; KRIEGER, J.E. Small gene effect and exercise training-induced cardiac hypertrophy in mice: an Ace gene dosage study. Physiological Genomics. 27: 231-236, 2006.

EVANGELISTA, F.S.; MARTUCHI, S.E.; NEGRAO, C.E.; BRUM, P.C. Loss of resting bradycardia with detraining is associated with intrinsic heart rate changes. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 38: 1141-1147, 2005.

FAGARD, R.H. Physiscal ativity, physical fitness and incidence of hypertension. Journal of Hypertension. 23: 265-267, 2005.

FEIHL, F.; LIAUDET, L.; WAEBER, B.; LEVY, B.I. Hypertension: A disease of the microcirculation?. Hypertension. 48; 1012- 1017, 2006.

FERRARA, N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. Journal of Molecular Medicine. 77: 527-543, 1999.

FERRARA, N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. American Journal Physiology - Cell Physiology. 280: C1358-C1366, 2001.

FERRARA, N. VEGF and quest for tumor angiogenesis factors. Nature Reviews Cancer. 2: 795-803, 2002.

FERRARA, N.; GERBER, H.P.; LeCOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. Nature Medicine. 9: 669-676, 2003.

FERNANDES, T. Efeitos do treinamento físico aeróbio no número de células tronco medular e na regulação muscular esquelética dos componentes do SRA em ratas normotensas. Monografia-Escola de Educação Física e Esporte USP, 2006.

FLEMING, W.W. Membrane potential and vascular smooth muscle sensitivity. A minireview. Blood Vessels. 24: 108-112, 1987.

FORTUNO, M.A.; GONZALEZ, A.; RAVASSA, S.; LOPEZ, B.; DIEZ, J. Clinical implications of apoptosis in hypertensive heart disease. American Journal Physiology - Heart and Circulatory Physiology. 284: 1495-1506, 2003.

FRANCHINI, KGB. Circulações regionais. In: Fisiologia Básica. São Paulo: EDUSP, 1999.

FULTON, D.; GRATTON, J.P.; MCCABE, T.J.; FONTANA, J.; FUJIO, Y.; WALSH, K.; FRANKE, T.F.; PAPAPETROPOULOS, A.; SESSA, W.C. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. Nature. 399:597-601, 1999.

GIANNOTTI, G.; DOERRIES, C.; MOCHARLA, P.S.; MUELLER, M.F.; BAHLMANN, F.H.; HORVÀTH, T.; JIANG, H.; SORRENTINO, S.A.; STEENKEN, N.; MANES, C.; MARZILLI, M.; RUDOLPH, K.L.; LÜSCHER, T.F.; DREXLER, H.; LANDMESSER, U. Impaired endothelial repair capacity of early endothelial progenitor cells in prehypertension: Relation to endothelial dysfunction. Hypertension. 55: 1389-1397, 2010.

GNECCHI, M.; ZHANG, Z.; NI, A.; DZAU, V.J. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. Circulation Research. 103: 1204-1219, 2008.

GKALIAGKOUSI, E.; DOUMA, S.; ZAMBOULIS, C.; FERRO, A. Nitric oxide dysfunction in vascular endothelium and platelets: role in essential hypertension. Journal of Hypertension. 27: 2310-2320, 2009.

GOBE, G.; BROWNING, J.; HOWARD, T.; HOGG, N.; WINTERFORD, C.; CROSS, R. Apoptosis occurs in endothelial cells during hypertension-induced microvascular rarefaction. Journal of Structural Biology. 118: 63–72, 1997.

GOTTLIEB, R.A. Mitochondrial and apoptosis. Biological Signals and Receptors. 10: 147-161, 2001.

GRASSI, G.; SERAVALLE, G.; CALHOUN, D.; BOLLA, GB.; MANCIA, G. Physical exercise in essential hypertension. Chest. 101:312S-314S, 1992.

GREEN, D.J.; MAIORANA, A.; O'DRISCOLL, G.; TAYLOR, R. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. Journal of Physiology. 561: 1-25, 2004.

GREEN, D.J.; WALSH, J.H.; MAIORANA, A.; BURKE, V.; TAYLOR, R.R.; O´DRISCOLL, J.G. Comparison of resistance and conduit vessel nitric oxide-mediated vascular function in vivo: effects of exercise training. Journal of Applied Physiology. 97: 749-755, 2004.

GREEN, D.R.; KROEMER, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. Science. 305: 626-629, 2004.

GREENE, A.S.; TONELLATO, P.J.; LUI, J.; LOMBARD, J.H.; COWLEY, A.W. Jr. Microvascular rarefaction and tissue vascular resistance in hypertension. American Journal Physiology - Heart and Circulatory Physiology. 256: 126-131, 1989.

GUSTAFSSON, T.; PUNTSCHART, A.; KAIJSER, L.; JANSSON, E.; SUNDBERG, C.J. Exercise-induced expression of angiogenesis-related transcription and growth factors in human skeletal muscle. American Journal Physiology - Heart and Circulatory Physiology. 276: 679-685, 1999.

GUSTAFSSON, T.; KRAUS, W. E. Exercise-induced angiogenesis-related growted and transcription factors in skeletal muscle, and their modification in muscle pathology. Frontiers in Bioscience. 6: 75-89, 2001.

