

# O GRAU DE MELHORA NA FUNÇÃO DAS CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA É DEPENDENTE DO VOLUME DE TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO



THE LEVEL OF IMPROVEMENT IN THE FUNCTION BONE MARROW DERIVED OF ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS IS DEPENDENT ON THE VOLUME OF AEROBIC EXERCISE TRAINING

Tiago Fernandes<sup>1</sup>  
Nara Yumi Hashimoto<sup>1</sup>  
Isolmar Tadeu Schettert<sup>1</sup>  
Juliana Sanajotti Nakamura<sup>1</sup>  
José Eduardo Krieger<sup>1</sup>  
Edilamar Menezes de Oliveira<sup>1</sup>

1. Universidade de São Paulo-USP  
São Paulo, SP, Brasil.

## Correspondência:

Edilamar Menezes de Oliveira  
Escola de Educação Física e  
Esporte da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Biodinâmica do  
Movimento do Corpo Humano.  
Av. Professor Mello Moraes, 65,  
Butantã - 05508-900 - São Paulo,  
SP, Brasil.  
edilamar@usp.br

## RESUMO

**Introdução:** A angiogênese muscular esquelética induzida pelo treinamento físico aeróbio (TF) é determinante na melhora da capacidade aeróbia. Entre os fatores envolvidos, as células progenitoras endoteliais (CPE) derivadas da medula óssea são descritas por promoverem o reparo vascular e a angiogênese. Embora o papel do TF sobre os parâmetros das CPE tenha sido investigado, pouco se conhece sobre os efeitos de diferentes volumes de TF sobre a função das CPE da medula óssea, alterações metabólicas e capilarização muscular. **Objetivo:** Testar a hipótese de que o TF melhore a função das CPE da medula óssea, acompanhada por maior capilarização e capacidade oxidativa muscular dependentes do aumento de volume de TF. **Métodos:** Vinte e uma ratas Wistar foram divididas em três grupos: sedentário controle (SC), treinado protocolo 1 (P1), treinado protocolo 2 (P2). P1: o treinamento de natação consistiu de 60 min, 1x/dia, cinco dias/semana/10 semanas, com 5% de sobrecarga corporal. P2: o mesmo de P1 até a oitava semana, na nona semana os animais treinaram 2x/dia e na 10ª semana 3x/dia. **Resultados:** O TF promoveu bradicardia de repouso, aumento da tolerância ao esforço, do consumo de oxigênio de pico e da atividade da enzima citrato sintase muscular no grupo P1, sendo estas adaptações mais exacerbadas no grupo P2, indicando que a condição aeróbia foi mais proeminente com este TF. O TF melhorou a função das CPE da medula óssea em P1, sendo ainda maior esta resposta no grupo P2. Em paralelo, observou-se também um aumento no número de capilares dependentes do volume de TF. **Conclusão:** Estes resultados sugerem que a medula óssea como o principal reservatório de CPE é influenciada por diferentes volumes de TF, sendo possivelmente responsável pelo maior rendimento físico observado mediante uma maior mobilização endógena de CPE, participantes ativas no processo de angiogênese muscular induzido pelo TF.

**Palavras-chave:** exercício, capilares, medula óssea, células progenitoras endoteliais.

## ABSTRACT

**Introduction:** Skeletal muscle angiogenesis induced by aerobic exercise training (ET) is crucial in the improvement of the aerobic capacity. The endothelial progenitor cells (EPC) derived from bone marrow have been described for promoting both the vascular repair and angiogenesis. Although the role of the ET on the parameters of the EPC has been investigated, the effect of different volumes of ET on the EPC function in bone marrow, skeletal muscle metabolic alterations and capillarization are unknown. **Objective:** We hypothesized that ET improves the EPC function in bone marrow, accompanied by an increase of skeletal muscle oxidative capacity and angiogenesis dependents of the increase of volume of ET. **Methods:** Twenty one Wistar rats were divided into 3 groups: sedentary control (SC), trained protocol 1 (T1) and trained protocol 2 (T2). T1: swimming training consisted of 60 min, 1x/day/10weeks, with 5% body weight load. T2 the same as T1 until 8<sup>th</sup> week, in the 9<sup>th</sup> week the rats trained 2x/day and in the 10<sup>th</sup> week 3x/day. **Results:** ET promoted resting bradycardia, increase of exercise tolerance, peak oxygen uptake and citrate synthase enzyme activity in the T1 group, being these adaptive responses exacerbate in the P2 group, indicating that the aerobic condition was improved in this group. ET improved the EPC function of the bone marrow in T1, and the response was exacerbated in T2 group. In parallel, an increase in the number of capillaries dependent of ET volume was also observed. **Conclusion:** These findings suggest that the bone marrow as the main reservoir of EPC is influenced by different ET volume, possibly being responsible for the improvement of aerobic performance observed by higher endogenous EPC mobilization, active participants in the process of angiogenesis induced by ET.

**Keywords:** exercise, capillaries, bone marrow, endothelial progenitor cells.

## INTRODUÇÃO

O treinamento físico aeróbio (TF) acarreta diversas respostas adaptativas nos sistemas cardiovascular e muscular esquelético. No músculo esquelético, a melhora do rendimento físico está associada à alta densidade mitocondrial, à capacidade oxidativa, à melhora da função vascular e à angiogênese. A angiogênese muscular indica uma importante adaptação ao TF, contribuindo determinadamente para uma melhora da capacidade aeróbia representada por um aumento no transporte, condutância e extração de oxigênio muscular<sup>1-4</sup>. Vários fatores têm sido apontados como determinantes do processo de formação de novos vasos sanguíneos, sendo que a contribuição de células circulantes tem-se tornado recentemente apreciada<sup>5</sup>.