GUSTAFSSON, T.; KNUTSSON; A.; PUNTSCHART, A.; KAIJSER, L.; NORDQVIST, A.C.; SUNDBERG, C.J.; JANSSON, E. Increased expression of vascular endothelial growth factor in human skeletal muscle in response to short-term one-legged exercise training. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology. 444: 752-759, 2002.

HAGBERG, J.M.; PARK, J.J.; BROWN, M.D. The role of exercise training in the treatment of hypertension: an update. Sports Medicine. 30: 193-206, 2000.

HAGBERG, J.M.; MONTAIN, S.J.; MARTIN, W.H.; EHSANI, A.A. Effect of exercise training in 60- to 69-year-old persons with essential hypertension. American Journal of Cardiology. 64: 348-353, 1989.

HAMER, NK. Effect of walking on blood-pressure in systemic hypertension. Lancet. 2: 114-118, 1967.

HANAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell. 86: 353-364, 1996.

HANSON, J.S.; NEDDE, W.H. Preliminary observations on physical training for hypertensive males. Circulation Research. 27: 49-53, 1970.

HAUNSTETTER, A.; IZUMO, S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. Circulation Research. 82: 1111-1129, 1998.

HEISSIG, B.; HATTORI, K.; DIAS, S.; FRIEDRICH, M.; FERRIS, B.; HACKETT, N.R.; CRYSTAL, R.G.; BESMER, P.; LYDEN, D.; MOORE, M.A.; WERB, Z.; RAFII, S. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone morrow niches requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. Cell. 109: 625-637, 2002.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. Nature. 407:770-76, 2000.

HEPPLE, R.T.; HAGEN, J.L.; KRAUSE, D.J.; JACKSON, C.C. Aerobic power declines with aging in rats skeletal muscles perfused at matched connective O2 delivery. Journal of Applied Physiology. 94:744-751, 2003.

HEESCHEN, C.; LEHMANN, R.; HONOLD, J.; ASSMUS, B.; AICHER, A.; WALTER, D.H.; MARTIN, H.; ZEIHER, A.M.; DIMMELER, S. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. Circulation. 2004. 109: 1615-1622.

HIGASHI, Y.; YOSHISUMI, M. Exercise and endothelial function: Role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. Pharmacology & Therapeutics. 102: 87-96, 2004.

HILL, J.M.; ZALOS, G.; HALCOX, J.P.; SCHENKE, W.H.; WACLAWIW, M.A.; QUYYUMI, A.A. & FINKEL, T. Circulating endotelial progenitor cells, vascular

function, and cardiovascular risk. The New England Journal of Medicine. 348: 593-600, 2003.

HOETZER, G.L.; VAN GUILDER, G.P.; IRMIGER, H.M.; KEITH, R.S.; STAUFFER, B.L.; DESOUZA, C.A. Aging, exercise, and endothelial progenitor cell clonogenic and migratory capacity in men. Journal of Applied Physiology. 102: 847-852, 2007.

HOLLOSZY, J.O.; COYLE, E.F. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. Journal of Applied Physiology. 56: 831-838, 1984.

HOLMES, D.I.R.; ZACHARY, I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. Genome Biology. 6: 209, 2005.

HOPPELER, H.; HOWALD, H.; CONLEY, K.; LINDSTEDT, S.L.; CLAASSEN, H.; VOCK, P.; WEIBEL, E.R. Endurance training in humans: aerobic capacity and structure of skeletal muscle. Journal of Applied Physiology. 59: 320-327, 1985.

HORI, A.; ISHIHARA, A.; KOBAYASHI, S.; IBATA, Y. Immunohistochemical classification of skeletal muscle fibers. Acta Histochemica et Cytochemica. 31: 375-384, 1998.

HRISTOV, M.; WEBER, C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. Journal of Cellular and Molecular Medicine. 8: 498-508, 2004.

HUANG, P.L.; HUANG, Z.; MASHIMO, H.; BLOCH, K.D.; MOSKOWITZ, M.A.; BEVAN, J.A.; FISHMAN, M.C. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. Nature. 377: 239-242, 1995.

HUTCHINS, P.M.; BOND, R.F.; GREEN, H.D. Participation of oxygen in the local control of skeletal muscle microvasculature. Circulation Research. 40: 85-93, 1974.

IKEDA, N.; YASU, T.; KUBO, N.; NAKAMURA, T.; SUGAWARA, Y.; UEDA S. Daily exercise and bone marrow-derived CD34+/133+ cells alter myocardial infarction treated by bare metal stent implantation. Circulation Journal. 72: 897-901, 2008.

IMANISHI, T.; KOBAYASHI, K.; HANO, T.; NISHIO, I. Effect of estrogen on differentiation and senescence in endothelial progenitor cells derived from bone marrow in spontaneously hypertensive rats. Hypertension Research. 28: 763-772, 2005a.

IMANISHI, T.; MORIWAKI, C.; HANO, T.; NISHIO, I. Endothelial progenitor cell senescence is accelerated in both experimental hypertensive rats and patients with essential hypertension. Journal of Hypertension. 23: 1831-1837, 2005b.

INTENGAN, H.D.; SCHIFFRIN, E.L. Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: Role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. Hypertension. 36: 312-318, 2000.

ISRAELS, J.G.; ISRAELS, E.D. Apoptosis. Stem Cells. 17: 306-313, 1999.