A descoberta das células progenitoras endoteliais (CPE) derivadas da medula óssea na circulação periférica estendeu a visão do processo angiogênico, uma vez que um acúmulo de evidências mostrou que as CPE migram para a circulação participando tanto do processo de reparo como na formação de novos vasos sanguíneos<sup>5-9</sup>. Asahara *et al.*<sup>6,7</sup> foram os primeiros a isolar e caracterizar uma população de células-tronco CD34+ circulantes, as quais podiam se diferenciar em células com fenótipo de célula endotelial, indicando que o sangue periférico é um reservatório de CPE derivadas da medula óssea e que exibiam propriedades reparatórias. Além disso, estudos mostraram que as CPE não somente se incorporam dentro de vasos sanguíneos funcionais dando origem a novos vasos, mas também podem liberar uma gama de fatores de crescimento, providenciando sinais parácrinos às células endoteliais adjacentes, que facilitam a angiogênese, indicando um adicional significado pelo qual as CPE contribuem para o processo de neovascularização e reendotelização<sup>10</sup>. Mais recentemente, outros estudos mostraram que elas aumentam de número em resposta a isquemia tecidual<sup>11</sup> e participam do desenvolvimento de vasos colaterais após expansão *ex vivo* e quando transplantadas<sup>12</sup>.

Sabe-se que o número e a função das CPE são reguladas, não somente por vários fatores de crescimento 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<sup>7-9</sup>.

Estudos 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, conseqüentemente, a manutenção da homeostase cardiovascular<sup>13-19</sup>.

Embora o efeito do TF sobre os parâmetros das CPE tenha sido mostrado, estudos com mudanças no volume de TF sobre as CPE e a capilarização ainda não foram estudados. Portanto, a proposta para este estudo é verificar: 1) se o aumento do volume de TF induz melhora acentuada na função das CPE da medula óssea de ratas; e 2) se o aumento do volume de TF aumenta ainda mais a capilarização do músculo sóleo. Os autores hipotetizam que o TF melhore a função das CPE da medula óssea, acompanhada por uma maior capilarização e capacidade oxidativa muscular dependentes do aumento de volume de TF, o que é pertinente à musculatura esquelética mais ativa sendo necessária para o alcance de um maior rendimento físico.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais experimentais

Para realização do presente estudo foram utilizadas 21 ratas Wistar. Os animais foram provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Os animais estavam pesando entre 180 e 200 g no início do protocolo. Os

animais utilizados neste estudo foram mantidos em gaiolas plásticas em grupos de três ou quatro 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 em Pesquisa da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo.

### Identificação dos animais

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos com sete animais em cada grupo, conforme o protocolo experimental:

- ratas Wistar sedentárias controle (SC);
- ratas Wistar treinadas com protocolo 1 (P1); e
- ratas Wistar treinadas com protocolo 2 (P2).

### Protocolos de treinamento físico aeróbio

Protocolo 1 (P1) – Os animais foram treinados com natação durante 10 semanas, sessões de 60 min, uma vez ao dia, cinco vezes/semana, com aumento gradual da sobrecarga de trabalho (peso na cauda em porcentagem do peso corporal). Foi realizada uma adaptação crescente até atingir 5% do peso corporal<sup>20</sup>.

Protocolo 2 (P2) – Neste protocolo de treinamento os animais treinaram até a oitava semana com o mesmo protocolo acima (P1). Na nona semana os animais treinaram duas vezes ao dia, sessões de 60 min com intervalo de quatro horas entre as sessões. Na 10ª semana treinaram três vezes ao dia, sessões de 60 min com intervalo de quatro horas entre as sessões. Os ratos foram identificados e pesados semanalmente, para a correção da sobrecarga de treinamento em função do aumento do peso corporal. Este protocolo de treinamento com aumento do volume de exercício tem sido utilizado com o intuito de mimetizar um treinamento físico de alto rendimento<sup>21</sup>.

Os protocolos utilizados foram caracterizados como treinamentos de baixa a moderada intensidade e longa duração, sendo efetivos na promoção de adaptações cardiovasculares e no aumento da capacidade oxidativa muscular<sup>20,21</sup>.

Pré e pós o período de TF os animais foram submetidos a análises hemodinâmicas, teste de tolerância ao esforço e consumo de oxigênio de pico. Após 24 horas da última sessão de treinamento os animais foram mortos por anestesia com injeção intraperitoneal de pentobarbital de sódio (80 mg/kg). As amostras necessárias foram coletadas e armazenadas adequadamente para análises histológicas, bioquímicas e celulares.

### Medida direta da pressão arterial e da frequência cardíaca

Após o período de TF, os animais foram canulados e mantidos em gaiolas individuais, nas quais ficaram pelo menos por 24 horas antes de iniciar o experimento de registro da pressão arterial e frequência cardíaca. A cânula que estava no animal foi conectada a um tubo de polietileno (PE 100) e este a um transdutor eletromagnético (P23 Db; Gould-Statham) que, por sua vez, foi conectado a um amplificador (General Purpose Amplifier-Stemtech, Inc.). O sinal analógico da pressão arterial foi convertido para digital (Stemtech, Inc.), registrado em tempo real em microcomputador com Sistema CODAS e analisado através do programa compatível com *Windows*, com uma frequência de amostragem de 1.000 Hz por canal. A partir deste programa foram obtidos batimento-a-batimento os valores de pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) e frequência cardíaca (FC).

## Avaliação da tolerância ao esforço físico máximo

Para realização do protocolo de avaliação do esforço físico máximo, os animais dos três grupos foram posicionados individualmente sobre a esteira rolante. Imediatamente após o posicionamento do animal foi iniciado o teste de esforço. A velocidade inicial foi de 6 m/min (sem inclinação), que constitui em um protocolo escalonado com incrementos de velocidade de 3 m/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 mediante o incremento de velocidade da esteira. Esta avaliação foi feita após o período de treinamento, para comparar a resposta de desempenho dos animais entre os grupos. Foi comparado o tempo de duração total do teste de esforço (min) para cada rato.

## Avaliação do consumo de oxigênio (VO<sub>2</sub>)

O VO<sub>2</sub> pico foi mensurado por determinação da fração expirada de oxigênio (FeO<sub>2</sub>) 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 gases 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<sub>2</sub> em um analisador de gases. 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 animal 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 (3 min) de exercício realizado, foram analisadas as FeO<sub>2</sub> dos gases contidos no ar da caixa metabólica. Ao atingir a exaustão o animal 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<sub>2</sub> foi calculado através da seguinte fórmula matemática: VO<sub>2</sub> = fluxo de ar x (FiO<sub>2</sub>-FeO<sub>2</sub>) / peso corporal. Onde: VO<sub>2</sub> = mL.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, fluxo de ar = 1.000 mL/min (analisador) + 2.500 mL/min (bomba de aspiração) = 3.500 mL/min, FiO<sub>2</sub> = fração de oxigênio inspirada (ar ambiente), FeO<sub>2</sub> = fração de oxigênio expirada (caixa de mistura), peso corporal = kg.

## Avaliação da atividade da enzima citrato sintase

A medida da atividade da enzima citrato sintase foi realizada no homogeneizado do músculo sóleo dos animais, em espectrofotômetro conforme descrito por Srere<sup>22</sup>. O músculo sóleo foi homogeneizado com tampão fosfato (PBS) na proporção de 1:10 (1g de tecido: 10 ml de PBS). As amostras foram centrifugadas a 1.500 g, durante 10 min a 4°C. O sobrenadante foi retirado e utilizado para medida da atividade enzimática.

A cinética enzimática foi realizada em espectrofotômetro e foi determinada pela quantificação da intensidade de cor formada pela reação entre a coenzima A (CoA) e o ácido oxalacético na presença do ácido 5,5-ditio-bis 2 nitrobenzoico (DTNB). A leitura foi realizada a 25°C, durante um intervalo de 160 segundos, em 412 nm. A atividade da enzima foi determinada pela diferença entre a absorbância inicial e a final, dividida pela diferença de tempo de absorbância. Os resultados foram expressos μmol.mL<sup>-1</sup>.mg proteína<sup>-1</sup>. A proteína foi determinada pelo método de Bradford utilizando como padrão albumina bovina (BSA, 1 mg/mL).

## Extração das células mononucleadas da medula óssea

As células da medula óssea foram obtidas do fêmur e tíbia dos animais. Após tricotomia dos membros inferiores, foi realizada uma incisão para a visualização da articulação coxofemoral. 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 medula óssea foi extraída do osso através da lavagem da cavidade com meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Gibco, NY, EUA), com 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, Suécia) para separação da porção de células mononucleadas (CMN). O material foi centrifugado por 25 minutos a 1.000 g (± 23°C) para a separação das células. Depois de separadas, as células foram lavadas com PBS e novamente submetidas à centrifugação por cinco minutos a 1.000 g, e em seguida ressuspensas em pequeno volume de PBS 1X para posterior contagem em microscópio (Nikon, NY, EUA). Em seguida, foram encaminhadas para análise de função conforme metodologia descrita a seguir.

## 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. 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<sup>6</sup> CMN em placas de cultura de seis 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, Canadá). Após dois dias de incubação para seleção da população de CPE, as células não aderentes são novamente plaqueadas com meio específico *EndoCult*; 3) finalmente, após três dias de cultura, a terceira etapa inclui a contagem em microscópio invertido acoplado à câmera (Nikon, NY, EUA) do número de unidades formadoras de colônia (UFC), após sete dias a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> com 95% de umidade. Os resultados foram expressos em porcentagem da média do controle de número de colônias formadas por 1x10<sup>6</sup> das células plaqueadas.

## Análise da razão capilar por fibra

O músculo sóleo foi seccionado transversalmente, fixado em formaldeído a 6% por 24 horas e processado por desidratação, diafanização e banho de parafina a 60°C. Em seguida, foi realizada a inclusão dos mesmos em cassetes contendo parafina fundida, que ao solidificar deu origem a um bloco de parafina para cada amostra, dos quais foram feitos cortes de 3 μm de espessura em micrótomo, submetidos à montagem de lâminas para análise histológica, com coloração de PAS (*Periodic Acid Schiff*), para visualização dos vasos capilares.