ITO, H.; TORII, M.; SUZUKI, T. Decreased superoxide dismutase activity and increased superoxide anion production in cardiac hypertrophy of spontaneously hypertensive rats. Clinical and Experimental Hypertension.17: 803– 816, 1995.

IRIGOYEN, M.; LACCHINI, S.; DE ANGELIS, K.; MICCHELINI, L. Fisiopatologia da Hipertensão: o que avançamos?. Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo. 1: 20-45, 2003.

KALKA, C.; MASUDA, H.; TAKAHASHI, T.; GORDON, R.; TEPPER, O.; GRAVEREAUX, E.; PIECZEK, A.; IWAGURO, H.; HAYASHI,SI.; ISNER, JM.; ASAHARA, T. Vascular endothelial growth factor (165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. Circulation Research. 86: 1198-1202, 2000.

KALKA, C.; MASUDA, H.; TAKAHASHI, T.; KALKA-MOLL, W.M.; SILVER, M.; KEARNEY, M.; LI, T.; ISNER, J.M,; ASAHARA, T. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. Proceedings of the National Academy of Sciences. 97: 3422-3427, 2000.

KAMIHATA, H.; MATSUBARA, H.; NISHIUE, T.; FUJIYAMA, S.; TSUTSUMI, S.; OZONO, R.; MASAKI, H.; MORI, Y.; IBA, O.; TATEISHI, E.; KOSAKI, A.; SHINTANI, S.; MUROHARA, T.; IMAIZUMI, T.; IWASAKA, T. Impantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. Circulation. 104: 1046-1052, 2001.

KATONA, P.G.; McLEAN, M.; DIGHTON, D.H.; GUZ, A. Sympathetic and parasympathetic cardiac control in athletes and nonathletes at rest. Journal of Applied Physiology. 52: 1652-1657, 1982.

KATUSIC, Z.S.; COSENTINO, F. Nitric-Oxide Synthase - from Molecular-Biology to Cerebrovascular Physiology. News in Physiological Sciences. 9: 64-67, 1994.

KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomen with wide-ranging implications in tissue kinetics. British Journal of Cancer. 26: 239-257, 1972.

KOBAYASHI, N.; DELANO, F.A.; SCHMID-SCHONBEIN, G.W. Oxidative stress promotes endothelial cell apoptosis and loss of microvessels in the spontaneously hypertensive rats. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 25: 2114-2121, 2005.

KOCHER, A.A.; SCHUSTER, M.D.; SZABOLCS, M.J.; TAKUMA, S.; BURKOFF, D.; WANG, J.; HOMMA, S.; EDWARDS, N.M.; ITESCU, S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone marrow-derived angioblasts prevents

cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. Nature Medicine. 7:430-436, 2001.

KOCH, L.G.; BRITTON, S.L. Artificial selection for intrinsic aerobic endurance running capacity in rats. Physiological Genomics. 5:45-52, 2001.

KRIEFER, F.N.; MISTELI, H.; KALAK, N.; TSCHUDIN, K.; FINGERLE, J.; KOOIJI, M.; STUMM, M.; SUMANOVSCKI, L.T.; SIEBER, C.C.; BATTEGAY, E.J. Inhibition of NO biosynthesis, but not elevated blood pressure, reduces angiogenesis in rat models of secondary hypertension. Blood Press. 11: 116-124. 2002.

KRIEGER, E.M.; MICHELINI, L.C. Dados básicos sobre a manutenção da pressão arterial. Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo. 2: 9-17, 1992.

KROEMER, G.; REED, J.C. Mitochondrial control of cell death. Nature Medicine. 6: 513-516, 2000.

KUBIS, N.; RICHER, C.; DOMERGUE, V.; GIUDICELLI, J.F.; LÉVY, B.I. Role of microvascular rarefaction in the increased arterial pressure in mice lacking for the endothelial nitric oxide synthase gene (eNOS3$^{-/-}$). Journal of Hypertension. 20: 1581-1587, 2002.

KUO, N.T.; BENHAYON, D.; PRZYBYLSKI, R.J.; MARTIN, R.J.; LAMANNA, J.C. Prolonged hypoxia increases vascular endothelial growth factor mRNA and protein in adult mouse brain. Journal of Applied Physiology. 86: 260-264, 1999.

LATERZA, M.C.; DE MATOS, L.D.; TROMBETTA, I.C.; BRAGA, A.M.; ROVEDA, F.; ALVES, M.J.; KRIEGER, E.M.; NEGRÃO, C.E.; RONDON, M.U. Exercise training restores baroreflex sensitivity in never-treated hypertensive patients. Hypertension. 49: 1298-1306, 2007.

LAUFS, U.; WERNER, N.; LINK, A.; ENDRES, M.; WASSMANN, S.; JURGENS, K.; MICHE, E.; BOHM, M.; NICKENIG, G. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. Circulation. 109: 220-226, 2004.

LEE, P.C.; SALYAPONGSE, A.N.; BRAGDONGA, SERÁS, L.L.; WATKINS, S.C.; EDINGTON, H.D.; BILLIAR, T.R. Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice. American Journal of Physiology. 277: 1600-1608. 1999.

LEHNINGER, A.L. Princípios de Bioquímica. São Paulo: Savier. 1991.