A análise histológica foi realizada com utilização do sistema de análise de imagens Quantimet Leica®, (Leica, Cambridge, United Kingdom) por intermédio de estudo cego. Para análise do número de capilares, a imagem foi ampliada 400x para realizar as medidas. Segundo critérios estabelecidos, o diâmetro foi o principal parâmetro para identificação dos capilares, sendo considerados capilares vasos com diâmetro igual ou menor que 12 μm. Foram analisados cinco campos de visão das lâminas de cada amostra, nas quais foi quantificado o número total de fibras musculares e de capilares por campo de visão e a partir destes valores foi calculada a razão capilar por fibra de cada animal.

## Análise estatística

Foi utilizada análise de variância ANOVA de uma via (grupo como variável independente) para os dados de PAS, PAD, PAM, FC, atividade da enzima citrato sintase, função das CPE e razão capilar por fibra; e teste de Tukey como *post-hoc* (Statistica software, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EUA). Para os dados de tolerância ao esforço e  $VO_2$  pico foi utilizada análise de variância ANOVA de duas vias (grupo e tempo como variáveis independentes) e teste de Tukey como *post-hoc*. Foi adotado para todos os experimentos um  $p < 0,05$  de significância. Todos os resultados foram apresentados na forma de média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

## RESULTADOS

### Parâmetros hemodinâmicos: pressão arterial e frequência cardíaca

Os valores de PAS, PAD e PAM expressos em milímetros de mercúrio (mmHg) e da FC expressos em batimentos por minuto (bpm) no período pós-TF foram sumarizados na tabela 1 para os grupos SC, P1 e P2.

Não houve diferença da PA entre os três grupos estudados. Entretanto, a FC diminuiu significativamente após 10 semanas do treinamento de natação no grupo P1 ( $301,2 \pm 15,3$  bpm) e no grupo P2 ( $309 \pm 14$  bpm), comparado ao grupo SC ( $344,8 \pm 12,1$  bpm,  $p < 0,05$ ).

Tabela 1. Parâmetros hemodinâmicos

Grupos	PAS, mmHg	PAD, mmHg	PAM, mmHg	FC, bpm
SC	127,6 $\pm$ 3,9	97,6 $\pm$ 10,3	113,5 $\pm$ 7,3	344,8 $\pm$ 12,1
P1	123,3 $\pm$ 8,5	96,4 $\pm$ 5,2	110,7 $\pm$ 6,7	301,2 $\pm$ 15,3*
P2	123,0 $\pm$ 8,4	94,3 $\pm$ 8,9	108,3 $\pm$ 9,0	309,0 $\pm$ 14,0*

Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Resultados de pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram obtidos pós período de TF em ratos Wistar sedentários controle (SC), ratos Wistar treinados com protocolo 1 (P1) e ratos Wistar treinados com protocolo 2 (P2). \* $P < 0,05$  vs. SC.

### Teste de esforço físico máximo

Na análise de tolerância ao esforço uma significativa interação dos fatores grupo/tempo [ $F(2,40) = 5,74$ ;  $p = 0,008$ ] foi observada. Os grupos SC, P1 e P2 apresentaram o mesmo desempenho físico no período pré-TF. Entretanto, no período pós-TF houve uma melhora significativa de desempenho dos animais que treinaram (P1 e P2) em relação ao período pré-TF ( $p < 0,001$ ). Além disso, o grupo P1 apresentou um aumento de 20,7% ( $p < 0,001$ ) e o grupo P2 um aumento de 29,4% ( $p < 0,001$ ), ambos comparados ao grupo controle (figura 1A).

### Medida do consumo de oxigênio de pico

Na análise de  $VO_2$  pico uma significativa interação dos fatores grupo/tempo [ $F(2,40) = 3,59$ ;  $p = 0,037$ ] foi observada. A figura 1B mostra que no período pré-TF os grupos SC, P1 e P2 tiveram o mesmo nível médio de  $VO_2$  pico. No período pós-TF observa-se a manutenção do  $VO_2$  pico nos grupos P1 e P2 em relação ao período pré-TF. Entretanto, observa-se uma redução significativa do  $VO_2$  pico do grupo SC comparado ao período pré-TF ( $p < 0,05$ ). Além disso, os grupos treinados apresentaram um  $VO_2$  pico estatisticamente maior em comparação ao  $VO_2$  pico do grupo SC no período pós-TF (SC:  $67,6 \pm 2,2$ ; P1:  $75,63 \pm 2$  e P2:  $80,05 \pm 2,4$  mL.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>,  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente vs. SC).

### Medida da atividade da enzima citrato sintase

A figura 2 mostra que houve um aumento da atividade da enzima citrato sintase no músculo sóleo de ratos treinados com P1 ( $275,7 \pm 24,6$   $\mu$ mol.mL<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>;  $p < 0,05$ ) e P2 ( $385,4 \pm 18,1$   $\mu$ mol.mL<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>;  $p < 0,01$ ) em relação ao grupo SC ( $188 \pm 23,8$   $\mu$ mol.mL<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>).

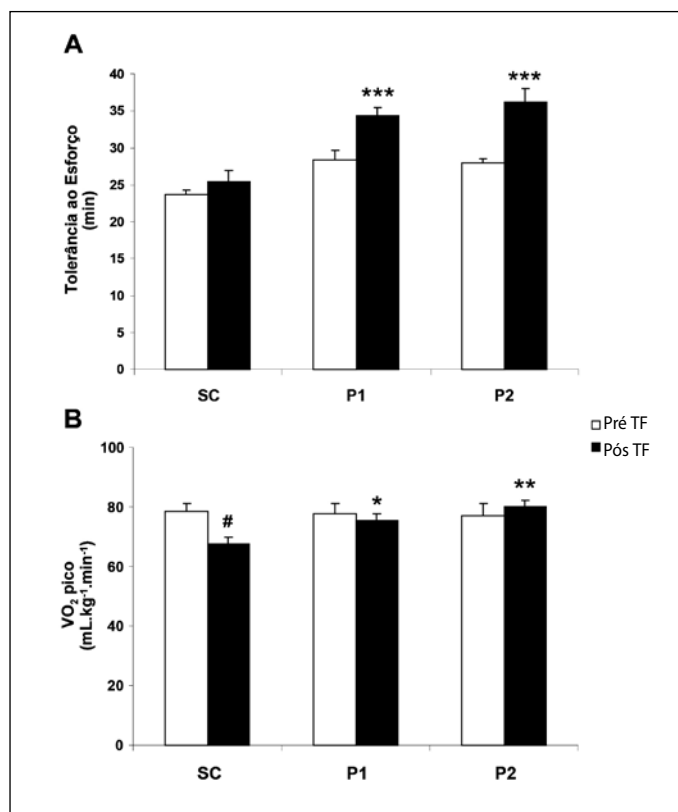


Figura 1. Marcadores de desempenho físico aeróbio. Tolerância ao esforço físico máximo avaliado pelo tempo (min) de duração do teste (A) e consumo de oxigênio ( $VO_2$ ) de pico (B) pré e pós-TF. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM. #  $p < 0,05$  comparado ao pré-TF; \*  $p < 0,05$  comparado ao SC pós-TF; \*\*  $p < 0,01$  comparado ao SC pós-TF; \*\*\*  $p < 0,001$  comparado ao pré-TF e SC pós-TF. TF: treinamento físico.

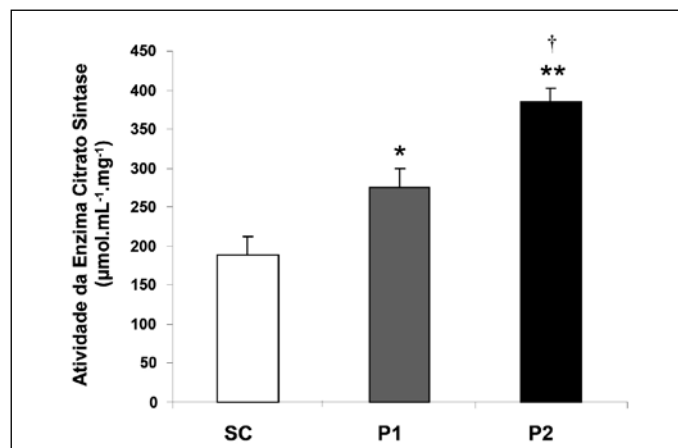
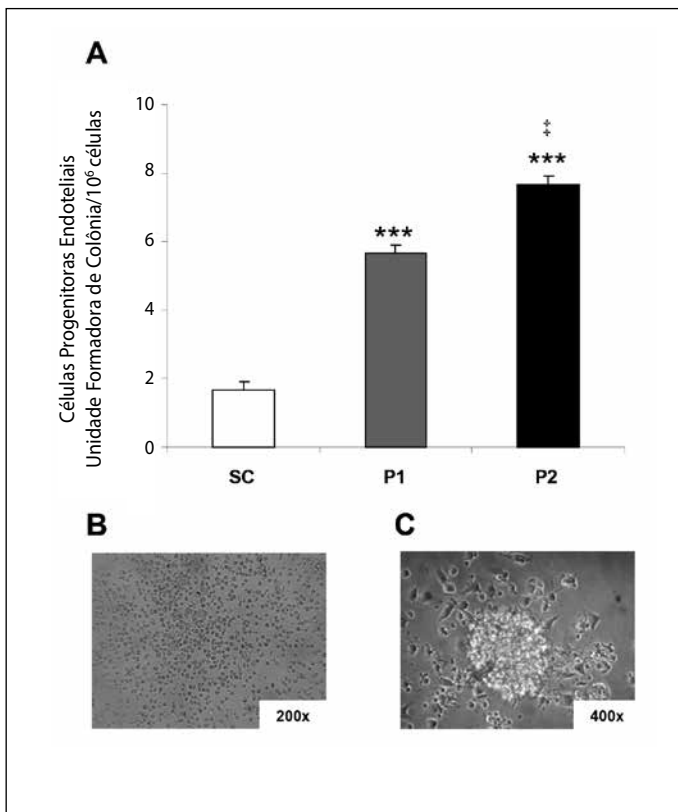


Figura 2. Efeito de diferentes volumes de TF aeróbio sobre a atividade da enzima citrato sintase no músculo sóleo representada em valores de  $\mu$ mol.mL<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>. Resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  comparado ao SC; \*\*  $p < 0,01$  comparado ao SC; †  $p < 0,05$  comparado ao P1. TF: treinamento físico.