LÉVY, B.I. New aspects in the mechanisms of hypertension and the pathophysiology of the arterial tree. In: SAFAR, M.E. Macro and microcirculation in hypertension. Editora Lippincott Willians & Wilkins, p. 3-12, 2005.

LÉVY, B.I.; AMBROSIO, G.; PRIES, A.R.; STRUIJKER-BOUDIER, H.A.J. Microcirculation in hypertension: a new target for treatment?. Circulation. 104: 735-740, 2001.

LEWIS, D.M.; LEVI, A.J.; BROOKSBY, P.; JONES, J.V. A faster twitch contraction of soleus in the spontaneously hypertensive rat is partly due to changed fibre type composition. Experimental Physiology. 79: 377-386, 1994.

LI, H.; WALLERATH, T.; FORSTERMANN, U. Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. Nitric Oxide. 7: 132-147, 2002.

LOOMANS, C.J.; DAO, H.H.; VAN ZOMMEVELD, A.J.; RABELINK, T.J. Is endothelial progenitor cell dysfunction involved in altered angiogenic processes in patients with hypertension?. Current Hypertension Reports. 6: 51-54. 2004.

MAEDA, S.; MIYAUCHJ, T.; KAKIYAMA, T.; SUGAWARA, J.; IEMITSU, M.; IRUKAYAMA-TOMOBE, Y.; MURAKAMI, H.; KUMAGAI, Y.; KUNO, S.; MATSUDA,

M. Effects of exercise training of 8 weeks and detraining on plasma levels of endothelium-derived factors, endothelin-1 and nitric oxide, in healthy young humans. Life Sciences. 69: 1005-1016, 2001.

MANFREDINI, F.; RIGOLIN, G.M.; SOFFRITTI, S.; BOARI, B.; CONCONI, F.; CASTOLDI, G.L; CATIZONE, L.; ZAMBONI, P.; MANFREDINI, R. Exercise capacity and circulating endothelial progenitor cells in hemodialysis patients. Sports Medicine. 28: 368-373, 2007.

MEDEIROS, A.; OLIVEIRA, E.M.; GIONOLLA, R.; CASARINI, D.E.; NEGRAO, C.E.; BRUM, P.C. Swimming training increases cardic vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 37: 1909-1917, 2004.

MELO, R.P.; JR MARTINHO, E.; MICHELINI, L.C. Training-induced, pressure-lowering effect in SHR wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. Hypertension. 42: 851-857, 2003.

MILLER-KASPRZAK, E.; JAGODZINSKI, P.P. Endothelial progenitor cells as a new agent contributing to vascular repair. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis. 55: 247-259, 2007.

MOBIUS-WINKLER, S.; HILBERG, T.; MENZEL, K.; GOLLA, E.; BURMAN, A.; SCHULER, G.; ADAMS, V. Time-dependent mobilization of circulating progenitor cells during strenous exercise in healthy individuals. Journal of Applied Physiology. 107: 1943-1950, 2009.

MOYNA, N.M.; THOMPSON, P.D.; The effect of physical activity on endothelial function in man. Acta Physiology Scandinavian. 180: 113-123, 2004.

MUROHARA, T.; IKEDA, H.; DUAN, J.; SHINTANI, S.; SASAKI, K.; EGUCHI, H.; ONITSUKA, I.; MATSUI, K.; IMAIZUMI, T. Transplanted cord blood-derived

endothelial progenitor cells augment postnatal neovascularization. The Journal of Clinical Investigation. 105: 1527-1536, 2001.

MYERS, J.; PRAKASH, M.; FROELICHER, V.; DO, D.; PARTINGTON, S.; ATWOOD, J.E. Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing. The New England Journal of Medicine. 346: 793-801, 2002.

NAGATOMO, F.; GU, N.; FUJINO, H.; TAKEDA, I.; TSUDA, K.; ISHIHARA, A. Skeletal muscle characteristics of rats with obesity, diabetes, hypertension, and hyperlilidemia. Journal of Atherosclerosis and Thrombosis. 16: 576-585, 2009.

NAKATANI, T.; NAKASHIMA, T.; KITA, T.; ISHIHARA, A. Cell size and oxidative enzyme activityof type-identified fibers in rat hindlimb muscles: a review. Acta Histochemica et Cytochemica. 36: 105-114, 2003.

NEGRÃO, C.E.; IRIGOYEN, M.C.; MOREIRA, E.D.; BRUM, P.C.; FREIRE, P.M.; KRIEGER E.M. Effect of exercise training on RSNA, baroreflex control, and blood pressure responsiveness. American Journal of Physiology. 265: 365-370, 1993.

NEGRÃO, C.E.; MOREIRA, E.D.; BRUM, P.C.; DENADAI, M.L.; KRIEGER, E.M. Vagal and sympathetic control of heart rate during exercise by sedentary and exercise-trained rats. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 25: 1045-1052, 1992.

NEGRÃO, C.E.; MOREIRA, E.D.; SANTOS, M.C.L.M.; FARAH, V.M.A.; KRIEGER, E.M. Vagal function impairment after exercise training. Journal of Applied Physiology. 72: 1749-1753, 1992.

NEGRÃO, C.E.; SANTOS, A.C.; ALVES, M.J.N. Exercício físico e endotélio. In: DA LUZ, P.; LAURINDO, F.R.M.; CHAGAS, A.C.P. Endotélio e doenças cardiovasculares, Editora Manole, 161-172, 2005.