### Avaliação de função das células progenitoras endoteliais

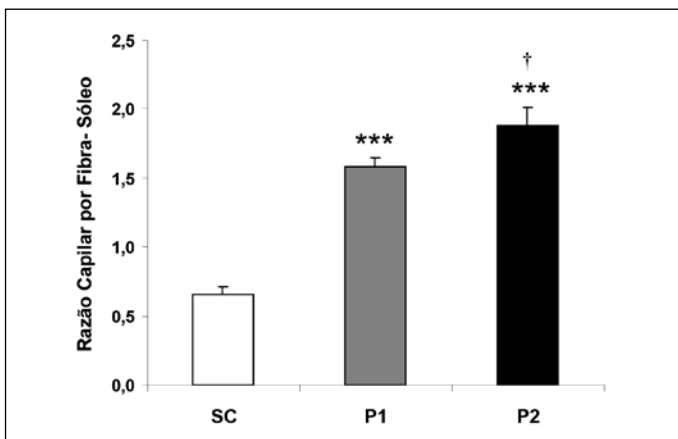
O número de colônias de CPE derivadas da medula óssea foi alterado pelos diferentes volumes de TF. Como demonstrado pela figura 3, o TF foi capaz de melhorar a função das CPE representada pelo aumento de 237% no número de unidades formadoras de colônia no grupo P1 ( $p < 0,001$ ) comparado ao grupo SC. Interessantemente, o aumento do volume de TF aumentou ainda mais o número de colônias, para 358%, no grupo P2 ( $p < 0,001$ ) comparado ao grupo SC. O grupo P2 foi diferente de P1 com aumento de 121% no número de unidades formadoras de colônia para CPE ( $p < 0,01$ ). As unidades formadoras de colônia são mostradas na figura 3B.



**Figura 3.** Efeito de diferentes volumes de TF aeróbio sobre a função das CPE avaliada pela capacidade de formação de unidade formadora de colônia (A). Fotos representativas do segundo dia do plaqueamento das CPE em que ainda não há formação de colônia (B) e ao sétimo dia já contendo a colônia de células (C).

### Determinação da razão capilar por fibra muscular esquelética

Análises morfológicas após processamento histológico revelaram importantes mudanças na microcirculação muscular esquelética induzida pelo TF. A figura 4 mostra os resultados de capilarização obtidos pela coloração com PAS. O TF foi efetivo em aumentar 128% o número de capilares pela análise da razão capilar por fibra no grupo P1 ( $p < 0,0001$ ) comparado ao grupo SC. O aumento do volume de TF promoveu uma angiogênese ainda maior, com um aumento de 171% no grupo P2 ( $p < 0,0001$ ) comparado ao grupo SC (SC:  $0,7 \pm 0,05$ ; P1:  $1,6 \pm 0,06$ ; P2:  $1,9 \pm 0,13$  razão capilar por fibra muscular). O grupo P2 foi diferente de P1 com aumento de 41% no número de capilares ( $p < 0,0004$ ) por fibra.



**Figura 4.** Efeito de diferentes volumes de TF aeróbio sobre a análise de razão capilar por fibra muscular pelo método histológico por meio da marcação com PAS (*Periodic Acid Schiff*). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM. \*\*\*  $p < 0,001$  comparado ao SC; †  $p < 0,05$  comparado ao P1. TF: treinamento físico.

## DISCUSSÃO

No presente estudo, foi avaliado o efeito de diferentes volumes de TF aeróbio sobre a função das CPE da medula óssea e alterações metabólicas e estruturais da musculatura esquelética. Os principais resultados do estudo mostram que o TF aeróbio: 1) induziu bradicardia de repouso sem alterações na PA; 2) aumentou a tolerância à realização do esforço; 3) manteve o  $VO_2$  de pico; 4) aumentou a atividade da enzima citrato sintase; e 5) melhorou a função das CPE da medula óssea acompanhada de um aumento da capilarização no músculo esquelético de maneira dependente do aumento do volume de TF.

As adaptações fisiológicas resultantes do TF aeróbio proporcionam uma maior capacidade do sistema cardiopulmonar em ofertar oxigênio e substratos energéticos para o tecido muscular, e este, por sua vez, utilizá-los mais eficientemente durante o TF<sup>1-4</sup>.

Dentre as adaptações autonômicas e hemodinâmicas que vão influenciar o sistema cardiovascular, a bradicardia de repouso consiste em um bom parâmetro funcional para verificação de adaptação e eficácia do TF aeróbio, portanto, considerada um marcador fisiológico do TF. Esta adaptação é observada tanto em animais de experimentação<sup>20,21,23</sup> como no homem<sup>24</sup>.

Estudos prévios do nosso grupo demonstraram que a magnitude da bradicardia de repouso é dependente do tipo e da intensidade do TF aeróbio utilizado. Como observado, uma maior bradicardia de repouso em animais treinados em natação<sup>20</sup> do que em esteira rolante<sup>23</sup> foi encontrado. No presente estudo observamos que os grupos submetidos aos dois protocolos de TF apresentaram redução similar na FC de repouso independente do volume de exercício empregado, quando comparado à sua FC inicial. Os mecanismos pelo qual esta bradicardia ocorre parecem ser fortemente influenciados pelo tipo de TF. Em ratos normotensos, esta bradicardia de repouso resultante do TF aeróbio em esteira está associada a uma redução na FC intrínseca<sup>23</sup>, ao passo que os animais submetidos ao protocolo de natação parecem apresentar bradicardia de repouso por um aumento do tônus vagal<sup>20</sup>.