NELSON, L.; JENNINGS, G.L.; ESLER, M.D.; KORNER, P.I. The effect of changing levels of physical activity on blood pressure and hemodynamics in patients with essential hypertension. Lancet. 2: 474-476, 1986.

NEUFELD, G.; COHEN, T.; GENGRINOVITCH, S.; POLTORAK, Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor. The FASEB Journal. 13: 9-22, 1999.

NISHIDA, K.; HARRISON, D.G.; NAVAS, J.P.; FISHER, A.A.; DOCKERY, S.P.; UEMATSU, M.; NEREM, R.M.; ALEXANDER, R.W.; MURPHY, T.J. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. The Journal of Clinical Investigation. 90: 2092-2096, 1992.

NOR, J.E.; POLVERINI, P. Role of endothelial cell survivel and death signals in angiogenesis. Angiogenesis. 3: 101-116, 1999.

NOR, J.E.; CHRISTENSEN, J.; MOONEY, D.J.; POLVERINI, P.J. Vascular. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell surivival and induction of Bcl-2 expression. The American Journal of Pathology. 154: 375-384, 1999.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. Japanase Circulation Journal. 27: 282-93, 1963.

OLIVEIRA, E.M.; SASAKI, M.S.; CERÊNCIO, M.; BARAÚNA, V.G.; KRIEGER, J.E. Local renin-angiotensin system regulates left ventricular hypertrophy induced by swimming training independent of circulating renin: a pharmacological study. Journal of Renin Angiotensin Aldosterone System. 10: 15-23, 2009.

OLIVERAS, A.; SOLER, M.J.; MARTINEZ-ESTRADA, O.M.; VAZQUEZ, S.; MARCO-FELIU, D.; VILA, J.S.; VILARO, S.; LLOVERAS, J. Endothelial progenitor cells

reduced in refractory hypertension. Journal of Human Hypertension. 22: 183-190, 2008.

PAFFENBARGER, R.S.; HYDE, R.T.; WING, A.L.; LEE, I.; JUNG, D.L.; KAMPERT, J.B. The association of changes in physical-activity level and other lifestyle characteristics with mortality among men. The New England Journal of Medicine. 328: 538-545, 1993.

PARENTI, A.; MORBIDELLI, L.; CUI, X.L.; DOUGLAS, J.G.; HOOD, J.D.; GRANGER, H.J.; LEDDA, F.; ZICHE, M. Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase1/2 activation in postcapillary endothelium. The Journal of Biological Chemistry. 273: 4220-4226, 1998.

PEREIRA, M.; LUNET, N.; AZEVEDO, A.; BARROS, H. Differences in prevalence, awareness, treatment and control of hypertension between developing and developed countries. Journal of Hypertension. 27: 963–975, 2009.

PERRY, T.E.; SONG, M; DESPRES, D.J.; KIM, S.M; SAN, H.; YU, Z; RAGHAVACHARI, N.; SCHNERMANN, J.; CANNON III, R.O.; ORLIC, D. Bone marrow-derived cells do not repair endothelium in a mouse model of chronic endothelial cell dysfunction. Cardiovascular Research. 84: 317-325, 2009.

PESCATELLO, L.S.; FRANKLIN, B.A.; FAGARD, R.; FARQUHAR, W.B.; KELLEY, G.A.; RAY, C.A. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and hypertension. Medicine & Science in Sports & Exercise. 36: 533-553, 2004.

PIRRO, M.; SCHILLACI, G.; MENECALI, C.; BAGAGLIA, F.; PALTRICCIA, R.; VAUDO, G.; MANNARINO, M.R.; MANNARINO, E. Reduced number of circulating endothelial progenitors and HOXA9 expression in CD34+ cells of hypertensive patients. Journal of Hypertension. 25: 2093-2099, 2007.

POOLE, D.C.; MATHIEU-COSTELLO, O. Relationship between fiber capillarization and mitochondrial volume density in control and trained rat soleus and plantaris muscles. Microcirculation. 3: 175-186, 1996.

PREWITT, R.L.; CHEN, II.; DOWEL, R. Development of microvascular rarefaction in the spontaneously hypertensive. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology. 243: 243-251, 1982.

PRIOR, B.M.; YANG, H.T.; TERJUNG, R.L. What makes vessels grow with exercise training? Journal of Applied Physiology. 52: 1119-1128, 2004.

PUIG, J.; FREITAS, J.; CARVALHO, M.J.; PUGA, N.; RAMOS, J.; FERNANDES, P.; COSTA, O.; FREITAS, A.F. Spectral analysis of heart rate variability in athletes. Journal of Sport Medicine, Physiology & Fitness. 33: 44-48, 1993.

QUADRILATERO, J.; RUSH, J.W.E. Increased DNA fragmentation and altered apoptotic protein levels in skeletal muscle of spontaneously hypertensive rats. Journal of Applied Physiology. 101: 1149-1161, 2006.

RAFF, M.C.; BARRES, B.A.; BURNE, J.F.; COLES, H.S.; ISHIZAKI, Y.; JACOBSON, M.D. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. Science. 262: 695-700, 1993.

RAFII, S. Circulating endothelial precursors: mystery, reality and promise. The Journal of Clinical Investigation. 105: 17-19, 2000.