Já a adaptação da PA pelo TF parece depender da presença de fatores de risco e doenças cardiovasculares. De fato, estudos mostraram que a resposta de PA permanece inalterada em humanos e animais normotensos submetidos ao TF aeróbio<sup>20,21,23,24-25</sup>. No presente estudo, consistente com os outros estudos acima mencionados, não houve diferença significativa na PA entre os grupos treinados 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 à modalidade em esteira com a natação, nem espécie-dependente. No entanto, pode ser condicionado ao nível inicial de PA, já que populações hipertensas são beneficiadas com o TF aeróbio no que concerne a redução da mesma<sup>25</sup>.

No músculo esquelético, a melhora do rendimento físico está associada à melhora da capacidade oxidativa e à angiogênese<sup>1-4</sup>. O aumento da capacidade de trabalho aeróbio representada pela maior tolerância à realização de esforço físico e  $VO_2$  pico foram observadas nos grupos P1 e P2, sendo as respostas mais exacerbadas no grupo P2. Nesse sentido, outro 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 também 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<sup>26</sup>. No presente estudo a atividade da enzima oxidativa citrato sintase no músculo só-

leo aumentou 47% no grupo P1 e 105% no grupo P2 em relação ao grupo SC, demonstrando que o aumento do volume de TF foi eficaz em induzir uma maior resposta adaptativa muscular às exigências demandadas, contribuindo sobremaneira para o aumento do rendimento físico observado.

Em paralelo, observa-se o aumento do número de capilares no músculo sóleo de animais dos grupos P1 e P2, sendo a angiogênese mais pronunciada no grupo P2. Estudos mostram que a hipóxia e o *shear stress* são os mais importantes estímulos que iniciam a angiogênese muscular esquelética induzida pelo TF<sup>1-4</sup>. Na presença de hipóxia ocorre um marcante aumento na transcrição do fator induzido por hipóxia (HIF-1 $\alpha$ ) que, por sua vez, estimula a transcrição do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). O desequilíbrio inicial da pressão parcial de O<sub>2</sub>, pelo aumento do VO<sub>2</sub>, estimula a expressão VEGF e, conseqüentemente, a proliferação de células endoteliais para a formação de novos vasos<sup>1-4</sup>.

Interessantemente, a hipóxia e o *shear stress* gerados na musculatura esquelética pelo TF aeróbio foram descritos por ser um dos mais potentes estímulos fisiológicos conhecidos por desencadear o aumento do número e melhorar a função de CPE mediada pela síntese de fatores de crescimento, principalmente de VEGF e óxido nítrico (NO)<sup>8,9,13-19</sup>. A hipóxia e o *shear stress* alteram o endotélio microvascular causando a mobilização de CPE para estas regiões. A adesão dessas é significativamente elevada 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<sub>2</sub> como do fluxo sanguíneo induzido pelo TF aeróbio elevam a 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<sup>8,9,13-19</sup>.

Laufs *et al.*<sup>13</sup> foram os primeiros a mostrarem que o TF aeróbio é capaz de influenciar no número de CPE, em que camundongos treinados comparados aos sedentários apresentaram um significativo aumento de CPE na medula óssea e na circulação a partir do sétimo dia de TF, sendo mantido por mais de um mês de atividade continuada. Os pesquisadores também mostraram que camundongos tratados com bloqueador da NO sintase (L-NAME) e *knockout* para este gene tiveram estes aumentos bloqueados, o qual sugere um aumento de CPE dependente de NO em resposta ao exercício aeróbio.

Além disso, Adams *et al.*<sup>14</sup> observaram que pacientes com isquemia do miocárdio apresentavam aumento de CPE sistêmicas dentro de 24-48 h após exercício máximo. Os aumentos encontrados no número de CPE foram relacionados com uma maior concentração de VEGF no

plasma. Estudos mostram que 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 responsáveis pela mobilização de CPE da medula óssea para o sangue periférico<sup>8,9,17,18,27</sup>. Estudos posteriores, em indivíduos saudáveis, confirmaram o papel do TF na promoção da angiogênese e melhora da função vascular por melhorar a bioatividade das CPE dependentes do aumento de VEGF e NO<sup>8,9,15-19</sup>.

O perfil das CPE também pode ser influenciado pela intensidade do TF. Assim, o exercício físico vigoroso, como o realizado pelos corredores maratonistas, não mostrou nenhuma modificação na concentração de CPE<sup>28</sup>, ao passo que um recente estudo publicado por Goussetis *et al.*<sup>29</sup> demonstrou um aumento de 10 vezes das CPE após 246 km de *foot race* e que esta mobilização mediada pelo exercício estava associada com a liberação de VEGF na circulação. Similar a este estudo, Möbius-Winkler *et al.*<sup>30</sup> mostraram um aumento de CPE na circulação de indivíduos saudáveis a partir de 210 min de exercício vigoroso, indicando um aumento dessas células dependente do tempo de realização do exercício.

Consistente com os dados da literatura, nossos resultados também apontam para uma melhora dos parâmetros das CPE em resposta ao TF. Além disso, mostramos pela primeira vez que esta melhora na função das CPE é dependente do aumento de volume de treinamento, uma vez que se observou um acréscimo de 121% na melhora da função das CPE no grupo P2 comparado ao P1. Em paralelo, observa-se também um aumento no número de capilares dependente do volume de TF.

## CONCLUSÃO

Estes resultados sugerem que a medula óssea, como o principal reservatório de CPE, é influenciada por diferentes volumes de TF, sendo possivelmente responsável pelo maior rendimento físico observado mediante uma maior mobilização endógena de CPE, sendo elas participantes ativas no processo de angiogênese muscular induzido pelo TF aeróbio.

## AGRADECIMENTOS

À FAPESP (No. 2007/56771-4 e No. 2010/50048-1) e ao MCT/CNPq 14/2009 (No. 480391/2009-2) e CNPq (No. 307591/2009-3) pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa.

---

Todos os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.

---

## REFERÊNCIAS

- Holloszy JO, Coyle EF. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J Appl Physiol* 1984;56:831-8.
- Gustafsson T, Puntchart A, Kaijser L, Jansson E, Sundberg CJ. Exercise-induced expression of angiogenesis-related transcription and growth factors in human skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1999;276:679-85.
- Amaral SL, Papanek PE, Greene AS. Angiotensin II and VEGF are involved in angiogenesis induced by short-term exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H1163-9.
- Prior BM, Yang HT, Terjung RL. What makes vessels grow with exercise training? *J Appl Physiol* 2004;52:1119-28.
- Rafii S. Circulating endothelial precursors: mystery, reality and promise. *J Clin Invest* 2000;105:17-9.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cell for angiogenesis. *Science* 1997;275:964-7.
- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999;85:221-8.
- Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: Characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 2004;95:343-53.
- Eguchi M, Masuda H, Asahara T. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Clin Exp Nephrol* 2007;11:18-25.
- Gnecchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res* 2008;103:1204-19.

11. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001;7:430-6.
12. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalca-Moll WM, Silver M, Kearney M, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:3422-7.
13. Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jürgens K, et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* 2004;109:220-6.
14. Adams V, Lenk K, Linke A, Lenz D, Erbs S, Sandri M, et al. Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:684-90.
15. Yang Z, Wang JM, Chen L, Luo CF, Tang AL, Tao J. Acute exercise-induced nitric oxide production contributes to upregulation of circulating endothelial progenitor cells in healthy subjects. *J Hum Hypertens* 2007;21:452-60.
16. Hoetzer GL, Van Guilder GP, Irmiger HM, Keith RS, Stauffer BL, De Souza CA. Aging, exercise, and endothelial progenitor cell clonogenic and migratory capacity in men. *J Appl Physiol* 2007;102:847-52.
17. Wahl P, Block W, Schmidt A. Exercise has a positive effect on endothelial progenitor cells, which could be necessary for vascular adaptation processes. *Int J Sports Med* 2007;28:374-80.
18. Shantsila E, Lip G. Endothelial function and endothelial progenitors: possible mediators of the benefits from physical exercise? *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2009;16:401-3.
19. Walther C, Gaede L, Adams V, Gelbrich G, Leichtle A, Erbs S, et al. Effect of increased exercise in school children on physical fitness and endothelial progenitor cells: a prospective randomized trial. *Circulation* 2009;120:2251-9.
20. Medeiros A, Oliveira EM, Gianolla R, Casarini DE, Negrão CE, Brum PC. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. *Braz J Med Biol Res* 2004;37:1909-17.
21. Fernandes T, Hashimoto NY, Magalhães FC, Fernandes FB, Casarini DE, Carmona AK, et al. Aerobic exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves regulatory microRNAs, decreased angiotensin-converting enzyme-angiotensin II, and synergistic regulation of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7). *Hypertension* 2011;58:182-9.
22. Srere PA. Studies on purified citrate-enzymes: metabolic interpretations. *Biochem Soc Symp* 1968;27:11-21.
23. Evangelista FS, Martuchi SE, Negrão CE, Brum PC. Loss of resting bradycardia with detraining is associated with intrinsic heart rate changes. *Braz J Med Biol Res* 2005;38:1141-7.
24. Katona PG, McLean M, Dighton DH, Guz A. Sympathetic and parasympathetic cardiac control in athletes and nonathletes at rest. *J Appl Physiol* 1982;52:1652-7.
25. Fernandes T, Magalhães FC, Roque FR, Phillips MI, Oliveira EM. Exercise training prevents the microvascular rarefaction in hypertension balancing angiogenic and apoptotic factors: role of microRNAs-16, -21, and -126. *Hypertension* 2012;59:513-20.
26. Siu PM, Donley DA, Bryner RW, Alway SE. Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac e skeletal muscles. *J Appl Physiol* 2003;94:555-60.
27. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest* 2001;108:391-7.
28. Adams V, Linke A, Breuckmann F, Leineweber K, Erbs S, Kränkel N, et al. Circulating progenitor cells decrease immediately after marathon race in advanced-age marathon runners. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2008;15:602-7.
29. Goussetis E, Spiropoulos A, Tsironi M, Skenderi K, Margeli A, Graphakos S, et al. Spartathlon, a 246 kilometer foot race: effects of acute inflammation induced by prolonged exercise on circulating progenitor reparative cells. *Blood Cells Mol Dis* 2009;42:294-9.
30. Möbius-Winkler S, Hilberg T, Menzel K, Golla E, Burman A, Schuler G, et al. Time-dependent mobilization of circulating progenitor cells during strenuous exercise in healthy individuals. *J Appl Physiol* 2009;107:1943-50.