RAUSCHER, F.M.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P.J.; DAVIS, B.H.; WANG, T.; GREGG, D.; RAMASWAMI, P.; PIPPEN, A.M.; ANNEX, B.H.; DONG, C.; TAYLOR, D.A. Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. Circulation. 1084: 457-463, 2003.

REED, J.C. Bcl-2 family proteins. Oncogene. 17: 3225-3236, 1998.

REYES, M.; DUDEK, A.; JAHAGIRDAR, B.; KOODIE, L.; MARKER, P.H.; VERFAILLIE, C.M. Origen of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. The Journal of Clinical Investigation. 109: 337-346, 2002.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. Nature. 386: 671-674, 1997.

RONDON, M.U.P.B.; BRUM, P.C. Exercício físico como tratamento não-farmacológico da hipertensão arterial. Revista Brasileira de Hipertensão. 10: 134-139, 2003.

RUEDEMANN, A.D. Conjunctival vessels. The Journal of the American Medical Association. 101: 1477-1481, 1933.

ROSSÉ, T.; OLIVIER, R.; MONNEY, L.; RAGER, M.; CONUS, S.; FELLAY, I.; JANSEN, B.; BORNER, C. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. Nature. 391: 496-499, 1998.

ROWELL, L.B.; SALTIN, B.; KIENS, B.; CHRISTENSEN, N.J. Is peak quadriceps blood flow in humans even higher during exercise with hipoxemia?. American Journal of Physiology. 251: 1038-1044, 1986.

SAFAR, M.E. Macro and microcirculation in hypertension. In: SAFAR, M.E. Macro and microcirculation in hypertension. Editora: Lippincott Willians & Wilkins, p. 1-2, 2005.

SALVESEN, G.S.; DUCKETT, C.S. Apoptosome: the seven-spoked death machine. Developmental Cell. 2: 256-277, 2002.

SARTO, P.; BALDUCCI, E.; BALCONI, G.; FIORDALISO, F.; MERLO, L.; TUZZATO, G.; PAPPAGALLO, G.L.; FRIGATO, N.; ZANOCCO, A.; FORESTIERI, C.; AZZARELLO, G.; MAZZUCCO, A.; VALENTI, M.T.; ALBORINO, F.; NOVENTA, D.;

VINANTE, O.; PASCOTTO, P.; SARTORE, S.; DEJANA, E.; LATINI, R. Effects of exercise training on endothelial progenitor cells in patients with chronic heart failure. Journal of Cardiac Failure. 13: 701-718, 2007.

SCHAIBLE, T.F.; SCHEUER, J. Effects of physical training by running or swimming on ventricular performance of rats hearts. Journal of Applied Physiology. 46: 854-860, 1979.

SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Cell. 103: 211-225, 2000.

SEVER, P.S.; POULTER, N.R. A hypothesis for the pathogenesis of essential hypertension: the initiating factors. Journal of Hypertension Suppl. 7: S9-12, 1989.

SHAFFER, R.G.; GREENE, S.; ARSHI, A.; SUPPLE, G.; BANTLY, A.; MOORE, J.S.; PARMACEK, M.S.; MOHLER, E.R. Effect of acute exercise on endothelial progenitor cells in patients with peripheral arterial disease. Vascular Medicine. 11: 219-226, 2007.

SHALABY, F.; ROSSANT, J.; YAMAGUCHI, T.P.; GERTSENSTEIN, M.; WU, X.F.; BREINTMAN, M.L.; SCHUH, A.C. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1 deficient mice. Nature. 376: 62-66, 1995.

SHANTSILA, E.; LIP, G. Endothelial function and endothelial progenitors: possible mediators of the benefits from physical exercise?. European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation. 16: 401-403, 2009.

SHI, Q.; RAFII, S.; WU, M.H.; WIJELATH, E.S.; YU, C.; ISHIDA, A.; FUJIDA, Y.; KOTHARI, S.; MOHLE, R.; SAUVAGE, L.R.; MOORE, M.A.; STORB, R.F.; HAMMOND, W.P. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. Blood. 92: 362-367, 1998.

SOCI, U.P.R.; REDONDO, F.R.R.; FERNANDES, T.; DE ANGELIS, K.; IRIGOYEN, M.C.; COELHO, M.; OLIVEIRA, E.M. Esteróide anabolizante inibe a angiogênese induzida pelo treinamento físico de natação em músculo sóleo de ratos normotensos. Revista Brasileira de Educação Física e Esporte. 23: 195-209, 2009.

SILLAU, A.H.; BANCHERO, N. Visualization of capillaries in skeletal muscle by the ATPase reaction. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology. 369: 269-271, 1977.

SILVA, G.J.; BRUM, P.C.; NEGRAO, C.E.; KRIEGER, E.M. Acute and chronic effects of exercise on baroreflexes in spontaneously hypertensive rats. Hypertension. 30: 714-719, 1997.

SIU, P.M.; DONLEY, D.A.; BRYNER, R.W.; ALWAYS, S.E. Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac e skeletal muscles. Journal of Applied Physiology. 94: 555-560, 2003.

SLEE, E.A. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase -9-dependent manner. The Journal of Cell Biology. 144: 281-292, 1999.

STEINER, S.; NIESSNER, A.; ZIEGLER, S.; RICHTER, B.; SEIDINGER, D.; PLEINER, J.; PENKA, M.; WOLZT, M.; HUBER, K.; WOJTA, J.; MINAR, E.; KOPP, C.W. Endurance training increases the number of endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk and coronary artery disease. Atherosclerosis. 181: 305-310, 2005.

STRUIJKER BOUDIER, H.A.; AMBROSIO, G. Microcirculation and cardiovascular disease. In: SAFAR, M.E. Macro and microcirculation in hypertension. Editora Lippincott Willians & Wilkins, p. 47-56, 2000.

STRUIJKER BOUDIER, H.A.; LE NOBLE, J.L.M.L.; MESSING, M.W.J.; HUIJBERTS, M.S.P.; LE NOBLE, F.A.C.; VAN ESSEN, H. The microcirculation and hypertension. Journal of Hypertension Suppl. 10: S147–S156, 1992.

SULLIVAN, J.M.; PREWITT, R.L.; JOSEPHS, J.A. Attenuation of the microcirculation in youngs patients with high-output borderline hypertension. Hypertension. 5: 844-851, 1983.

SUN, D.; HUANG, A.; SMITH, C.J.; STACKPOLE, C.J.; CONNETTA, J.A.; SHESELY, A.G.; KOLLER, A.; KALEY, G. Enhanced release of prostaglandins contributes to flow-induced arteriolar rarefaction in eNOS knockout mice. Circulation Research. 85: 288–293, 1999.

SUZUKI, H.; DELANO, F.A.; PARKS, D.A.; JAMSHIDI, N.; GRANGER, D.N.; ISHII, H.; SUEMATSU, M.; ZWEIFACH, B.W.; SCHMID-SCHO¨NBEIN, G.W. Xanthine oxidase activity associated with arterial blood pressure in spontaneously hypertensive rats. Proceedings of the National Academy of Sciences. 95: 4754–4759, 1998.

SUZUKI, J. Time course changes in VEGF expression and capillarity in the early stage of exercise training with Co^2 treatment in rat skeletal muscles. Acta Physiology Scandinavian. 181: 225-232, 2004.

TANG, K.; BREEN, E.C.; GERBER, H.P.; FERRARA, N.M.; WAGNER, P.D. Capillary regression in vascular endothelial growth factor-deficient skeletal muscle. Physiological Genomics. 18: 63-69, 2004.

TAYLOR, D.A.; ATKINS, B.Z.; HUNGSPREUGS, P.; JONES, T.R.; REEDY, M.C.; HUTCHESON, K.A.; GLOWER, D.D.; KRAUS, W.E. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. Nature Medicine. 4: 929–933, 1998.

TEPPER, O.M.; GALIANO, R.D.; CAPLA, J.M.; KALKA, C.; GAGNE, P.J.; JACOBOWITZ, G.R.; LEVINE, J.P.; GURTNER, G.C. Human endothelial progenitor cells from type II diabetes exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. Circulation. 106: 2781-2786, 2002.

TIPTON, C.M. Exercise training and hypertension: an update. Exercise and Sport Sciences Reviews. 19: 447-505, 1991.

TRAN, J.; RAK, J.; SHEEHAN, C.; SAIBIL, S.D.; LACASSE, E.; KORNELUK, R.G.; KERBEL, R.S. Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. Biochemical and Biophysical Research Communications. 264: 781-788, 1999.

UMEMURA, T.; HIGASHI, Y. Endothelial progenitor cells: therapeutic target for cardiovascular diseases. Journal of Pharmacological Sciences.108: 1-6, 2008.

URBICH, C.; DIMMELER, S. Endotehlial progenitor cells: Characterization and role in vascular biology. Circulation Research. 95: 343-353, 2004.

VAJKOCZY, P.; BLUM, S.; LAMPARTER, M.; MAILHAMMER, R.; ERBER, R.; ENGELHARDT, B.; VESTWEBER, D.; HATZOPOULOS, A.K. Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis. The Journal of Experimental Medicine. 197: 1755-1765, 2003.

VAN ZONNEVELD, A.J.; RABELINK, T.J. Endothelial progenitor cells: biology therapeutic potential in hypertension. Current Opinion in Nephrology and Hypertension. 2: 167-172, 2006.

VANDER HEIDEN, M.G.V.; THOMPSON, C.B. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis?. Nature Cell Biology. 1:E209-216, 1999.

VAN CRAENENBROECK, E.M.; BECKERS, P.J.; POSSEMIERS, N.M.; WUYTS, K.; FREDERIX, G.; HOYMANS, V.Y.; WUYTS, F.; PAELINCK, B.P.; VRINTS C.J.; CONRAADS, V.M. Exercise acutely reverses dysfunction of circulating angiogenic cells in chronic heart failure. European Heart Journal. 31: 1924- 1934, 2010.

VASA, M.; FICHTLSCHERER, S.; AICHER, A.; ADLER, K.; URBICH, C.; MARTIN, H., ZEIHER, A.M.; DIMMELER, S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. Circulation Research. 89: E1-7, 2001.

VASAN, R.S.; LARSON, M.G.; LEIP, E.P.; EVANS, J.C.; O DONNELL, C.J.; KANNEL, W.B.; LEVY, D. Impact of high-normal blood pressure on the risk of cardiovascular disease. The New England Journal of Medicine. 354: 1291-1297, 2001.

VANHOUTTE, P.M.; SHIMOKAWA, H.; TANG, E.H.C.; FELETOU, M. Endothelial dysfunction and vascular disease. Acta Physiologica. 196: 193-222, 2009.

VERAS-SILVA, A.S.; MATTOS, K.C.; GAVA, N.S.; BRUM, P.C.; NEGRAO, C.E.; KRIEGER, E.M. Low-intensity exercise training decreases cardiac output and hypertension in spontaneously hypertensive rats. American Journal of Physiology. 273: 2627-2631, 1997.

VIHKO, V.; SALMINEN, A.; RANTAMAKI, J. Oxidative and lysosomal capacity in skeletal muscle of mice after endurance training of different intensities. Acta Physiol Scand. 104: 74-81, 1978.

VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL. Revista hipertensão. 13: 1-68, 2010.

ZAMO, F.S.; LACCHINI, S.; MOSTARDA, C.; CHIAVEGATTO, S.; SILVA, I.C.; OLIVEIRA, E.M.; IRIGOYEN, M.C. Hemodynamic, morphometric and autonomic

patterns in hypertensive rats - Renin-Angiotensin system modulation. Clinics. 65: 85-92, 2010.

ZICHE, M.; MORBIDELLI, L.; MASINI, E.; AMERINI, S.; GRANGER, H.J.; MAGGI, C.A.; GEPPETTI, P.; LEDDA, F. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. The Journal of Clinical Investigation. 94: 2036-2044, 1994.

ZICHE, M.; MORBIDELLI, L.; CHOUDHURI, R.; ZHANG, H.T.; DONNINI, S.; GRANGER, H.J.; BICKNELL, R. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. The Journal of Clinical Investigation. 99: 2625-2634, 1997.

WAHL, P.; BLOCK, W.; SHMIDT, A. Exercise has a positive effect on endothelial progenitor cells, which could be necessary for vascular adaptation processes. Sports Medicine. 28: 374-380, 2007.

WALTHER, C.; GAEDE, L.; ADAMS, V.; GELBRICH, G.; LEICHTLE, A.; ERBS, S.; SONNABEND, M.; FIKENZER, K.; KÖRNER, A.; KIESS, W.; BRUEGEL, M.; THIERY, J.; SCHULER, G. Effect of increased exercise in school children on physical fitness and endothelial progenitor cells: a prospective randomized trial. Circulation. 120: 2251-2259, 2009.

WALTER, D.H.; ZEIHER, A.M.; DIMMELER, S. Effects of statins on endothelium and their contribution to neovascularization by mobilization of endothelial progenitor cells. Coronary Artery Disease. 15: 235-242, 2004.

WANG, H.; OLSZEWSKI, B.; ROSEBURY, W.; WANG, D.; ROBERTSON, A.; KEISER, J.A. Impaired angiogenesis in SHR is associated with decreased KDR and MT1-MMP expression. Biochemical and Biophysical Research Communications. 315: 363-368, 2004.

WERNER, N.; KOSIOL, S.; SCHIEGL, T.; AHLERS, P.; WALENTA, K.; LINK, A.; BOHM, M,: NICKENIG, G. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. The New England Journal of Medicine. 353: 999-1007, 2005.

WHELTON, S.P.; CHIN, A.; XIN, X.; H.E., J. Effect of aerobic exercise on blood pressure: a metaanalysis of randomized, controlled trials. Annals of Internal Medicine. 136: 493-503, 2002.

WIBOM, R.; HULTMAN, E.; JOHANSSON, M.; MATHEREI, K.; CONSTANTIN-TEODOSIU, D.; SCHANTZ, P.G. Adaptation of mitochondrial ATP production in human skeletal muscle to endurance training and detraining. Journal of Applied Physiology. 73: 2004-2010, 1992.

WISLOFF, U.; HELGERUD, J.; KEMI, O.J.; ELLINGSEN, O. Intensity-controlled treadmill running rats: VO2max and cardiac hypertrophy. American Journal Physiology - Heart and Circulatory Physiology. 280: H1301-1310, 2001.

WITKOWSHI, S.; HAGBERG, M.J. Progenitor cells and age: can we figth aging with exercise?. Journal of Applied Physiology. 102: 834-835, 2007.

WU, R.; MILLETTE, E.; WU, L.; DE CHAMPLAIN, J. Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Journal of Hypertension.19: 741-748, 2001.

YAMAGUCHI, J.; KUSANO, K.F.; MASUO, O.; KAWAMOTO, A.; SILVER, M.; MURASAWA, S.; BOSCH-MARCE, M.; MASUDA, H.; LOSORDO, D.W.; ISNER, J.M.; ASAHARA, T. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelail progenitor cell recruitment for ischemic neovscularization. Circulation. 107: 1322-1328, 2003.

YANG, Z.; WANG, J.M.; CHEN, L.; LUO, C.F.; TANG, A.L.; TAO, J. Acute exercise-induced nitric oxide production contributes to upregulation of circulating endothelial progenitor cells in healthy subjects. Journal of Human Hypertension. 21: 452-460, 2007.

YU, Y.; FUKUDA, N.; YAO, E.H.; MATSUMOTO, T.; KOBAYASHI, N.; SUZUKI, R.; TAHIRA, Y.; UENO, T.; MATSUMOTO, K. Effects of an ARB on endothelial progenitor cell function and cardiovascular oxidation in hypertension. American Journal of Hypertension. 21: 72-77, 2008.